

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA DE *Arabidopsis thaliana*
DURANTE A ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR

ANA LÍDIA SOARES RANGEL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO/2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA DE *Arabidopsis thaliana*
DURANTE A ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR

ANA LÍDIA SOARES RANGEL

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de mestre em Biociências e
Biotecnologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO/2010

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA DE *Arabidopsis thaliana*
DURANTE A ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR

ANA LÍDIA SOARES RANGEL

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2010.

Comissão examinadora:

Prof. Márcio Alves Ferreira (D. Sc. Em Genética) - UFRJ

Prof^a. Rosana Rodrigues (D. Sc. em Produção Vegetal) - UENF

Prof. Fábio Lopes Olivares (D. Sc. Em Agronomia) - UENF

Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (D. Sc. em Biociências e Biotecnologia) - UENF

(Orientador)

*“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como do conhecimento de Deus!
Quão insondáveis são os Seus juízos, e quão inescrutáveis os Seus caminhos!
Porque, quem compreendeu a mente do Senhor Jesus ou quem foi Seu conselheiro?
Ou quem deu primeiro a Ele, para que lhe fosse recompensado?
Porque d’Ele (Jesus), por Ele, e para Ele, são todas as coisas...
Glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”*

Romanos 11: 33-36

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado **Senhor Jesus**, Autor e Consumador da minha fé, por estar ao meu lado todos os dias, me fortalecendo nos momentos difíceis e mostrando o caminho que devo seguir; meu fiel amigo.

Aos meus pais **Ivone Soares Rangel** e **Ronaldo Pessanha Rangel**, por acreditarem e investirem em mim. Obrigada pelo apoio, incentivo, auxílio, paciência e acima de tudo, por me transmitirem valores muito mais preciosos que qualquer título acadêmico.

Às minhas irmãs **Priscila Soares Rangel** e **Laís Soares Rangel** por serem minhas grandes amigas. É muito bom conviver, crescer e aprender com vocês.

Ao meu noivo **Guilherme Almeida de Souza**, pela companhia constante, dividindo comigo os momentos difíceis durante esses dois anos. Obrigada por sua ajuda, seu incentivo, paciência durante os estresses e por me fazer rir, apesar das situações.

Ao meu grande amigo **Leonardo Bernardo Campanelli** por seu apoio constante e ajuda sempre oportuna.

Ao professor **Gonçalo Apolinário de Souza Filho**, pelo conhecimento transmitido, incentivo, paciência e amizade durante este tempo.

Ao professor **Frederick Ausubel** (Departamento de Genética- Harvard Medical School-USA) e aos professores **Ping He** e **Libo Shan** (Texas A&M University, USA) por terem gentilmente nos cedido as sementes de *A. thaliana* que foram utilizadas neste trabalho, bem como à **Dra. Jen Sheen** (Departamento de Genética- Harvard Medical School-USA) por nos ter cedido a cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.

Ao professor **Fábio Lopes Olivares**, pelas “dicas” e auxílio nunca negado sempre que necessário.

Aos professores **Márcio Alves Ferreira** e **Rosana Rodrigues**, por aceitarem prontamente meu convite para fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

À **Dr^a. Adriane Nunes de Souza** por fazer a revisão deste material, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

Às minhas amigas **Roberta Ribeiro Barbosa e Juliana Ferreira da Silva**, pela amizade, companhia, ajuda e disponibilidade para discussão dos experimentos e resultados. A amizade de vocês foi imprescindível durante esta etapa. Aos demais amigos da equipe, **Beatriz dos Santos Ferreira, Adriane Nunes de Souza, Aline Chaves Intorne, Marcos Vinícius Viana de Oliveira, Janice Maria Ribeiro Dias, Cristina dos Santos Ferreira, Leandro de Mattos Pereira, Patrícia Louzada Rangel, Fernanda Bueno, Mariana Barduco e José Paulo Mota** por me ensinarem tanto através da competência científica e pela agradável convivência.

Aos professores e colegas do **Laboratório de Biotecnologia – LBT/CBB/UENF** e a todos que de alguma forma, tiveram participação neste trabalho.

Aos órgãos financiadores **CNPq, FINEP, FAPERJ e CAPES** pelo suporte financeiro que garantiu o desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro** e aos professores e funcionários do **Centro de Biociências e Biotecnologia**.

SUMÁRIO

Página de capa	I
Página de guarda.....	II
Página de rosto	III
Página de aprovação	IV
Dedicatória	V
Agradecimentos	VI
Sumário	VIII
Índice de figuras.....	X
Índice de tabelas.....	XII
Abreviaturas e símbolos	XIII
Resumo	XV
Abstract	XVI
I – Introdução.....	1
II – Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 – Associações entre plantas e microrganismos.....	3
2.2 – Bactérias endofíticas e a promoção do crescimento.....	4
2.3 – A cana-de-açúcar.....	7
2.4 – Interação entre cana-de-açúcar e <i>G. diazotrophicus</i>	10
2.5 – Sistema imune vegetal.....	12
2.5.1 – <i>Arabidopsis thaliana</i> : modelo para estudo do sistema imune vegetal e expressão gênica.....	13
2.5.2 – Imunidade inata e subversão da resposta imune vegetal.....	15
2.5.3 – Imunidade sistêmica.....	20
III – Objetivo.....	23

VI – Materiais e Métodos.....	24
4.1 - Material Vegetal.....	24
4.1.1 – Caracterização de mutantes.....	24
4.1.2 – Caracterização de linhas transgênicas.....	26
4.2 - Material Bacteriano.....	27
4.3 - Meios de cultivo e condições de crescimento.....	27
4.4 - Desinfestação de sementes de <i>A. thaliana</i>	28
4.5 - Condições de crescimento vegetal.....	29
4.6 – Preparo do inóculo.....	29
4.7 – Tratamento das plantas para inoculação.....	29
4.8 – Inoculação.....	30
4.9 – Análise dos níveis de colonização.....	30
4.10 – Análise de acúmulo de calose.....	31
4.11 – Análise de pigmentos.....	31
4.12 – Análises estatísticas.....	31
V- Resultados.....	32
5.1 – Estabelecimento das condições de cultivo de plantas de <i>A. thaliana</i> atenuadas para o sistema de defesa.....	32
5.2 – Efeitos da inoculação de <i>G. diazotrophicus</i> em <i>A. thaliana</i>	33
5.3 – Análise de pigmentos fotossintéticos em folhas inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i>	37
5.4 – Análise do acúmulo de calose.....	40
5.5 - Análise dos níveis de colonização de <i>A. thaliana</i> por <i>G. diazotrophicus</i>	42
5.6 - Análise dos níveis de colonização de <i>A. thaliana</i> pelos endófitos <i>H. seropedicae</i> e <i>B. brasiliensis</i>	45
VI - Discussão.....	47
VII - Conclusões.....	52
VIII – Referências Bibliográficas.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparação da produção de cana-de-açúcar no Brasil entre 2008 e 2009.....	9
Figura 2: <i>Arabidopsis thaliana</i> no início do estágio de florescimento.....	14
Figura 3: Modelo de ativação da resposta imune basal e sua supressão pelos efetores tipo III.....	19
Figura 4: Representação sistemática da resposta imune induzida sistemicamente.....	20
Figura 5: Plantas de <i>A. thaliana</i> obtidas para ensaios de colonização por <i>G. diazotrophicus</i>	32
Figura 6: Plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas com <i>P. syringae</i> DC3000 no primeiro dia (A) e 3 dias depois (B), visando a análise do desenvolvimento de sintomas de doença.....	33
Figura 7: Plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> no primeiro dia (A), 3 dias depois (B), 7 dias depois (C) e 10 dias após o inóculo (D), visando a análise do desenvolvimento de sintomas de doença.....	34
Figura 8: Amostras foliares provenientes de plantas de <i>A. thaliana</i> sete dias após terem sido inoculadas com <i>P. syringae</i> DC3000 e <i>G. diazotrophicus</i>	35
Figura 9: Amostras foliares provenientes de plantas de <i>A. thaliana</i> dez dias após terem sido inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i>	36
Figura 10: Teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas e não inoculadas por <i>G. diazotrophicus</i> , após dez dias.....	38
Figura 11: Relação de pigmentos fotossintéticos clorofila <i>a+b</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas e não inoculadas por <i>G. diazotrophicus</i> , após dez dias.....	39
Figura 12: Deposição de calose em folhas de <i>A. thaliana</i> inoculadas <i>G. diazotrophicus</i> e <i>P. syringae</i> DC3000.....	41

Figura 13: Ensaio de colonização usando <i>G. diazotrophicus</i> e <i>P. syringae</i> DC3000, em plantas de <i>A. thaliana</i> controle e linhas transgênicas de <i>AvrPto</i>	43
Figura 14: Ensaio de colonização usando <i>G. diazotrophicus</i> e <i>P. syringae</i> DC3000, em plantas de <i>A. thaliana</i> controle, linha transgênica <i>NahG</i> e mutantes <i>npr1</i> e <i>sid2.2</i>	44
Figura 15: Ensaio de colonização usando <i>H. seropedicae</i> e <i>B. brasiliensis</i> , em plantas de <i>A. thaliana</i> controle, linhas transgênicas de <i>AvrPto</i> , linha transgênica <i>NahG</i> e mutantes <i>npr1</i> e <i>sid2.2</i> , após dez dias.....	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Solução de vitamina para meio de cultura.....28

Tabela 2: Solução de micronutrientes para meio de cultura.....28

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Micromol por metro quadrado por segundo
Abs	Absorbância
AIA	Ácido indol acético
células.mL ⁻¹	Células por mililitro
CFU	Unidade formadora de colônia
CFU.mL ⁻¹	Unidade formadora de colônia por mililitro
COL-0	Ecótipo Columbia
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFR	Receptor para EF-Tu
EF-Tu	Fator de alongação Tu
ESTs	Expressed Sequence Tags
ETI	Imunidade ativada por efetores
HR	Resposta hipersensitiva
ISR	Resistência sistêmica induzida
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeos
LRR	Receptor rico em leucina
MAMP	Padrões moleculares associados a microrganismos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênese
NO	Óxido nítrico
NPP	Proteínas indutoras de necrose
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PR	Proteínas de resistência
PRR	Receptores para padrão de reconhecimento

PTI.....Imunidade ativada por PAMPs
SA.....Ácido salicílico
SAR.....Resistência sistêmica adquirida
SUCEST.....Sugarcane EST Genome Project
ROS.....Espécies reativas de oxigênio
T3SS.....Sistema de secreção tipo III
TLR.....Receptores toll-like

RESUMO

Plantas estão constantemente expostas a fungos e bactérias, estabelecendo associações. A liberação de PAMP's por patógenos garante a multiplicação bacteriana e o desenvolvimento de sintomas de doença devido à sua capacidade de inibir a resposta de defesa. Bactérias endofíticas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* conseguem colonizar o interior de espécies vegetais economicamente importantes como a cana-de-açúcar, sem causar sintomas de doença. A interação entre cana-de-açúcar e *G. diazotrophicus* tem sido alvo de pesquisas, no entanto os mecanismos que possibilitam a bactéria colonizar de um modo endofítico ainda não foram elucidados. Neste trabalho estudaram-se os níveis de colonização das bactérias de cana-de-açúcar *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasiliensis* em plantas de *Arabidopsis thaliana* cuja resposta imune tenha sido previamente reprimida, com o objetivo de avaliar a participação do sistema de defesa desta planta durante a colonização por tais endófitos. Para tanto, foram testadas plantas transgênicas (contendo os genes bacterianos *NahG* e *AvrPto*) e mutantes defectivos (*npr1* e *sid 2.2*), cujos mecanismos de percepção ou resposta a patógenos encontram-se reprimidos. Os dados mostraram que *G. diazotrophicus* têm sua capacidade de colonizar favorecida em plantas com o sistema de defesa atenuado e, apesar do reforço da parede celular provido pela produção e acúmulo de calose o crescimento bacteriano não é contido. Além disto, o resultado da análise de pigmentos mostrou que a colonização de plantas de *A. thaliana*, reprimidas no sistema de imunidade inata, por *G. diazotrophicus* provoca, após dez dias de inoculação, sintomas de doença que incluem forte clorose. No entanto, o mesmo não foi observado em plantas deficientes na resposta imune mediada por ácido salicílico, demonstrando que a manifestação de tais sintomas é dependente das vias de produção ou percepção deste composto. Adicionalmente, testes de colonização mostraram que *H. seropedicae* e *B. brasiliensis* também têm sua capacidade de colonizar favorecida quando a planta hospedeira possui a resposta imune previamente subvertida. Futuramente, este sistema modelo permitirá estudar os aspectos moleculares relacionados com o mecanismo de interação entre microrganismos endofíticos e plantas economicamente importantes, potencializando a colonização destas por bactérias benéficas e continuar empregando esta tecnologia na agricultura.

ABSTRACT

Plants are constantly exposed to fungi and bacteria, establishing associations. The release of PAMP's by pathogens ensures the bacterial growth and development of disease symptoms due to its ability to inhibit the defense response. Endophytic bacteria as *Gluconacetobacter diazotrophicus* can colonize economically important plant species tissues such sugarcane, without causing disease symptoms. The interaction between sugarcane and *G. diazotrophicus* has been the research subject, but the mechanisms that enable the bacteria to colonize a way endophytic not been elucidated yet. In this work were studied the *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasiliensis* endophyte levels of colonization in *Arabidopsis thaliana* whose immune response has previously been repressed, in order to analyze the influence of plant immune system during the interaction of this bacterium with the plant. Therefore, trials were made callose accumulation assays and colonization tests. The data showed that *G. diazotrophicus* have their ability to colonize favored in plants whose defense system weakened. To this end, we tested transgenic plants (containing the bacterial gene *NahG* and *AvrPto*) and defective mutants (*npr1* and *sid 2.2*), whose mechanisms of pathogens perception or response are repressed. The data showed that *G. diazotrophicus* have their ability to colonize defense system and attenuated plants favored and despite the strengthening of the cell wall provided by the callose production and accumulation the bacterial growth isn't contained. Moreover, the pigment analysis result showed that the *A. thaliana* suppressed the innate immune system colonization by *G. diazotrophicus* causes disease symptoms that include strong chlorosis after ten days of inoculation. However, the same wasn't observed in plants immune response mediated by salicylic acid deficient, showing that the symptoms manifestation is dependent on the means of this compound production or perception. In addition, tests showed that *H. seropedicae* and *B. brasiliensis* colonization also have their ability to colonize favored when the host plant immune response has previously overturned. In the future, this model system will enable us to study the molecular aspects related to the mechanism of interaction between endophytic microorganisms and economically important plants, enhancing the colonization by these bacteria and to continue using this technology in agriculture.

1 – INTRODUÇÃO

Plantas estão constantemente expostas a fungos e bactérias, estabelecendo associações que podem ou não ser benéficas. O reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP's) é crucial para que o sistema imune vegetal dispare uma cascata de sinais que culminam no controle da infecção (BOLLER e FELIX, 2009). Apesar das barreiras da imunidade inata em plantas, alguns microrganismos conseguem acessar o interior do hospedeiro, subverter a defesa vegetal, estabelecer fortes níveis de colonização e causar sintomas de doença (CHISHOLM, 2006; GÖHRE e ROBATZEK, 2008). Bactérias patogênicas como *Pseudomonas syringae* são capazes de secretar cerca de trinta efetores durante a infecção (CHANG *et al.*, 2005). Estes padrões moleculares garantem a multiplicação bacteriana e o desenvolvimento de sintomas de doença devido à sua capacidade de inibir a resposta imune vegetal (HAUCK *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2005).

Entretanto, outros microrganismos são capazes de interagir com hospedeiros vegetais e estabelecer interações benéficas. Bactérias endofíticas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* conseguem colonizar o interior de espécies vegetais economicamente importantes como a cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DOBERËINER, 1988), arroz (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2005) e café (JIMENEZ-SALGADO *et al.*, 1997) sem causar sintomas de doença (BALDANI *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998). Neste tipo de interação o principal benefício obtido pela planta é a promoção do crescimento (SEVILLA *et al.*, 2001) decorrente da ação bacteriana na disponibilização do nitrogênio (COHJO *et al.*, 1993) e/ou da produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal como auxina (FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1993) e giberelina (BASTIAN *et al.*, 1998), além do controle de fitopatógenos (ARENCIBIA *et al.*, 2006).

A cana-de-açúcar, principal hospedeiro do endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus*, tem sido apontada no setor agrícola mundial como uma das culturas mais importantes no âmbito sócio-econômico por ser utilizada como matéria-prima para a obtenção de diversos produtos de interesse, como açúcar e etanol (MAULE *et al.*, 2001). Além do alto potencial de lucro decorrente da comercialização de seus tradicionais produtos, a cultura canavieira tem se destacado no cenário mundial por representar uma fonte de energia alternativa à proveniente da exploração do petróleo, caracterizada pela geração de fortes impactos ambientais (FIGUEIREDO,

2000).

Apesar dos valores financeiros gerados a partir da agricultura voltada para a obtenção de cultivares economicamente importantes, os lucros vêm sendo fortemente reduzidos devido ao uso de fertilizantes e defensivos agrícolas. Além disto, tal abordagem gera danos ao meio ambiente, contribuindo para a contaminação da água e do solo, além de prejudicar a saúde de seres humanos e animais, pela persistência na cadeia trófica (PEDRAZA, 2008). Sendo assim, o emprego de microrganismos promotores do crescimento vegetal é uma alternativa importante e viável.

A interação entre cana-de-açúcar e *G. diazotrophicus* tem sido alvo de pesquisas no Brasil e em outros países como a Índia, dada sua importância econômica. Entretanto, existem poucos grupos de pesquisa dedicando-se à compreensão dos aspectos moleculares que promovem esta associação. A maioria dos trabalhos busca entender as características da bactéria envolvidas na promoção do crescimento (VARGAS *et al.*, 2003; BODDEY *et al.*, 2003; ARENCIBIA *et al.*, 2006; CAVALCANTE *et al.*, 2007). Os mecanismos que possibilitam a bactéria colonizar de um modo endofítico, não patogênico, ainda não foram elucidados (VARGAS *et al.*, 2003; ROSENBLUETH e MARTINEZ-ROMERO, 2006). Além disso, diversas linhagens de pesquisa têm sido direcionadas para o entendimento acerca da atuação do conjunto de proteínas e metabólitos que constituem as respostas de defesa vegetal no combate a microrganismos patogênicos. Sendo assim, o conhecimento sobre a regulação do sistema imune nas interações entre plantas e patógenos tem se expandido, mas pouco se sabe sobre a ativação deste sistema durante a associação com bactérias endofíticas.

Devido ao interesse em potencializar a colonização de plantas por bactérias benéficas e ampliar o uso desta tecnologia na agricultura, o entendimento acerca dos mecanismos moleculares associados ao sistema imune vegetal e do conjunto gênico regulado durante a interação entre cultivares de importância econômica e endófitos é essencial. Neste contexto, o presente trabalho buscou analisar aspectos concernentes à resposta imune inata e sistêmica, utilizando um sistema modelo baseado na associação entre bactérias endofíticas de cana-de-açúcar, com ênfase na *Gluconacetobacter diazotrophicus*, e plantas de *Arabidopsis thaliana* com a capacidade de resposta imune subvertida, a fim de avaliar a participação do sistema de defesa vegetal durante a colonização por endófitos.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Associações entre plantas e microrganismos

As plantas são capazes de interagir com microrganismos presentes no meio em que vivem, formando associações que podem ser simbióticas, endofíticas ou patogênicas. Durante o estabelecimento da associação, o sistema de defesa da planta é estritamente regulado, determinando sua compatibilidade (MITHOFER, 2002). Durante associações incompatíveis, a planta estabelece um conjunto de mecanismos de defesa que atuam diretamente contra o microrganismo invasor, tais como fortificação da parede celular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de fenilpropanóides, além da expressão de proteínas relacionadas com a patogênese (MITHOFER, 2002). No entanto, alguns microrganismos subvertem a resposta de defesa vegetal, invadindo os tecidos da planta e causando danos, por meio de uma interação compatível, isto é, onde há suscetibilidade do hospedeiro (GÖHRE e ROBATZEK, 2008). Em cana-de-açúcar, por exemplo, a bactéria *Xanthomonas albilineans* atua como um patógeno do sistema vascular, causando prolongada infecção latente e deixando as folhas cloróticas (BIRCH *et al.*, 2000).

Em contrapartida, interações simbióticas são aquelas que permitem às espécies envolvidas sobrepor suas limitações fisiológicas pela utilização da capacidade uma da outra (DOUGLAS, 1994). A associação entre bactérias dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* e plantas leguminosas resultam na morfogênese de um novo órgão derivado da raiz, o nódulo fixador de nitrogênio (PHILLIPS e TORREY, 1972), no qual a bactéria reside e converte nitrogênio atmosférico em amônia, que pode ser, então, assimilado pela planta hospedeira. Esta, por sua vez, fornece componentes de carbono para a bactéria (NIEBEL *et al.*, 1998). Dentre as dicotiledôneas, leguminosas como *Medicago truncatula* em interação com a bactéria *Sinorhizobium meliloti* vêm sendo largamente utilizadas como modelo de estudo e há diversos trabalhos descrevendo detalhadamente os mecanismos moleculares que envolvem o processo de invasão da superfície radicular, estabelecimento da colonização e formação do nódulo na planta hospedeira (JONES *et al.*, 2007). Entretanto, não se sabe ao certo como a planta tolera um contato íntimo com microrganismos simbiontes sem disparar mecanismos de defesa. Acredita-se que algumas bactérias ativam a resposta imune, enquanto outras a suprimem. Entender de que forma as plantas percebem os conservados

padrões moleculares de rizóbios e respondem a eles tem sido uma busca ativa no campo da pesquisa (JONES *et al.*, 2007).

As associações endofíticas caracterizam-se pela capacidade do microrganismo em colonizar os espaços intercelulares e tecidos vasculares de diferentes órgãos vegetais, sem causar dano aparente, sintoma de doença ou reações de hipersensibilidade na planta hospedeira (KLOEPPER e BEAUCHAMP, 1992). Nesse tipo de interação, o termo endofítico facultativo refere-se aos organismos que sobrevivem bem no solo, superfície e interior das raízes, sendo capazes de colonizar diferentes hospedeiros, enquanto o endofítico obrigatório tem boa sobrevivência apenas no interior das raízes e alta especificidade com seu hospedeiro (BALDANI *et al.*, 1997). Apesar de as plantas não leguminosas serem infectadas por microrganismos de espécies diferentes daqueles encontrados em associações com espécies leguminosas e por meio de processos também diferentes, sabe-se que a região radicular também é um excelente habitat para infecção e crescimento dos microrganismos, sendo, em geral, a parte da planta por onde a interação se inicia (REMHOLD-HUREK *et al.*, 1986). *Gluconacetobacter diazotrophicus* é considerada uma bactéria endofítica obrigatória (BALDANI *et al.*, 1997), mas há trabalhos mostrando que sua ocorrência é notória também na rizosfera (SARAVANAN *et al.*, 2007; JIMENEZ-SALGADO *et al.*, 1997).

No âmbito da pesquisa voltada para o entendimento dos processos envolvidos no sucesso da interação entre bactérias endofíticas e plantas não leguminosas, *Gluconacetobacter diazotrophicus* tem sido considerado um organismo modelo para estudos devido às suas características relacionadas com a promoção do crescimento vegetal (COCKING *et al.*, 2003).

2.2 – Bactérias endofíticas e a promoção do crescimento

No grupo das monocotiledôneas, espécies vegetais de importância econômica como cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. L.) e arroz (*Oryza sativa* L.) vêm sendo largamente estudadas quanto à ocorrência de interações benéficas que resultam na promoção do crescimento vegetal. Pesquisas nessa área permitiram a descoberta de um grande número de endófitos como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE E DOBERËINER, 1988), *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense* (WEBER *et al.*, 1999), *Burkholderia* sp. (WEBER *et al.*,

1999; ENGELHARD *et al.*, 2000), *Herbaspirillum seropedicae* (OLIVARES *et al.*, 1996; WEBER *et al.*, 1999) e *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* (OLIVARES *et al.*, 1996).

Além da caracterização destes microrganismos, diversos trabalhos têm buscado entender os efeitos benéficos atribuídos à presença dos endófitos nos tecidos da planta hospedeira que resultam na promoção do crescimento vegetal. A fixação biológica do nitrogênio tem se destacado como um desses efeitos (VERMA *et al.*, 2001). Outras características benéficas tem sido atribuídas aos microrganismos endofíticos como a indução de resistência sistêmica (RAMAMOORHY, 2001), a produção de antibióticos (STROBEL e DAISY, 2003), o controle biológico de pragas e patógenos (PIÑON *et al.*, 2002; ARENCIBIA *et al.*, 2006), produção de fitormônios, vitaminas e enzimas moduladoras do crescimento (SARAVANAN *et al.*, 2007) e a produção de sideróforos (WENBO *et al.*, 2001).

Desde o isolamento da bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou *G. diazotrophicus* a partir de tecidos de cana-de-açúcar, em 1988, devido à observação de crescimento favorecido e baixas demandas de fertilizantes nitrogenados (CAVALCANTE e DOBERËINER, 1988), este microrganismo tem sido caracterizado fisiologicamente e a presença de uma ou mais dessas características, aliada à sua ocorrência na rizosfera, tem garantido sua adição ao grupo das bactérias promotoras do crescimento vegetal (SARAVANAN *et al.*, 2007).

A capacidade de *G. diazotrophicus* em fixar o nitrogênio atmosférico e disponibilizá-lo para a planta sob uma forma assimilável, tem sido documentada através de diversas investigações (CAVALCANTE e DOBERËINER, 1988; BODDEY *et al.*, 2001; JAMES *et al.*, 1994; BALDANI *et al.*, 1997). Esta habilidade em converter o gás N₂ e sua significativa influência na promoção do crescimento em cana-de-açúcar foi comprovada através de experimentos utilizando cepas de *G. diazotrophicus* cuja expressão do gene *nifH*, que codifica uma proteína responsável pela conversão de N₂, foi silenciada (SEVILLA *et al.*, 2001). Além disto, foi demonstrado que o sucesso da colonização de cana-de-açúcar por *G. diazotrophicus* pode ser aumentado pela adição de uma dose inicial de fertilizante nitrogenado (SUMAM *et al.*, 2005). Por ser um elemento essencial, o balanço do nitrogênio interfere na formação de raízes, fotossíntese, produção e translocação de fotoassimilados, bem como na taxa de crescimento entre folhas e raízes (TAIZ *et al.*, 2004). Além disso, nas plantas é um nutriente importante, sendo o componente

responsável por várias reações químicas, além de fazer parte da constituição de moléculas como ácidos nucleicos, clorofila e proteínas (COCKING *et al.*, 1992). O nitrogênio é considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas em seu ambiente natural (FRANCO e DÖBEREINER, 1994). Isto ocorre porque, este elemento é encontrado na forma de um gás quimicamente muito estável pela presença de uma tripla ligação. Portanto, sua assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação. Assim, apesar da abundância de N₂ na atmosfera terrestre, os organismos eucariotos não conseguem utilizar este elemento diretamente. Apenas uma porção dos procariotos, como bactérias e algas cianofíceas, consegue converter ou reduzir o nitrogênio da atmosfera em amônia (NH₃), a qual pode ser incorporada pela planta, para o crescimento e manutenção das células (DIXON e KAHN, 2004). Esses microrganismos são chamados diazotróficos, por serem capazes de converter o N₂ em NH₃, incorporando o elemento N à biomassa vegetal, por meio de um mecanismo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN) (KNEIP *et al.*, 2007). Além dos benefícios econômicos relacionados com a baixa necessidade de adubos nitrogenados para a manutenção das culturas, a introdução de N₂ nos ciclos biogeoquímicos deste elemento tem efeitos positivos no meio ambiente. É possível favorecer o equilíbrio do ecossistema com uma redução significativa das doses de compostos nitrogenados antropogênicos, permitindo desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva ao meio ambiente (BODDEY, *et al.*, 2003).

Outra importante característica de alguns microrganismos endofíticos, que se considera estar diretamente relacionada com a ação de promover o crescimento vegetal, é a capacidade de sintetizar fitormônios. Em 1993, foi demonstrado que *G. diazotrophicus* é capaz de produzir ácido indol acético (AIA), uma auxina que influencia positivamente o crescimento das raízes (FUENTES-RAMÍREZ *et al.*, 1993). Na Índia, a produção deste hormônio vegetal foi confirmada em cepas isoladas a partir de cultivares de cana-de-açúcar de diferentes genótipos (SUMAM *et al.*, 2001). A produção de giberelina, outro hormônio vegetal importante no crescimento devido à sua relação com a alongação do caule, foi descoberta em *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* (BASTIÁN *et al.*, 1998). Estes hormônios facilitam a utilização de água pelas plantas e contribuem para a melhoria da nutrição mineral (BAZZICALUPO e OKON, 2000).

Além de fitormônios, alguns nutrientes como zinco e fósforo são essenciais na produção de culturas vegetais. O zinco é um micronutriente e atua como cofator enzimático de diversas rotas metabólicas, sendo essencial para a promoção do crescimento em plantas, mas a maioria dos solos é deficiente quanto a este elemento (SARAVANAN *et al.*, 2003). Já o fósforo é um macronutriente essencial ao crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo assimilado pelas plantas apenas na forma solúvel (HPO_4^- e H_2PO_4^-), mas encontra-se na forma insolúvel em grande parte da natureza (KHAN *et al.*, 2006). *G. diazotrophicus* tem sido estudada quanto à sua capacidade de solubilizar estes compostos e disponibilizá-los para a planta hospedeira, favorecendo o crescimento (SARAVANAN *et al.*, 2007). A atividade de solubilizar fósforo mineral foi observada em várias cepas isoladas de cana-de-açúcar (MAHESHKUMAR *et al.*, 1999). Outros endófitos como *G. azotocaptans* e *S. salitolerans* têm sido descritas como sendo capazes de solubilizar compostos fosfatados e disponibilizar tal elemento para as plantas hospedeiras (MEHNAZ *et al.*, 2006). Quanto ao zinco, variações no potencial de solubilização deste elemento têm sido observadas em cepas de *G. diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar, arroz e café (MADHAIYAN *et al.*, 2004). A cepa PAL5 é capaz de solubilizar zinco presente vários compostos, incluindo ZnO , ZnCO_3 e $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (SARAVANAN *et al.*, 2007b). Estudos acerca das vias de mobilização de zinco e fósforo, utilizando um banco de mutantes de *G. diazotrophicus* PAL5, revelaram que genes envolvidos na síntese do ácido 5-cetoglucônico, são essenciais ao processo de solubilização destes elementos (INTORNE *et al.*, 2007).

O comportamento diazotrófico de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, adicionado às características benéficas já discutidas e seu efeito na promoção do crescimento vegetal justificam a necessidade de estudar os mecanismos utilizados pela bactéria durante o estabelecimento do processo de colonização da planta hospedeira, de modo a potencializar tal associação.

2.3 – A cana-de-açúcar

Importantes endófitos diazotróficos cujas características influenciam na promoção do crescimento vegetal têm sido isolados a partir de tecidos de cana-de-açúcar, tais como *Herbaspirillum seropedicae* (OLIVARES *et al.*, 1996; WEBER *et al.*, 1999), *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* (OLIVARES *et al.*, 1996) e

Gluconacetobacter diazotrophicus (CAVALCANTE E DOBEREINER, 1988), conforme comentado anteriormente. A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea largamente cultivada no mundo, em regiões tropicais e subtropicais (AMALRAJ e BALASUNDARAM, 2006). O Brasil iniciou o cultivo da cana-de-açúcar em 1532, a partir de canas oriundas da ilha da Madeira e possui a maior área cultivada de cana-de-açúcar, seguido da Índia e Austrália (ENRIQUEZ-OBREGÓN *et al.*, 1998). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), as principais regiões de cultivo são Nordeste e Sudeste, sendo o Sudeste líder da produção (423.353,5 milhões toneladas, CONAB safra 2009) com a maior parte concentrada no Estado de São Paulo (86.863 kg/ha). No Rio de Janeiro se destacam as regiões produtoras Norte/Noroeste Fluminense, sendo que o município de Campos dos Goytacazes – RJ é o segundo maior produtor nacional (CONAB, 2009).

No Brasil, a cana-de-açúcar tem grande importância no âmbito sócio-econômico desde o período colonial, sendo a atividade agroindustrial mais antiga do país (FIGUEIREDO, 2000). Muitos são os produtos e subprodutos oferecidos por esta espécie vegetal. Na indústria, a cana-de-açúcar é usada para fabricação de açúcar, etanol, aguardente, plásticos, papel e alguns produtos farmacêuticos, sendo que a produção de açúcar é uma das atividades mais antigas do setor agro-industrial brasileiro. Devido à cultura canavieira, o Brasil ocupa lugar de destaque no agronegócio internacional e, juntamente com a Índia, é um dos principais produtores de açúcar do mundo, sendo o maior produtor de álcool a partir da fermentação direta do caldo da cana, cuja cultura cresce a cada ano. A indústria da cana-de-açúcar obteve recorde histórico com a safra de 2009, com um aumento de 10% em volume de cana moída em relação ao ano anterior (CONAB, 2009). Este aumento na produção também foi notório em relação a outras culturas vegetais (IBGE, 2009) (Figura 1). No âmbito econômico, o setor canavieiro já movimentava cerca de 40 bilhões de reais anualmente, o que corresponde a cerca de 2,35% do produto interno bruto nacional (PIB) (JUNQUEIRA, 2006).

A cultura da cana-de-açúcar é considerada de grande relevância também no aspecto ambiental, pois representa uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis (MAULE *et al.*, 2001). Nesse contexto, o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), criado na década de 1980, foi o maior responsável pelo substancial crescimento da cultura de cana-de-açúcar no país (BOCADO, 1998), pois dedicou-se ao incentivo da produção e utilização do etanol como um

combustível alternativo ao petróleo. Esse projeto teve relevância econômica e ambiental, tornando o Brasil um dos principais países a utilizar esta forma de combustível (FIGUEIREDO, 2000).

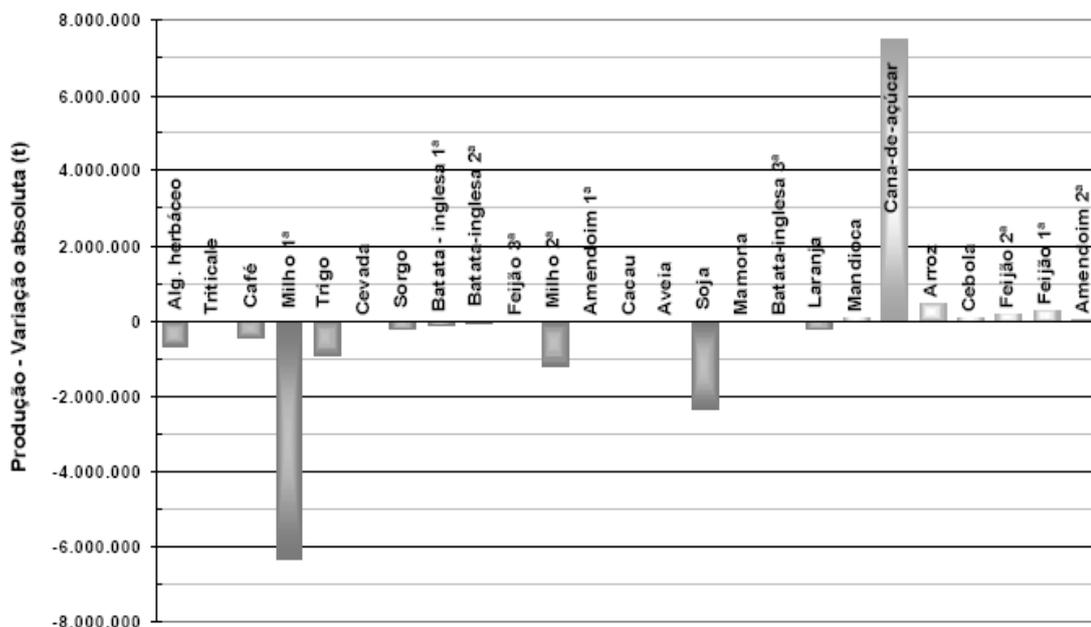


Figura 1: Comparação da produção de cana-de-açúcar com outras culturas economicamente relevantes no Brasil entre 2008 e 2009 (IBGE, 2009).

Devido à importância econômica da cana-de-açúcar, essa planta tem sido extensivamente estudada no Brasil e no mundo, quanto aos seus aspectos fisiológicos, metabólicos e genéticos (ENRÍQUEZ-OBREGÓN *et al.*, 1998; BIRCH *et al.*, 2000; ARRUDA, 2001; BODDEY *et al.*, 2003). Um grande impulso ao conhecimento da genética e biologia molecular da cana-de-açúcar foi obtido com a criação de um projeto de seqüenciamento de ESTs (“Expressed Sequence Tags”) desta espécie vegetal. Tal projeto, denominado SUCEST (“Sugarcane EST Genome Project”), financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), foi iniciado em 1999 e realizado por pesquisadores dos Estados de São Paulo e Pernambuco. Os estudos dedicaram-se ao seqüenciamento e análise de clones de cDNA obtidos a partir de bibliotecas de provenientes de vários órgãos e tecidos da planta, em diferentes estádios de desenvolvimento e condições fisiológicas (ARRUDA, 2001). As seqüências obtidas foram armazenadas e agrupadas em um banco de dados (sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/) de acordo com

seu tecido e condição fisiológica. O projeto SUCEST originou informações acerca do transcriptoma da cana-de-açúcar e estes resultados têm permitido aos pesquisadores a ampliação de conhecimentos sobre os processos fisiológicos e metabólicos dessa espécie vegetal, auxiliando no entendimento de seus mecanismos de expressão e regulação gênica, visando a obtenção de uma cultura canavieira que atenda à demanda populacional de seus subprodutos.

Apesar dos lucros financeiros decorrentes da agricultura voltada para o cultivo de espécies economicamente importantes, como a cana-de-açúcar, os custos são fortemente reduzidos devido ao emprego de adubos nitrogenados e defensivos agrícolas. Além disto, há diversos efeitos nocivos para o meio ambiente, decorrentes da persistência dos elementos na cadeia trófica, tais como a contaminação da água e do solo, danos à saúde de seres humanos e animais (PEDRAZA, 2008). Sendo assim, o emprego de microrganismos promotores do crescimento vegetal continua sendo uma alternativa promissora.

2.4 – Interação entre cana-de-açúcar e *G. diazotrophicus*

A colonização de cana-de-açúcar pelo endófito diazotrófico, *G. diazotrophicus*, não se assemelha ao processo simbiótico descrito entre leguminosas e *Rhizobium*, onde as bactérias são restritas aos nódulos. Esta bactéria coloniza os espaços intercelulares e tecidos vasculares de muitos órgãos da planta, sem formar estruturas nodulares (JAMES *et al.*, 1994).

As etapas iniciais das associações entre plantas e microrganismos envolvem diversas e complexas vias de sinalização, responsáveis por regular o sistema imune vegetal e estabelecer a natureza da interação (LAMBAIS, 2001). Dependendo da cascata de sinais disparada em resposta à presença do microrganismo invasor, a população bacteriana pode ser fortemente reduzida (VARGAS *et al.*, 2003). Durante a associação entre cana-de-açúcar e *G. diazotrophicus*, no entanto, parece não ocorrer este nível de resposta ou a mesma pode ser reprimida, visto que a colonização ocorre de modo eficaz.

G. diazotrophicus inicia a colonização de plantas de cana-de-açúcar pela penetração na ponta da raiz e pelas raízes laterais (JAMES *et al.*, 1994). Na raiz, a bactéria pode ser encontrada no interior das células da epiderme e nos espaços intercelulares do parênquima. A migração para as partes aéreas pode ocorrer a partir dos vasos do xilema (DONG *et al.*, 1994). Estes processos envolvidos na

colonização da cana-de-açúcar por *G. diazotrophicus* foram demonstrados por meio de análises microscópicas (JAMES *et al.*, 1994).

As seqüências de cDNA obtidas a partir de transcritos provenientes de tecidos de cana-de-açúcar em diferentes condições e agrupadas no banco do SUCEST têm permitido o desenvolvimento de vários trabalhos que buscam investigar as bases moleculares envolvidas na interação entre cana-de-açúcar e endófitos. Nesse sentido, as bibliotecas AD1 e HR1, referentes a seqüências de cDNA de plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans*, respectivamente, têm sido alvo deste tipo de análise. De acordo com uma análise prévia destas bibliotecas feita por Nogueira e colaboradores (2001), a planta pode estar ativamente envolvida no processo de interação com endófitos, visto que foi confirmada a indução de genes cuja expressão ocorre devido à assimilação de N₂ e carbono, promoção do crescimento e defesa vegetal, ainda que em baixo nível (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Posteriormente, análises de bioinformática utilizando as mesmas bibliotecas do banco SUCEST identificaram genes candidatos a um envolvimento em diferentes processos de sinalização referentes à interação planta/endófito (VARGAS *et al.*, 2003). Além disso, foi identificado um gene de cana-de-açúcar denominado SHR5, que codifica para um receptor tipo quinase envolvido na associação entre a planta e as bactérias endofíticas fixadoras de N₂ *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae*. Adicionalmente, o mesmo efeito na modulação de *SHR5* não foi observado para a interação com outros microrganismos, patogênicos e não-patogênicos, sugerindo que a planta é capaz de distinguir microrganismos benéficos. Quanto à caracterização do gene *SHR5*, a análise da seqüência de nucleotídeos revelou ser este um receptor rico em leucinas na porção extracelular. É interessante notar que receptores desse tipo possuem estruturas similares tanto no processo de defesa do hospedeiro quanto na simbiose. Dessa forma, é possível que *SHR5* esteja envolvido também no processo de defesa da planta e que o decréscimo no nível de expressão do mesmo seja necessário para o estabelecimento de uma associação eficiente entre cana-de-açúcar e *G. diazotrophicus* (VINAGRE *et al.*, 2006).

Quanto à sinalização hormonal envolvida no processo de interação planta/endófito, foi demonstrado recentemente que componentes da rota de sinalização do hormônio etileno são regulados durante a associação entre *G. diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar (CAVALCANTE *et al.*, 2007). A expressão dos genes relacionados com a via de sinalização deste hormônio foi

diferente em plantas inoculadas com patógenos daquelas colonizadas por microrganismos benéficos, sugerindo que o etileno modula a resposta da planta hospedeira a endófitos diazotróficos.

Apesar de haver trabalhos sugerindo, mediante análises de expressão gênica, o envolvimento da planta durante a interação e a possível subversão da resposta de defesa vegetal, ainda não foram elucidados os mecanismos que permitem à bactéria colonizar deste modo endofítico e não-patogênico (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Dessa forma, faz-se necessário um estudo mais aprofundado acerca da participação do sistema de imunidade vegetal durante interações endófito/hospedeiro e dos mecanismos utilizados por microrganismos endofíticos para subverter a resposta imune e garantir o sucesso da interação.

2.5 – Sistema imune vegetal

Os microrganismos vivem na natureza em ambientes altamente diversificados e, para se adaptar às diferentes condições de cada nicho, têm desenvolvido especializadas estratégias que os permitam colonizar espécies vegetais e se estabelecer no interior de raízes, folhas e vasos como xilema e floema (KNISKERN *et al.*, 2007). Após o contato inicial com a planta hospedeira, estes microrganismos precisam vencer um conjunto de barreiras responsáveis por proteger os tecidos vegetais contra a invasão, tais como parede celular, espessura da cutícula foliar, ceras, fitoalexinas exudadas e proteínas de membrana (DARVILL e ALBERSHEIM, 1984; HÜCKELHOVEN, 2007). Em adição às barreiras físicas e químicas pré-existentes, as plantas possuem sistemas de reconhecimento e indução de resposta imune, disparados logo no primeiro contato com moléculas não-próprias e são reforçadas após longa exposição à patógenos (MYSORE *et al.*, 2004). A percepção de padrões moleculares presentes na superfície celular dos microrganismos ativa a primeira linha de resposta, conhecida como imunidade basal em plantas e imunidade inata em animais. Adicionalmente, plantas e animais desenvolveram uma segunda linha de defesa, denominada adquirida ou adaptativa, no caso de vertebrados, e baseada em genes de resistência, em espécies vegetais (BOLLER e FELIX, 2009).

O contato com microrganismos benéficos e o estabelecimento de associações com os mesmos pode trazer inúmeros benefícios à planta hospedeira. Em

contrapartida, sua colonização por bactérias patogênicas resulta em efeitos danosos (GÖHRE e ROBATZEK, 2008).

2.5.1 – *Arabidopsis thaliana*: modelo para estudo do sistema imune vegetal e expressão gênica

Várias espécies vegetais tais como trigo, tomate, arroz, ervilha e cevada têm sido reconhecidas como sistemas modelo para estudo de vias metabólicas, bioquímicas e moleculares. No entanto, diversos pesquisadores têm buscado estabelecer um consenso acerca de uma espécie vegetal que possa ser utilizada para tais estudos. Nesse contexto, *Arabidopsis thaliana* tem sido utilizada como sistema modelo para esclarecimento de aspectos fundamentais concernentes ao desenvolvimento vegetal, tais como crescimento de raízes, ação hormonal e vias de sinalização em resposta a condições ambientais (MEINKE *et al.*, 1998). Ao longo dos anos, a maior parte das pesquisas realizadas com o objetivo de esclarecer os mecanismos envolvidos na interação entre moléculas associadas a microrganismos e seus receptores presentes na superfície celular têm utilizado *Arabidopsis thaliana* como modelo para estudo da resposta imune vegetal (MEYEROWITZ e SOMERVILLE, 1994; RYAN *et al.*, 2007).

Arabidopsis thaliana é um membro da família da mostarda (Cruciferae ou Brassicaceae), cuja distribuição natural ocorre na Europa, Ásia e América do Norte. Muitos ecótipos diferentes têm sido coletados a partir de populações naturais e bem avaliados para fins de análise experimental. O ecótipo Columbia (COL-0) é amplamente empregado para estudos genéticos e moleculares. O período referente ao ciclo de vida, incluindo germinação da semente, formação da roseta, florescimento e maturação das primeiras sementes, se completa em seis semanas (Figura 2). Dessa forma, a multiplicação dessa espécie vegetal é relativamente rápida e, uma planta adulta chega a produzir cerca de cinco mil sementes (MEINKE *et al.*, 1998). O genoma de *Arabidopsis thaliana* contém 120 Mb, está organizado em cinco cromossomos e contém aproximadamente 28000 genes. O seqüenciamento, feito por um consórcio de laboratórios da Europa, Japão e Estados Unidos, tem permitido o estudo de diversos aspectos relacionados com o desenvolvimento vegetal, mediante análises genéticas, através do uso de bancos de dados como o GenBank (MEINKE *et al.*, 1997). Muitas companhias biotecnológicas têm utilizado

essa espécie vegetal na busca de soluções para problemas práticos relacionados com agricultura, energia e meio ambiente. Além disso, avanços significativos têm sido reportados nos últimos anos como clonagem de genes de resistência à doença (BENT *et al.*, 1994) e engenharia genética de plantas (JAGLO-OTTOSEN *et al.*, 1998). Vale ressaltar que uma das idéias originais do uso de *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo era facilitar a identificação de genes cuja importância seja relatada no âmbito de culturas vegetais (MEINKE *et al.*, 1998).

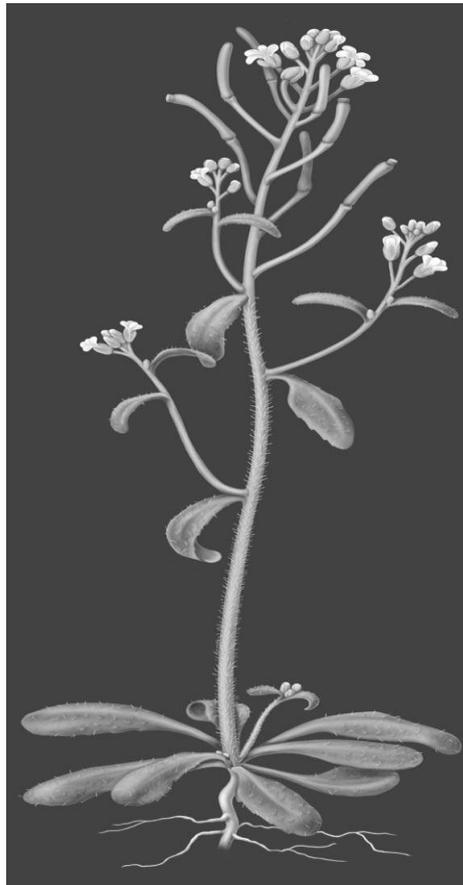


Figura 2: *Arabidopsis thaliana* no início do estágio de florescimento (MEINKE, *et al.*, 1998).

Inovações tecnológicas como o uso de chips de DNA e microarranjo para estudar padrões globais de expressão gênica têm desempenhado um importante papel na pesquisa com *Arabidopsis* desde o fim do seqüenciamento de seu genoma (MARSHALL e HODGSON, 1998). Além disso, pesquisas com *Arabidopsis* têm provido interessantes descobertas relacionadas com vários aspectos da biologia moderna. Em alguns casos, questionamentos em fisiologia e bioquímica de plantas foram primeiramente respondidos através de análises moleculares em plantas

mutantes para genes envolvidos nas vias em estudo. Nesse contexto destacam-se a elucidação da rota de transdução de sinal relacionada com etileno (CHANG *et al.*, 1993) e o desenvolvimento significativo de outra classe de hormônios vegetais, os brassinosteróides, que foi revelado por análises de mutantes de *Arabidopsis* defectivos para a síntese hormonal (LI *et al.*, 1996). Adicionalmente, nos últimos anos os estudos acerca do sistema imune vegetal utilizando *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo têm provido interessantes perspectivas acerca dos detalhes moleculares que definem a imunidade basal em plantas (RYAN *et al.*, 2007).

2.5.2 – Imunidade inata e subversão da resposta imune vegetal

O termo imunidade inata tem sido descrito como um sistema de vigilância que detecta a presença e a natureza da infecção e providencia a primeira linha de resposta do hospedeiro (MEDZHITOV, 2001). O sistema de imunidade inata é responsável pela detecção primária e resposta a patógenos, que então modulam as respostas imunes subseqüentes (KAUFMANN *et al.*, 2004). A estratégia desse sistema baseia-se no reconhecimento de moléculas constitutivas e conservadas de microrganismos, por meio de receptores do hospedeiro, tais como os receptores *toll-like* (TLRs) que ativam a resposta imune (MEDZHITOV e JANEWAY, 2001). As plantas parecem ter desenvolvido inúmeros receptores, hábeis em reconhecer diversas moléculas presentes na superfície celular de microrganismos, patogênicos ou não (NÜRNBERGE e LIPKA, 2005). Em *Arabidopsis*, a imunidade inata é o principal mecanismo de defesa da planta quando o microrganismo ultrapassa as barreiras físicas e químicas (RYAN *et al.*, 2007). Após esta etapa, receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes na membrana plasmática das células vegetais são capazes de reconhecer os padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) patogênicos (PAMPs) ou não (CHISHOLM *et al.*, 2006). Há centenas de receptores do tipo quinases (RLKs) em plantas, capazes de detectar MAMPs e disparar cascatas de resposta imune (ZIPFEL *et al.*, 2006). Deste modo, apesar de não possuírem células imunes especializadas e imunidade somática adaptativa (JONAS e DANGL, 2006), as plantas conseguem responder de forma defensiva à presença de invasores.

A evolução do sistema imune vegetal culminou numa resposta de defesa altamente efetiva, capaz de resistir ao ataque de patógenos (CHISHOLM *et al.*,

2006). Sendo assim, existem duas formas de imunidade inata em plantas: a imunidade ativada por PAMPs (PTI) e a imunidade ativada por efetores (ETI) (CHISHOLM *et al.*, 2006; DARDICK e RONALD, 2006). A resistência decorrente do contato com PAMPs (PTI), também chamada de resistência basal ou horizontal, é baseada no reconhecimento desses padrões moleculares por meio dos receptores da célula hospedeira (PRRs) (FELIX *et al.*, 1999). Devido à co-evolução das interações microrganismo/hospedeiro, patógenos adquiriram a habilidade de liberar proteínas efetoras que suprimem a PTI, permitindo seu estabelecimento nos tecidos vegetais. Em resposta a essa capacidade microbiana de produzir efetores, as plantas adquiriram proteínas de “vigilância”, que monitoram a presença de efetores patogênicos (CHISHOLM *et al.*, 2006). Esta imunidade ativada por efetores, formalmente chamada de baseada em genes de resistência (R) ou resistência vertical decorre da alta especificidade da interação direta ou indireta com efetores de patógenos. Tal reconhecimento normalmente ativa uma vigorosa reação de defesa conhecida como resposta hipersensível, caracterizada pela rápida morte celular apoptótica e necrose local (PEDLEY e MARTIN, 2003; NIMCHUK *et al.*, 2003).

Os PAMPs melhor caracterizados são flagelina, fator de alongação EFTu, harpina (Hrpz), lipossacarídeos, quitina e proteínas indutoras de necrose (NPP) (HE *et al.*, 2007). A flagelina é um componente protéico presente no flagelo de bactérias Gram-negativas. Suas porções N- e C- terminal são altamente conservadas (CHISHOLM *et al.*, 2006). Em estudos de interação entre *A. thaliana* e o patógeno *P. syringae* DC3000, o reconhecimento da flagelina se dá por meio do receptor FLS2 (GÓMEZ-GÓMEZ e BOLLER, 2000). Outro PAMP conhecido é o fator de alongação EFTu, que atua no processo de alongação dos ribossomos durante a tradução. Em *A. thaliana*, o reconhecimento é feito por um receptor rico em leucina do tipo quinase EFR, que ativa uma resposta semelhante à descrita para flagelina (RYAN *et al.*, 2007). Ensaio de afinidade demonstraram a ocorrência de ligação direta entre flagelina e FLS2 bem como RF-Tu e EFR (CHINCHILLA *et al.*, 2007; ZIPFEL *et al.*, 2006). Adicionalmente à sua função na imunidade vegetal, RLKs estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal, como o receptor BRI1, capaz de perceber o hormônio vegetal brassinosteróide (BR) (BELKHADIR *et al.*, 2004).

Após o reconhecimento de PAMPs, a planta hospedeira dispara um conjunto de mecanismos envolvidos com a resposta de defesa. A sinalização primária, que ocorre nos primeiros cinco minutos após o contato com o microrganismo, envolve

alterações no balanço do fluxo de íons através da membrana plasmática. Essas mudanças incluem influxo de H^+ e Ca^{2+} e efluxo de K^+ . MAMPs são conhecidos por estimular um influxo de Ca^{2+} e causar um rápido aumento das concentrações desse íon no citoplasma, o que pode ser uma segunda mensagem para promover a abertura de outros canais na membrana (BLUME *et al.*, 2000). Outra resposta primária a PAMPs é a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem atuar como agentes antimicrobianos e representa um segundo sinal de estresse que irá induzir outras respostas de defesa (APEL e HIRT, 2004). Outros mecanismos relacionados com a resposta de defesa vegetal são a ativação de cascatas de MAPKs, seguida por alterações na fosforilação de proteínas (PECK *et al.*, 2001). Nos trinta minutos que seguem, outros mecanismos de resposta são ativados, tais como biossíntese de etileno devido ao aumento da atividade de síntese do precursor 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (SPANU *et al.*, 1994) e indução da expressão de genes relacionados com a defesa vegetal (HE *et al.*, 2006, RYAN *et al.*, 2007). Em estudos acerca dos níveis de expressão gênica regulada mediante detecção de PAMPs, foi mostrado que o tratamento de folhas de *A. thaliana* com o elicitor flagelina causou a indução de aproximadamente 1000 genes (ZIPFEL *et al.*, 2004). A resposta tardia, que ocorre entre horas a dias após o contato do microrganismo com a planta hospedeira, caracteriza-se pela deposição de calose (1,3- β -glucano) em camadas na parede celular da célula hospedeira, um efeito comum na resposta de defesa vegetal (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006).

Apesar do efetivo reconhecimento de PAMPs através dos receptores de membrana das células vegetais e da cascata de sinalização ativada pela resposta de defesa da planta hospedeira, alguns microrganismos são capazes de subverter a resposta imune e suprimir a resistência imposta pelas barreiras da imunidade inata. Quando isto ocorre, é comum o desenvolvimento de sintomas de doença típicos como necrose e clorose foliar, caracterizada pela degradação dos pigmentos fotossintéticos (WANG *et al.*, 2005). Para tanto, um dos mecanismos utilizados por patógenos é a ativação do sistema de secreção tipo III (T3SS), através do qual são liberadas, no interior da célula hospedeira, proteínas efetoras com atividade supressora de defesa basal. A bactéria patogênica *P. syringae* DC3000 é capaz de secretar mais de 30 moléculas efetoras distintas, com funções que também diferem entre si, atingindo os mais variados níveis da resposta de defesa vegetal (BUTTNER *et al.*, 2006). Alguns destes efetores funcionam como enzimas que manipulam

diversas atividades da célula hospedeira, essenciais para eficiência da resposta imune (SHAN *et al.*, 2007). Estruturalmente, o T3SS é similar ao corpo basal de um flagelo, mas possui componentes adicionais que facilitam o contato com a célula hospedeira. A translocação dos efetores é facilitada pela formação de um poro resultante do contato entre a bactéria e a célula hospedeira (AKEDA e GALAN, 2005). Ao vencerem as barreiras da imunidade basal, como parede celular e membrana plasmática, moléculas efetoras disparam cascatas de sinalização de MAPK, as quais induzem a expressão de aproximadamente 300 genes relacionados com a defesa vegetal, além da ativação de mecanismos de defesa como fortificação da parede celular mediante deposição de calose e produção de ROS e NO (Figura 3) (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006) (HE *et al.*, 2007).

O efector tipo III AvrPto, de *Pseudomonas syringae*, foi o primeiro a ser caracterizado quanto a sua capacidade de suprimir a imunidade inata vegetal e desde então diversos estudos têm sido feitos com o objetivo de caracterizar a interação dessa proteína com a célula hospedeira (NOMURA *et al.* 2005). Sua localização na membrana plasmática é essencial para o efeito supressor desse efector na sinalização por MAMP (HE *et al.*, 2006). Recentemente, SHAN e colaboradores demonstraram que AvrPto interage fortemente com BAK1, um receptor associado ao receptor de brassinosteróide BRI1. A interação AvrPto/BAK1 é tão específica que esse efector não se associa ao receptor BRI1. Segundo os dados, por ativar BAK1, AvrPto bloqueia múltiplas cascatas de sinalização em resposta a MAMPs e rotas de sinalização de brassinosteróides, sendo esta uma estratégia mais eficiente do que ativar receptores individuais (SHAN *et al.*, 2007).

Alguns efetores bacterianos atuam na inibição da imunidade ativada por PAMPs, enquanto outros suprimem a resposta inata vegetal no segundo nível, isto é, a imunidade ativada por efetores (CUI *et al.*, 2009). As moléculas efetoras AvrRpm1, AvrB, AvrPto e HopA1, encontradas em *P. syringae* DC3000 inibem a imunidade ativada por PAMPs, atuando sobre as proteínas RPM1 e Pto da célula hospedeira (MACKEY *et al.*, 2002). Já os efetores AvrRpt2 e AvrPtoB atuam no segundo caso, isto é, suprimem a imunidade ativada por efetores (DAY *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2002). Diversos aspectos relacionados com o processo de interação planta-patógeno vêm sendo esclarecidos nos últimos anos, mas pouco se sabe sobre a influência da resposta imune concernente à colonização de plantas por endófitos.

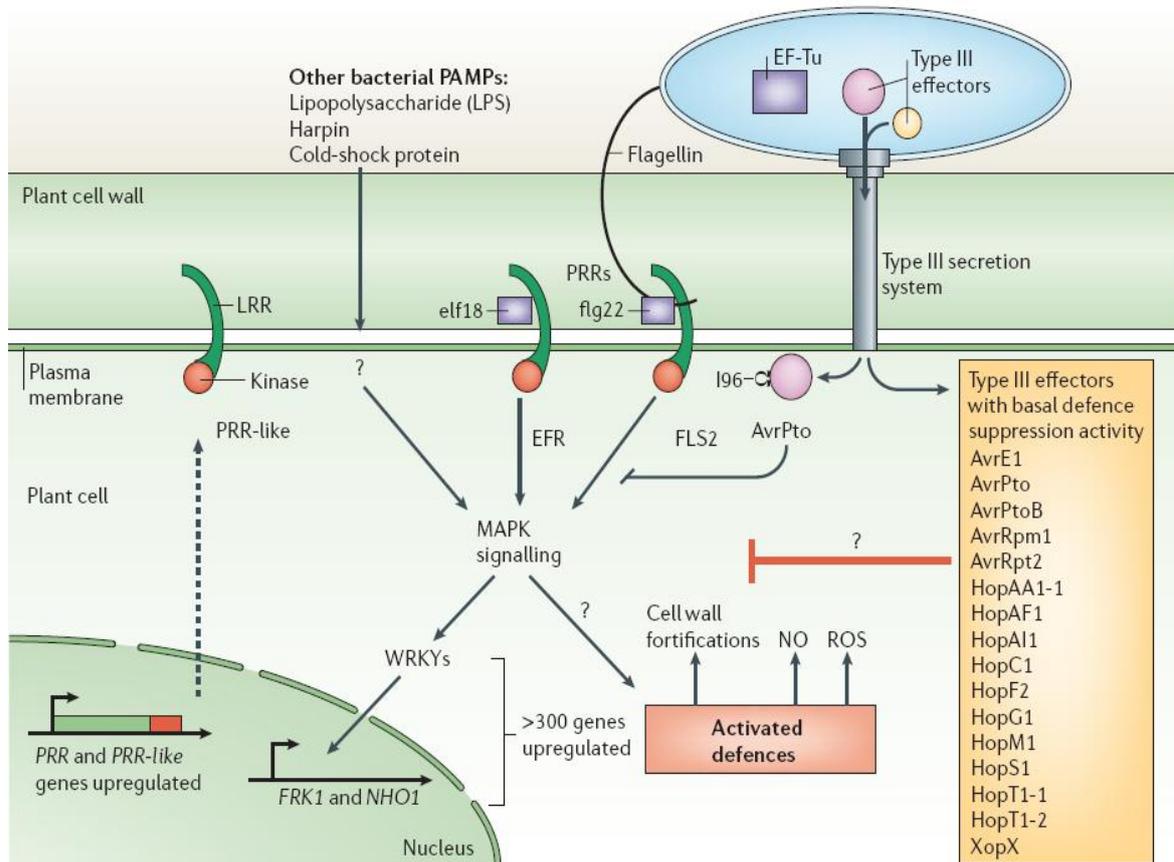


Figura 3: Modelo de ativação da resposta imune basal e sua supressão pelos efetores tipo III (ABRAMOVITCH *et al.*, 2006). Plantas possuem PRRs que consistem de uma porção extracelular rica em leucina (LRR). Em *Arabidopsis*, FLS2 e EFR são PRRs que reconhecem o peptídeo flg22 da flagelina ou o peptídeo elf18 do EF-Tu, respectivamente. Outros elicitores bacterianos já identificados são LPS e hrpinas. A ativação de PRR dispara eventos de sinalização que up-regulam cerca de 300 genes vegetais. Uma rota de MAPK e vários fatores de transcrição cuja função é induzir a expressão de genes como FRK1 e NHO1 também já foram identificados. Os fenótipos associados com a ativação da defesa basal incluem fortificações da parede celular e produção de ROS e NO. Várias proteínas efectoras penetram no interior da célula hospedeira mediante a ação do T3SS, sendo esta uma estratégia usada pela bactéria para suprimir a defesa mediada por PRRs. O efector modelo AvrPto é requerido para reconhecimento e supressão de flg22 e outros PAMPs. Em *Arabidopsis*, a proteína AvrPto funciona regulando MAPK, o que indica que ativa componentes cuja função está relacionada com rotas de PRRs.

2.5.3 – Imunidade sistêmica

Enquanto a resistência basal em plantas envolve o reconhecimento de MAMPs pelos receptores para padrões de reconhecimento (PRRs), os níveis de resposta relacionados com a imunidade sistêmica decorrem da mobilização de um ou mais sinais (ZIPFEL *et al.*, 2004). Contudo, estas cascatas de sinalização atuam como um sinal indireto para a ativação da resistência sistêmica baseada no balanço hormonal (TSUDA *et al.*, 2008) (Figura 4).

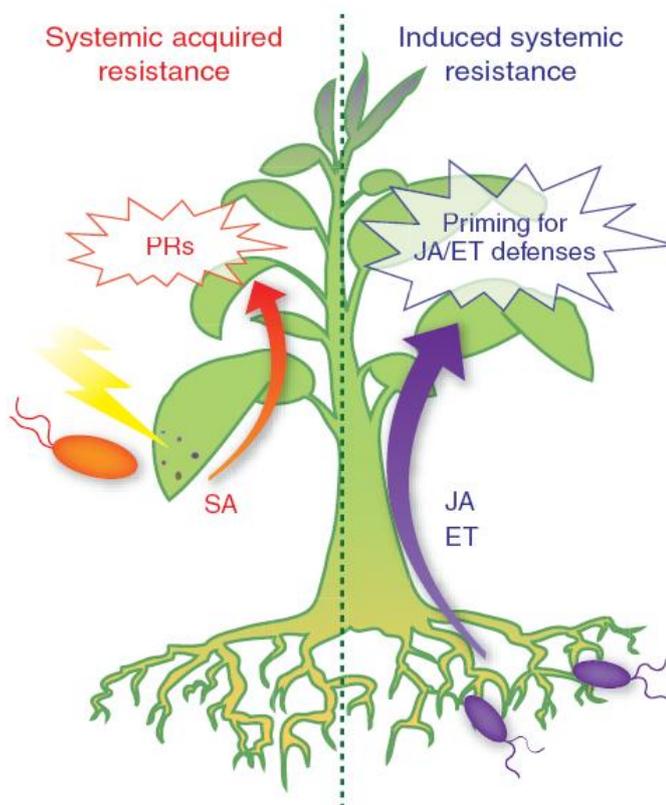


Figura 4: Representação sistemática da resposta imune induzida sistemicamente (PIETERSE *et al.*, 2009). SAR é tipicamente ativada em tecidos sistêmicos saudáveis de plantas infectadas. Durante uma infecção patogênica, ocorre uma mobilização de sinais através do sistema vascular para ativar respostas de defesa em tecidos distantes. SA é uma molécula sinalizadora essencial neste conjunto, sendo requerida para a ativação de um grande número de genes que codificam PRs com propriedades antimicrobianas. Já a ISR é comumente regulada por rotas de sinalização dependentes de JA e ET, não estando tipicamente associada com a ativação direta de genes PR.

A resistência sistêmica vegetal também é um mecanismo de defesa induzido por patógenos. O estado resistente depende de um acúmulo endógeno de ácido salicílico e é caracterizado pela ativação de genes que codificam proteínas

relacionadas com a patogênese (PIETERSE *et al.*, 1996). Esta resistência sistêmica adquirida requer tanto um acúmulo local e sistêmico do composto ácido salicílico, quanto à indução deste conjunto de genes (genes PR) (BOSTOCK, 2005). Apesar de ser requerido para a transdução de sinais, o ácido salicílico não é responsável por essa cascata decorrente da indução sistêmica (VERNOOIJ *et al.*, 1994).

Mutantes e plantas transgênicas que são danificadas na sua capacidade de produzir ou acumular este hormônio não desenvolvem resistência sistêmica e não expressam genes PR em resposta ao contato com patógenos, indicando que o ácido salicílico é um importante intermediário nas vias de sinalização da defesa sistêmica (PIETERSE, 1998; DURRANT e DONG, 2004). A proteína reguladora NPR1 tem um importante papel como transdutor da sinalização por ácido salicílico. Além de ser ativada por esse hormônio, NPR1 atua como um co-ativador transcricional da expressão de genes PR. Plantas mutantes de *A. thaliana* que possuem o gene *npr1* silenciado são insensíveis ao ácido salicílico e, em contato com patógenos, mostram-se mais suscetíveis que tipos selvagens devido à incapacidade de desencadear uma resposta imune sistêmica efetiva (DONG, 2004). Linhas transgênicas de *A. thaliana* expressando o gene bacteriano *NahG* são incapazes de acumular ácido salicílico devido à degradação do mesmo pela enzima salicilato hidroxilase e, conseqüentemente, não desenvolvem resistência sistêmica adquirida relacionada com a ativação de genes PR decorrente da infecção patogênica (PIETERSE, 1998). Trabalhos utilizando tais plantas revelam que a colonização por *P. syringae* DC3000 é favorecida devido à redução do nível de resposta (HAUCK *et al.*, 2003; DEBROY *et al.*, 2004).

Microrganismos benéficos também podem induzir uma resposta sistêmica, a qual é chamada de imunidade sistêmica induzida (POZO e AZCON-AGUILAR, 2007). Assim como os PAMPs de microrganismos patogênicos, diferentes MAMPs presentes em microrganismos benéficos são reconhecidos pela planta, o que resulta na ativação da resposta imune (VAN WEES *et al.*, 2008). No entanto, ao contrário da ativação de ácido salicílico, característica da resposta de defesa sistêmica adquirida, a resposta de defesa induzida por microrganismos benéficos é freqüentemente regulada por ácido jasmônico e vias de sinalização associadas com etileno, que também podem ser reguladas por *npr1* (PIETERSE *et al.*, 1998; CONRATH, 2006).

Dessa forma, a resistência sistêmica adquirida prevê um reforço, uma imunidade sistêmica duradoura contra a infecção secundária decorrente de uma

série de patógenos. As redes de sinalização da imunidade sistêmica parecem ter uma significativa sobreposição com aquelas induzidas pela defesa inata ou basal, desencadeada por MAMPs.

Apesar do conjunto de informações existentes acerca da imunidade vegetal relacionada com a interação entre plantas e patógenos, ou ainda o envolvimento da sinalização hormonal decorrente da associação de hospedeiros com microrganismos simbiotes, pouco se sabe a respeito dessas vias de sinalização na interação planta/endófito. Segundo Vargas e colaboradores, apesar de *Gluconacetobacter diazotrophicus* ser capaz de colonizar os tecidos vegetais sem causar sintomas de doença, é necessário que a planta controle o processo de invasão e proliferação bacteriana (VARGAS *et al.*, 2003). Acredita-se que o sucesso da interação entre cana-de-açúcar e *G. diazotrophicus* deve-se a um sofisticado sistema de detecção e resposta que permite à planta decifrar os sinais bacterianos, induzir a resposta de defesa apropriada e permitir a entrada e proliferação destes microrganismos (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Contudo, os mecanismos pelos quais esse processo ocorre ainda não estão elucidados, tornando cada vez maior a necessidade de entender as bases moleculares da interação a fim de potencializar esta associação.

III - OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a participação do sistema de defesa de *Arabidopsis thaliana* em plantas transgênicas contendo os genes bacterianos *NahG* e *AvrPto*, mutantes defectivos *npr1* e *sid 2.2* e no tipo selvagem, durante a colonização por endófitos de cana-de-açúcar, com ênfase em *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mediante uma análise do efeito da ativação da resposta imune vegetal na colonização por tais bactérias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estabelecimento de um sistema de cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* atenuadas para o sistema de defesa inata e sistêmica;
- ✓ Análise da subversão da resposta imune em plantas de *A. thaliana* sobre a colonização por *G. diazotrophicus*;
- ✓ Avaliação do efeito decorrente da colonização de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* quanto à resposta imune primária relacionada com a deposição de calose;
- ✓ Comparação do teor de pigmentos fotossintéticos em decorrência da inoculação de *G. diazotrophicus* em folhas de *A. thaliana*;
- ✓ Aplicação do sistema modelo *A. thaliana* na colonização por outros endófitos, como *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasiliensis*.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Material Vegetal

Os materiais vegetais utilizados trataram-se de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecótipo COL-0, plantas defectivas para a produção ou percepção de ácido salicílico devido à presença do gene bacteriano *NahG* (acumula pouco ou nenhum ácido salicílico), e os mutantes *npr1* (não expressa genes de patogênese 1 - insensível ao ácido salicílico) e *sid2.2* (defectivo para a produção de ácido salicílico induzida por patógenos). Tais materiais foram gentilmente cedidos pelo prof. Frederick Ausubel (Departamento de Genética- Harvard Medical School-USA). Adicionalmente, foram utilizadas plantas transgênicas de *Arabidopsis*, contendo o gene *AvrPto* de *P. syringae* sob regulação de um promotor induzível por dexamentasona. Tal ferramenta foi obtida através de parceria com os professores Ping He e Libo Shan (Texas A&M University, USA).

4.1.1 – Caracterização de mutantes

As plantas mutantes utilizadas possuem as características abaixo descritas:

npr1

Nome: AT1G64280.1

Modelo gênico: codifica proteína

Descrição: este gene é um regulador chave da rota de resistência sistêmica adquirida mediada por ácido salicílico. Confere resistência aos patógenos *Pseudomonas syringae* e *Peronospora parasítica*. Apesar de sua superexpressão conferir à planta uma maior sensibilidade ao ácido salicílico, esta não demonstra alterações morfológicas e não sofre aumento na expressão de genes PR devido á ativação induzida por patógenos.

Background: COL-0

Irriteirância: recessivo

Dados da proteína:

Nome	Número de Aminoácidos	Peso molecular	Ponto Isoelétrico
AT1G64280.1	593	66031.1	5.8626

Fenótipo: pouca expressão de genes PR; incapaz de responder aos tratamentos induzidos por SAR; intensa suscetibilidade a infecções patogênicas.

Tipo de afetação: mutação de His conservada no resíduo de aminoácido 334 (CAO *et al.*, 1997).

Símbolos:

NPR1	NONEXPRESSER OF PR GENES 1
SAI1	SALICYLIC ACID INSENSITIVE 1
NIM1	NON-INDUCIBLE IMMUNITY 1
ATNPR1	ARABIDOPSIS NONEXPRESSER OF PR GENES 1

sid 2.2 (ICS2)

Nome: AT1G18870.1

Modelo gênico: codifica proteína

Descrição: este gene codifica uma proteína com atividade de síntese de isocorismato, envolvido na biossíntese de filoquinonas. Estudos acerca da função deste gene sugerem que a mesma é redundante com a função do ICS1 (AT1G7410).

Background: COL-0

Irriteirância: recessivo

Genótipo: homocigoto

Dados da proteína:

Nome	Número de Aminoácidos	Peso molecular	Ponto Isoelétrico
AT1G18870.1	562	62385.2	7.1799

Fenótipo: redução na capacidade de acumular SA em resposta a patógenos e na expressão de genes PR; maior suscetibilidade a patógenos (WILDERMUTH, *et al.*, 2001) ; fechamento estomático em resposta a bactérias e LPS é comprometido neste mutante (MELOTTO *et al.*, 2006).

Tipo de afetação: deleção entre os aminoácidos 439 e 455 (WILDERMUTH, *et al.*, 2001).

Símbolos:

ICS2	ISOCHORISMATE SYNTHASE 2
ATICS2	ARABIDOPSIS ISOCHORISMATE SYNTHASE 2

4.1.2 – Caracterização de linhas transgênicas

NahG

Um fragmento de DNA contendo o gene *NahG*, de *Pseudomonas putida*, que codifica a enzima salicilato hidroxilase, uma flavoproteína cuja função é converter salicilato a catecol, foi subclonado em um vetor de expressão controlado pelo vírus do mosaico 35S (GAFFNEY *et al.*, 1993).

AvrPto

O fragmento de DNA do gene *AvrPto*, de *Pseudomonas syringe*, foi clonado sob controle de um promotor induzível por dexametasona, com um epítipo HA. As linhas independentes 120 T2, 121 T2 e 44-5 T4 aparentemente não apresentam diferenças fenotípicas relacionadas com a transgenia (MCNELLIS *et al.*, 1998).

4.2 - Material Bacteriano

Para execução deste trabalho foram utilizadas as bactérias endofíticas *G. diazotrophicus* PAL5, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e *Burkholderia brasiliensis* M130, pertencentes ao banco de cepas da UENF. O microrganismo patogênico utilizado foi *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, gentilmente cedido pela Dra. Jen Sheen (Departamento de Genética- Harvard Medical School-USA).

4.3 - Meios de cultivo e condições de crescimento bacteriano

A bactéria *G. diazotrophicus* foi crescida em meio DYGS modificado contendo em g.L⁻¹: 2,0 glicose; 1,5 peptona bacteriológica; 2,0 extrato de levedura; 0,5 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄.7H₂O; 3,75 ácido glutâmico; 5 mL azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH. Meio sólido: 15,0 ágar (RODRIGUES NETO, 1986; REIS *et al.*, 1994). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 com KOH. (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). As bactérias *Burkholderia brasiliensis* e *Herbaspirillum seropedicae* foram crescidas em meio JMV e JNFB, respectivamente (BALDANI, 1996). A bactéria *Pseudomonas syringae* foi crescida em meio LB *low salt* contendo, em g.L⁻¹: 10,0 triptona, 5,0 extrato de levedura e 5,0 NaCl. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0. Para meio sólido, foi acrescentado ágar 15,0 g.L⁻¹. As culturas foram incubadas sob condições controladas, em estufa e/ou shaker orbital com agitação de 120 rpm, sob temperatura de 30 °C durante aproximadamente 48 horas. No crescimento em meio líquido foram utilizados Erlenmeyers com chicanas para melhorar as condições de aeração da cultura. Também foram utilizadas mantas de algodão envoltas em gaze para manter os frascos isentos de contaminação, no entanto, permitindo a passagem de ar, condição fundamental para a aeração.

Para ensaios de colonização de *G. diazotrophicus* pelo método de contagem de unidade formadora de colônia (CFU) foi utilizado o meio LGI-P sólido contendo, em g.L⁻¹: 100,0 sacarose; 0,2 K₂HPO₄; 0,6 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,2 CaCl₂.2H₂O; 0,002 Na₂MoO₄.H₂O; 0,01 FeCl₃.6H₂O, 5 mL azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH; 15 ágar, acrescido do antibiótico canamicina 50 µg.mL⁻¹ (DÖBEREINER *et al.*, 1995). O pH inicial do meio foi ajustado para 5,5.

Para ensaios de colonização de *H. seropedicae* foi usado o meio JNFB sólido contendo, em g.L⁻¹: 5,0 ácido málico; 0,6 K₂HPO₄; 1,8 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,1

NaCl; 0,02 CaCl₂.2H₂O, 0,06 FeEDTA, 4,5 KOH, 0,02 extrato de levedura, 15 ágar. O meio foi acrescido de, em mL: 5 azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH, 1 vitamina (Tabela 1) e 2 solução de micronutrientes (Tabela 2), acrescido de canamicina 50 µg.mL⁻¹ (BALDANI, 1996). O pH foi ajustado para 5,8 com solução de KOH 1%.

Os ensaios de colonização utilizando *B. brasiliensis* foram feitos em meio JMV sólido contendo, em g.L⁻¹: 5,0 manitol; 0,6 K₂HPO₄; 1,8 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,1 NaCl; 0,02 CaCl₂.2H₂O, 0,06 FeEDTA, 0,1 extrato de levedura, 15 ágar. O meio foi acrescido de, em mL: 5 azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH, 1 vitamina e 2 solução de micronutrientes, acrescido de canamicina 50 µg.mL⁻¹ (BALDANI, 1996). O pH foi ajustado para 5,0.

Para ensaios de colonização de *Pseudomonas syringae*, pelo mesmo método, foi utilizado meio LB *low salt* sólido contendo o antibiótico rifampicina na concentração de 50 µg.mL⁻¹.

Tabela 1: Solução de vitaminas para meio de cultura (DÖBEREINER *et al.*, 1995).

Reagente	g.L ⁻¹
Biotina	0,1
Piridoxol-HCl	0,2

Tabela 2: Solução de micronutrientes para meio de cultura (DÖBEREINER *et al.*, 1995).

Reagente	g.L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5,0
MnSO ₄ .H ₂ O	1,2
H ₃ BO ₃	1,4
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,12

4.4 – Desinfestação de sementes de *A. thaliana*

O processo de esterilização das sementes consistiu na imersão das mesmas em etanol 95% durante 1 minuto, seguida de transferência para solução de

hipoclorito de sódio 50% por 10 minutos. O excesso desses reagentes foi removido mediante lavagem abundante em água ultra-pura estéril. As sementes permaneceram imersas em água durante 48 horas sob temperatura de 4 °C, antes do plantio.

4.5 - Condições de crescimento vegetal

Sementes de *Arabidopsis thaliana* foram germinadas em substrato “Jiffy-7 pellets”, autoclavado, sob condições estéreis. As plantas foram mantidas em câmara de crescimento, sob temperatura de 22 °C e irradiância de 120 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 12 horas por dia. A nutrição das plantas foi feita a cada 15 dias, mediante o fornecimento da solução nutritiva de *Hoagland* modificada (HOAGLAND e ARNON, 1938) a qual contém KNO_3 6,0mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2.4\text{H}_2\text{O}$ 4,0mM, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2,0mM, $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 1,0mM, KCl 0,05mM, H_3BO_3 0,025mM, $\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$ 2,0 μM , $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 2,0 μM , $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM , H_2MoO_4 0,5 μM e NaFeDTPA 0,053mM. O pH foi ajustado para 6,0.

4.6 – Preparo do in\u00f3culo

A bact\u00e9ria *G. diazotrophicus* foi cultivada em meio DYGS modificado l\u00edquido em agitador orbital com agita\u00e7\u00e3o de 120 min^{-1} , conduzido em Erlenmeyer com chicanas a 30 °C por 24 horas. J\u00e1 a bact\u00e9ria *P. syringae* foi cultivada em meio LB *low salt*, sob as mesmas condi\u00e7\u00f5es.

Para in\u00f3culo, a cultura foi centrifugada a 13000 x g e, ap\u00f3s descarte do sobrenadante, as c\u00e9lulas bacterianas foram ressuspensas em \u00e1gua ultra pura est\u00e9ril. A densidade \u00f3tica final, medida em espectrofot\u00f4metro no comprimento de onda de 600 nm, esteve em torno de 0,01 Abs, correspondente a 10^5 c\u00e9lulas. mL^{-1} (contagem em câmara de Neubauer), para *G. diazotrophicus* e 0,001 Abs, correspondente a 10^5 CFU. mL^{-1} para *P. syringae*.

4.7 – Tratamento das plantas para inocula\u00e7\u00e3o

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ec\u00f3tipo COL-0, mutantes defectivos para a produ\u00e7\u00e3o ou percep\u00e7\u00e3o de \u00e1cido salic\u00edlico *npr1* e *sid2-2*, bem como a linha

transgênica portando o gene *NahG* foram irrigadas com água 24 horas antes do processo de inoculação com bactérias. Plantas transgênicas de *Arabidopsis*, contendo o gene *AvrPto*, além de irrigadas, foram borrifadas com solução de dexametasona 20 µM acrescida de 0,025% de *Silwet* L-77, para indução da expressão do gene *AvrPto*.

4.8 – Inoculação

A inoculação foi realizada a partir da injeção de 0,1 mL de cultura bacteriana, na concentração de 10^5 CFU.mL⁻¹, na região abaxial da superfície foliar mediante o manuseio de uma seringa sem agulha (HE *et al.*, 2006). As folhas inoculadas foram identificadas para análises posteriores. As plantas foram mantidas na câmara de crescimento, de acordo com as condições de cultivo descritas no item 4.5, durante três, sete ou dez dias, pois estes foram os períodos pré-definidos mediante comparação com os protocolos descritos na literatura para colonização de *G. diazotrophicus* e *P. syringae* em tecidos vegetais.

4.9 – Análise dos níveis de colonização

Para mensurar o crescimento bacteriano nas folhas inoculadas, dois discos foliares foram submetidos à maceração em água ultra pura estéril. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (HE *et al.*, 2006). As amostras foram plaqueadas em meio LGI-P e LB *low salt* contendo os antibióticos apropriados, para *G. diazotrophicus* e *P. syringae*, respectivamente. Para as bactérias endofíticas *Burkholderia brasiliensis* e *Herbaspirillum seropedica* o procedimento seguido foi o mesmo acima descrito, entretanto as amostras foram plaqueadas em meio JMV e JNFB, respectivamente. Unidades formadoras de colônia foram contadas dois dias após a incubação a 28 °C, para *P. syringae* e quatro dias após a incubação para as bactérias endofíticas.

4.10 – Análise de acúmulo de calose

As folhas previamente inoculadas com *G. diazotrophicus* foram clarificadas mediante imersão em solução de hipoclorito de sódio 100% e, em seguida, coradas com o reagente Azul de Anilina 1% em solução tampão de K_2HPO_4 pH 9,5. As amostras foram examinadas quanto ao acúmulo de calose mediante o preparo de lâminas contendo o tecido foliar. As lâminas foram cobertas com lamínulas e observadas em microscopia de fluorescência (filtro de excitação 365 nm e filtro de emissão 420 nm), utilizando um aumento de 5X (BENITEZ-ALFONSO *et al.*, 2009).

4.11 – Análise de pigmentos

Para a extração de pigmentos fotossintéticos, foram utilizados 4 discos foliares, provenientes de plantas com 4 semanas de idade, somando cerca de 10 cm² de área foliar, correspondente a aproximadamente 200 mg de tecido. Este material foi retirado da região mediana das folhas. Durante a extração, o tecido proveniente de cada tratamento foi cortado em pequenas tiras e acondicionado em tubos de ensaio com tampa, contendo 4 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido).

Estes foram mantidos no escuro por 4 dias em temperatura de 25 °C. Após o quarto dia, foi realizada a leitura em espectrofotômetro do extrato obtido. Foram utilizados o comprimento de onda de 665 nm para clorofila *a* e 649 nm para clorofila *b*. Utilizando-se as equações de Wellburn, 1994, foram estimados os teores de pigmento por área foliar.

$$C_a = 12,19 A_{665} - 3,45 A_{649}$$

$$C_b = 21,99 A_{649} - 5,32 A_{665}$$

4.12 – Análises estatísticas

O teste estatístico utilizado para análise de clorofila foi Anova One Way, seguida de teste Tukey.

V – RESULTADOS

5.1 – Estabelecimento das condições de cultivo de plantas de *A. thaliana* atenuadas para o sistema de defesa

As plantas de *A. thaliana* ecótipo COL-0 (tipo selvagem), três linhagens transgênicas de *AvrPto* (120 T2, 121 T2 e 44-5 T4), linha transgênica *NahG* e mutantes *npr1* e *sid2.2* com quatro semanas de idade, obtidas a partir da otimização do sistema de cultivo conforme descrito anteriormente, apresentaram-se em tamanho e condições fisiológicas adequadas para a inoculação das bactérias visando análise dos níveis de colonização (Figura 5).

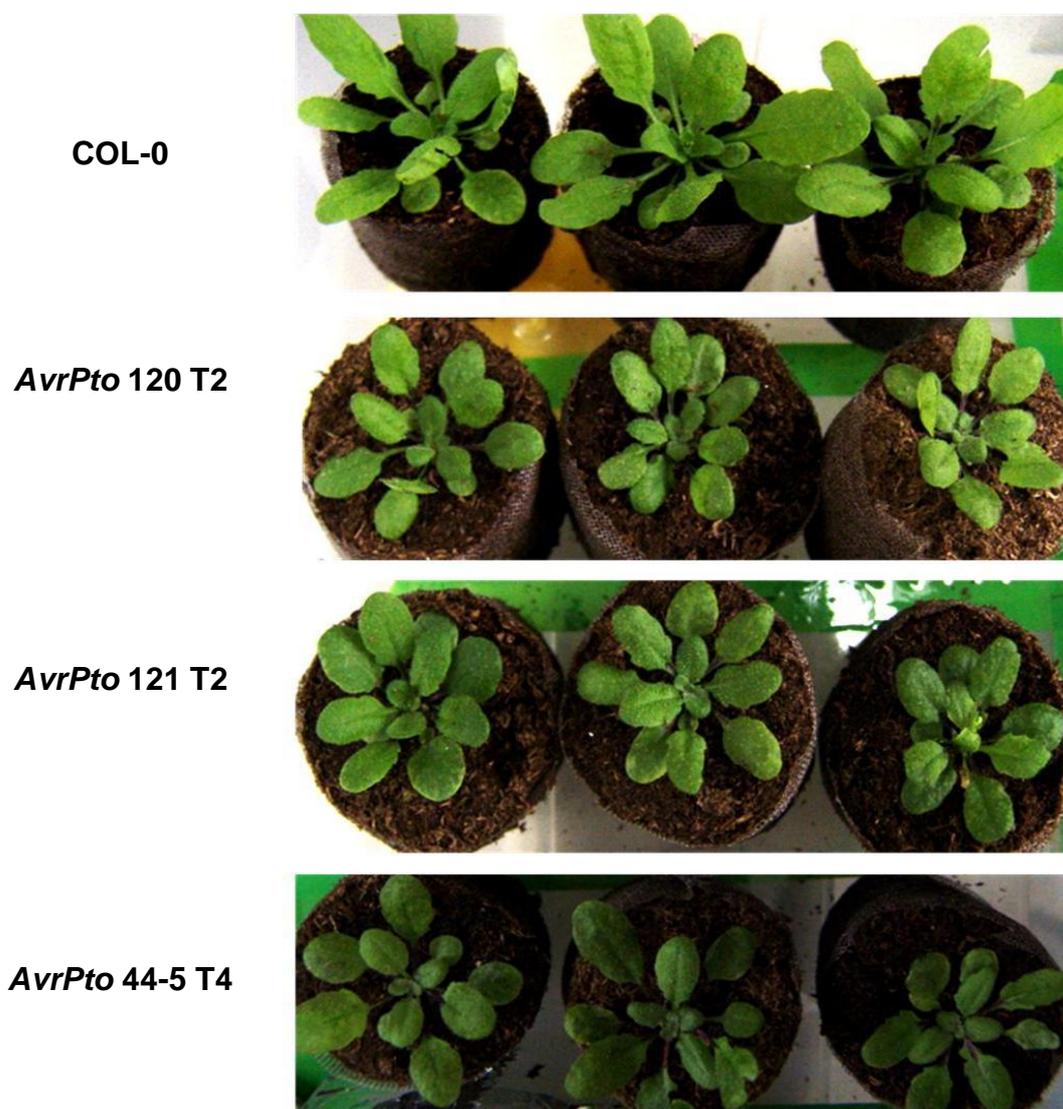


Figura 5: Plantas de *A. thaliana* obtidas para ensaios de colonização por *G. diazotrophicus*.

5.2 – Efeitos da inoculação de *G. diazotrophicus* em *A. thaliana*

Os efeitos iniciais relacionados com o desenvolvimento de sintomas de doença nas folhas, decorrentes da inoculação de bactérias patogênicas e endofíticas, foram analisados em plantas de *A. thaliana* ecótipo COL-0 (controle), três linhagens transgênicas de AvrPto (120 T2, 121 T2 e 44-5 T4) e plantas defectivas para a produção ou percepção de ácido salicílico (linha transgênica *NahG* e mutantes *npr1* e *sid2-2*) inoculadas com o patógeno *P. syringae* DC3000 (Figura 6) e o endófito *G. diazotrophicus* (Figura 7).

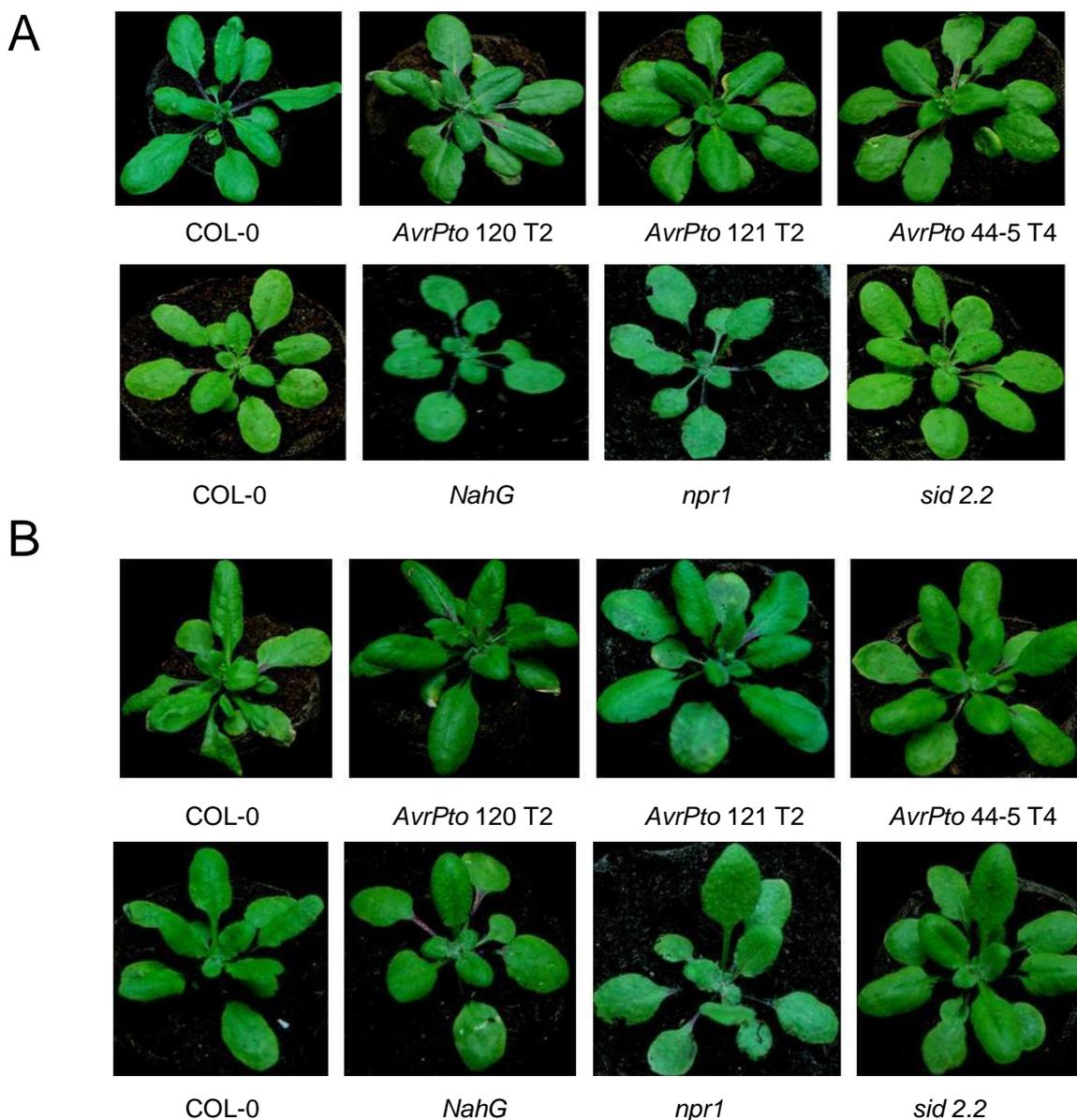


Figura 6: Plantas de *A. thaliana* inoculadas com *P. syringae* DC3000 no primeiro dia (A) e 3 dias depois (B), visando a análise do desenvolvimento de sintomas de doença. Foto ilustrativa de um indivíduo proveniente de um grupo de três amostras.

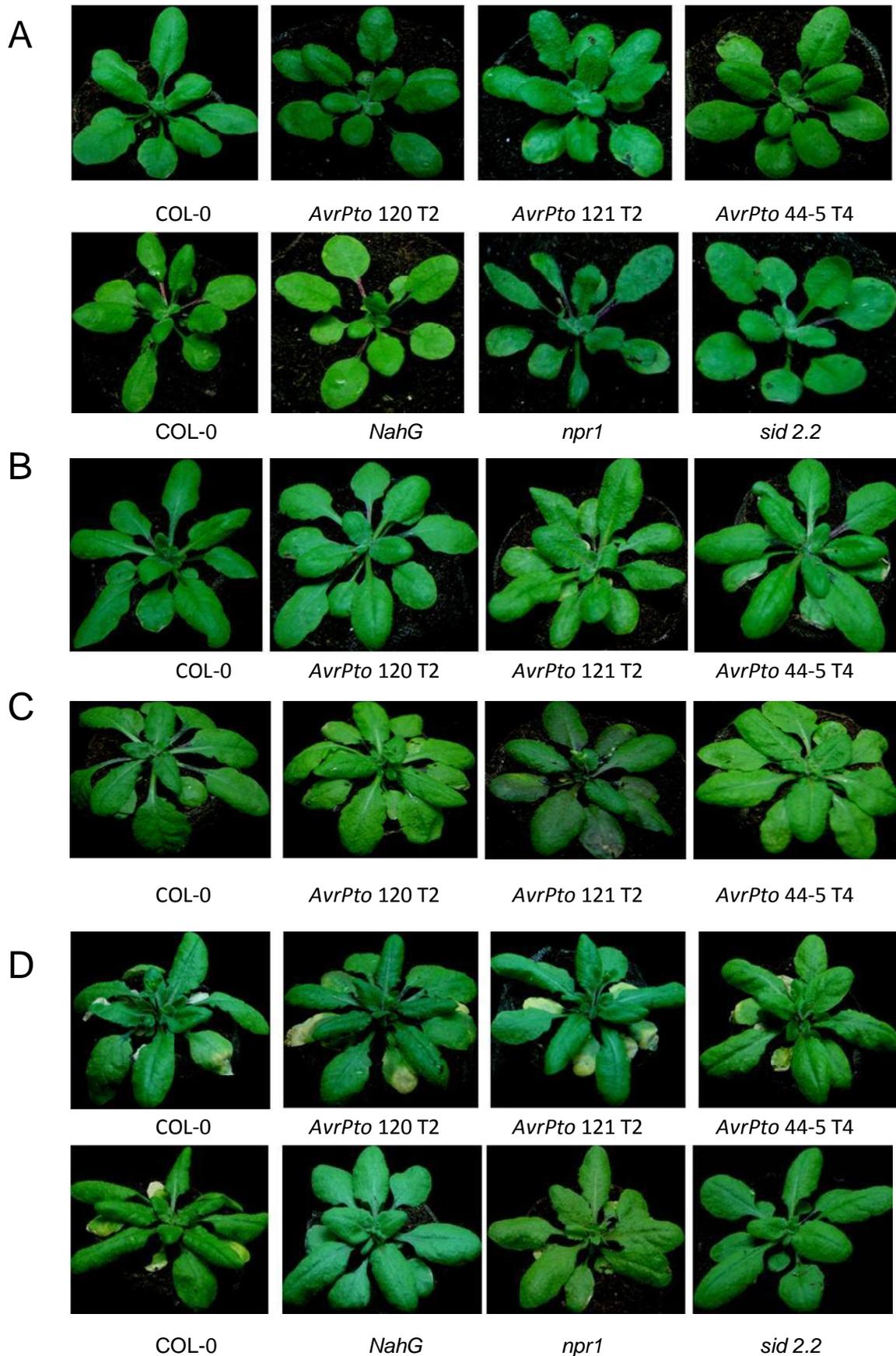


Figura 7: Plantas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus* no primeiro dia (A), 3 dias depois (B), 7 dias depois (C) e 10 dias após o inóculo (D), visando a análise do desenvolvimento de sintomas de doença. Foto ilustrativa de um indivíduo proveniente de um grupo de três amostras.

Plantas inoculadas com *P. syringae* DC3000 e *G. diazotrophicus* não apresentaram sintomas de doença, como necrose ou clorose nos três dias seguintes ao inóculo (Figuras 6B e 7B). Entretanto, sete dias após terem recebido a solução bacteriana as plantas inoculadas com a bactéria patogênica já apresentavam fortes sintomas de doença, conforme mostrado na Figura 8, o que não ocorreu com aquelas que foram inoculadas com o endófito (Figuras 7C e 8).

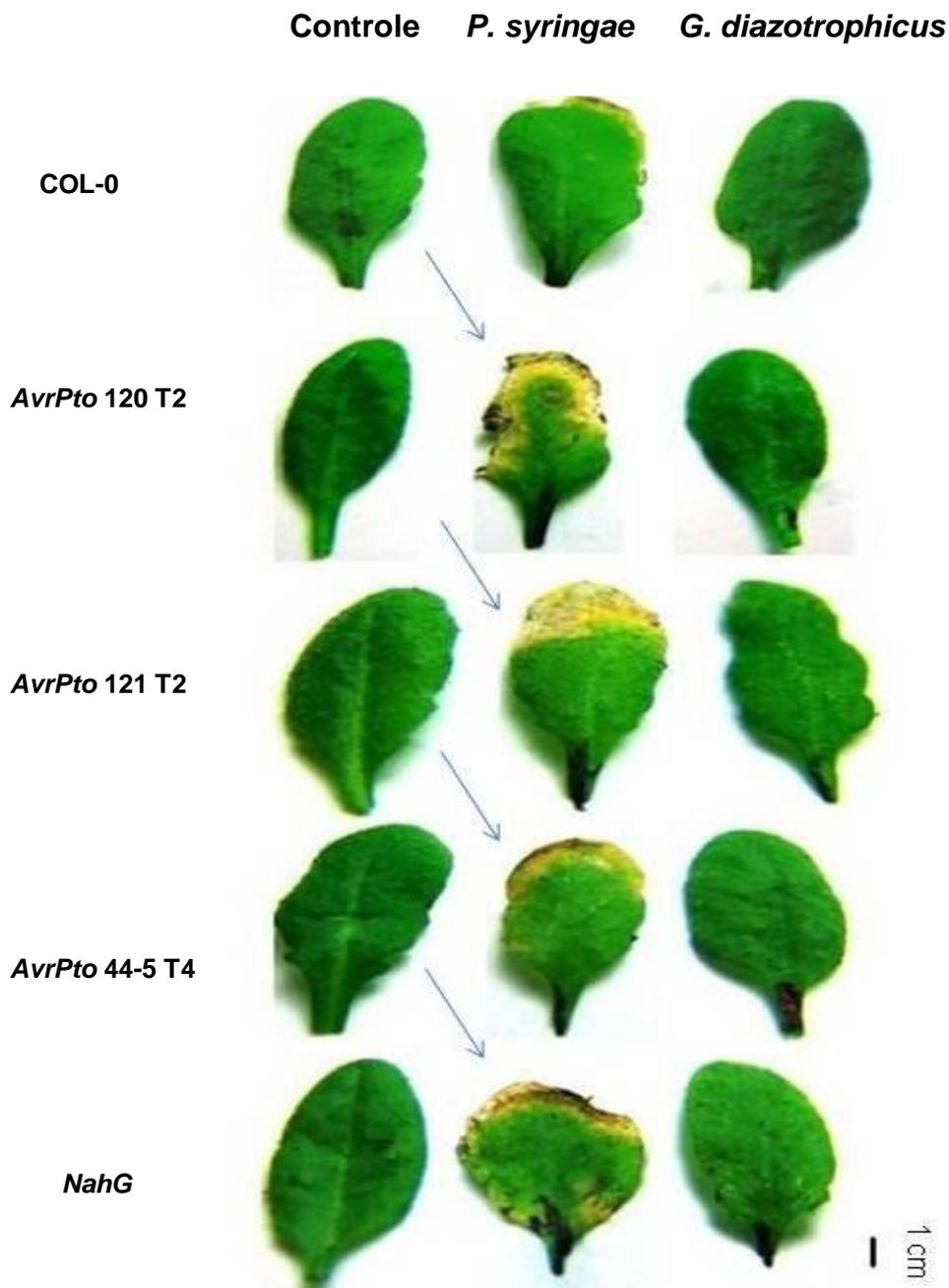


Figura 8: Amostras foliares provenientes de plantas de *A. thaliana* sete dias após terem sido inoculadas com *P. syringae* DC3000 e *G. diazotrophicus*. Foto ilustrativa referente a uma folha representante de um grupo de três amostras para cada tratamento.

Os resultados das figuras 7 e 8 demonstram que, em *A. thaliana*, *G. diazotrophicus* não é capaz de promover sintomas de clorose e morte celular, de maneira rápida, conforme observado para *P. syringae*. O efeito desta bactéria só se tornou evidente dez dias após as plantas terem sido inoculadas (Figura 9). Entretanto, os sintomas de doença nas folhas foram mais brandos nas plantas defectivas para a produção ou percepção de ácido salicílico *NahG*, *npr1* e *sid 2.2*, sugerindo que a repressão da resposta imune sistêmica favorece a colonização por *G. diazotrophicus*. Esse dado também revela que os sintomas observados em Col-0, em resposta à *G. diazotrophicus*, são consequência da ativação dos mecanismos de resposta da planta e não da ação efetiva da bactéria contra os tecidos vegetais.

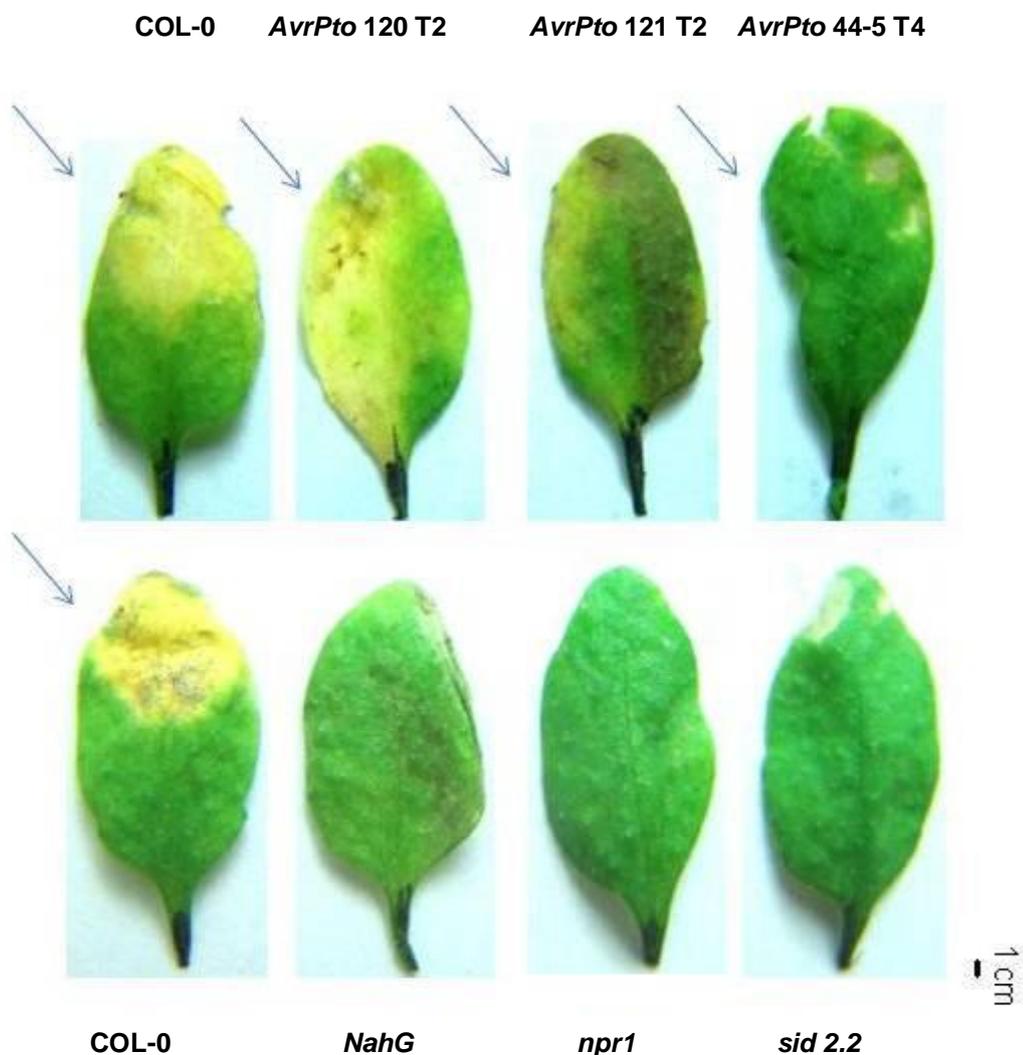


Figura 9: Amostras foliares provenientes de plantas de *A. thaliana* dez dias após terem sido inoculadas com *G. diazotrophicus*. Foto ilustrativa referente a uma folha representante de um grupo de três amostras para cada tratamento.

5.3 – Análise de pigmentos fotossintéticos em folhas inoculadas com *G. diazotrophicus*

Para melhor entender os resultados da figura 9, foram avaliados os teores de clorofila *a* e clorofila *b* em plantas controle e inoculadas com *G. diazotrophicus*. Adicionalmente, foi avaliado o teor de clorofila total (clorofila *a+b*).

Os dados de clorofila *a* mostram que, para a planta do tipo selvagem (COL-0) e as linhagens transgênicas *AvrPto*, a inoculação por *G. diazotrophicus* promoveu forte redução nos níveis do pigmento (Figura 10A). Já a linhagem transgênica *NahG* e os mutantes *npr1* e *sid 2.2* não apresentaram diferença estatística no nível de significância de 5%, entre plantas controle e inoculadas. Isto mostra que, na ausência de ácido salicílico a colonização por *G. diazotrophicus* não induz a degradação de clorofila *a*. Já para clorofila *b*, também houve redução nos níveis deste pigmento nas plantas inoculadas em relação às amostras controle. Neste caso, a diferença foi encontrada tanto nas linhagens transgênicas *AvrPto* e *NahG* quanto nos mutantes *npr1* e *sid 2.2*, além da planta do tipo selvagem (Figura 10B). Entretanto, as plantas incapazes de produzir ou acumular ácido salicílico ainda apresentaram níveis maiores de clorofila *b* que o encontrado nas demais plantas.

Visto que as concentrações de clorofilas foram diferentes entre plantas controle e inoculadas, a relação de clorofila total, também apresentou diferenças entre os dois tratamentos (Figura 11). De acordo com o resultado, o índice de clorofila total foi superior para as amostras controle em relação às inoculadas.

As alterações nos níveis de pigmentos fotossintéticos foram maiores nas plantas do tipo selvagem e transgênicas contendo a proteína *Avrpto*. Plantas incapazes de produzir ou acumular ácido salicílico produziram pouca (clorofila *b*) ou quase nenhuma diferença (clorofila *a*) quanto ao acúmulo de pigmentos em resposta à presença de *G. diazotrophicus* após dez dias. Juntos, estes dados demonstram que a planta responde à colonização por *G. diazotrophicus* gerando sintomas de clorose. Tais mecanismos são dependentes da produção e/ou percepção de ácido salicílico pela planta.

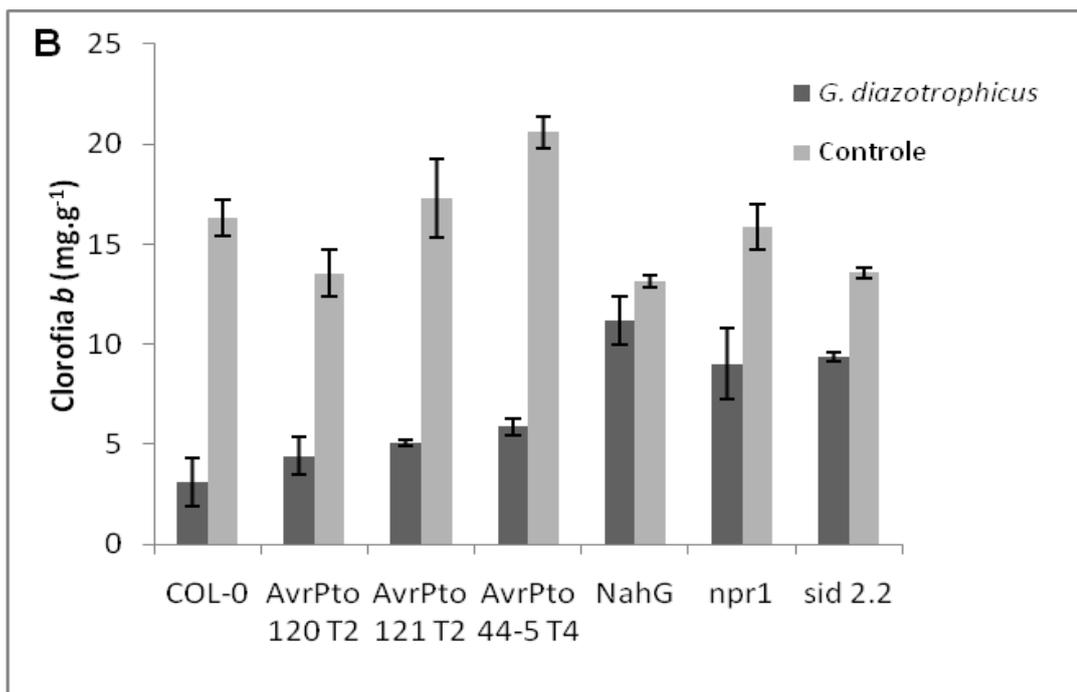
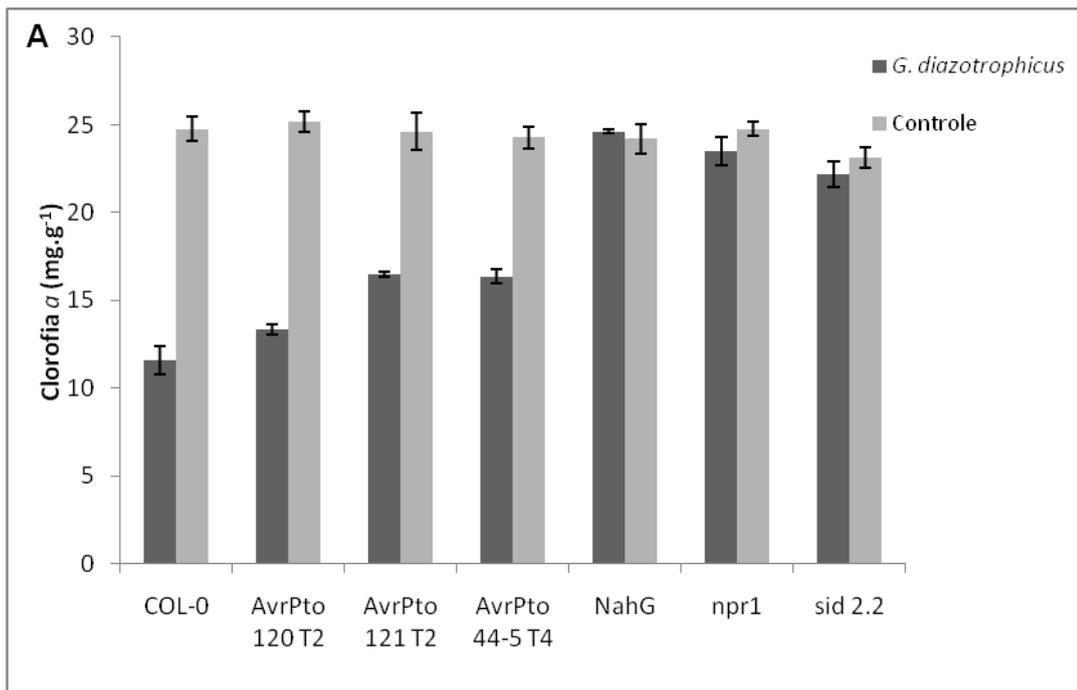


Figura 10: Teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de *A. thaliana* inoculadas e não inoculadas por *G. diazotrophicus*, após dez dias. (A) Teores de clorofila *a*. (B) Teores de clorofila *b*. As barras representam o desvio padrão da média obtida a partir de três folhas independentes, provenientes de uma repetição biológica.

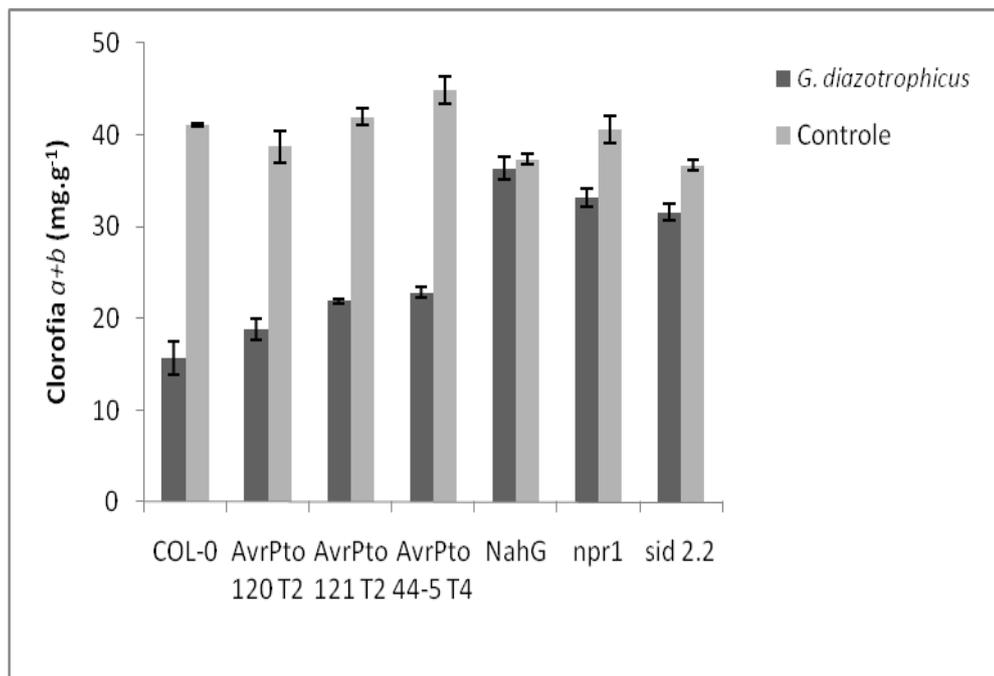


Figura 11: Relação de pigmentos fotossintéticos clorofila *a+b* em plantas de *A. thaliana* inoculadas e não inoculadas por *G. diazotrophicus*, após dez dias. As barras representam o desvio padrão da média obtida a partir de três folhas independentes, provenientes de uma repetição biológica.

5.4 – Análise do acúmulo de calose

A ativação da resposta imune primária devido à colonização das plantas foi analisada em folhas controle (COL-0) e em plantas transgênicas que possuem a resposta de defesa subvertida (Figura 12). Conforme mostrado na figura 12B, *G. diazotrophicus* promove uma forte indução de calose em folhas da planta controle (COL-0) sete dias após a inoculação. Plantas inoculadas com *P. syringae* mostraram níveis de deposição de calose relativamente baixos (Figura 12C).

Quando plantas transgênicas expressando o gene bacteriano AvrPto foram analisadas, não foi observada deposição de calose em resposta a *G. diazotrophicus* e *P. syringae* (Figura 12D-F). Estes resultados indicam que a expressão de AvrPto suprime a resposta vegetal para ambas as bactérias.

Com o objetivo de entender a importância da rota mediada por ácido salicílico para a deposição de calose, plantas transgênicas expressando o gene bacteriano *NahG* foram analisadas. Em tais plantas o acúmulo de ácido salicílico é drasticamente reduzido. De acordo com a Figura 12H, os níveis de deposição de calose em plantas *NahG* inoculadas com *G. diazotrophicus* foram similares àqueles observados nas plantas controle, revelando que, para esta bactéria, tal resposta não é dependente de ácido salicílico. No entanto, plantas *NahG* inoculadas com *P. syringae* (Figura 12I) apresentaram baixo acúmulo de calose em comparação com plantas controle (Figura 12C).

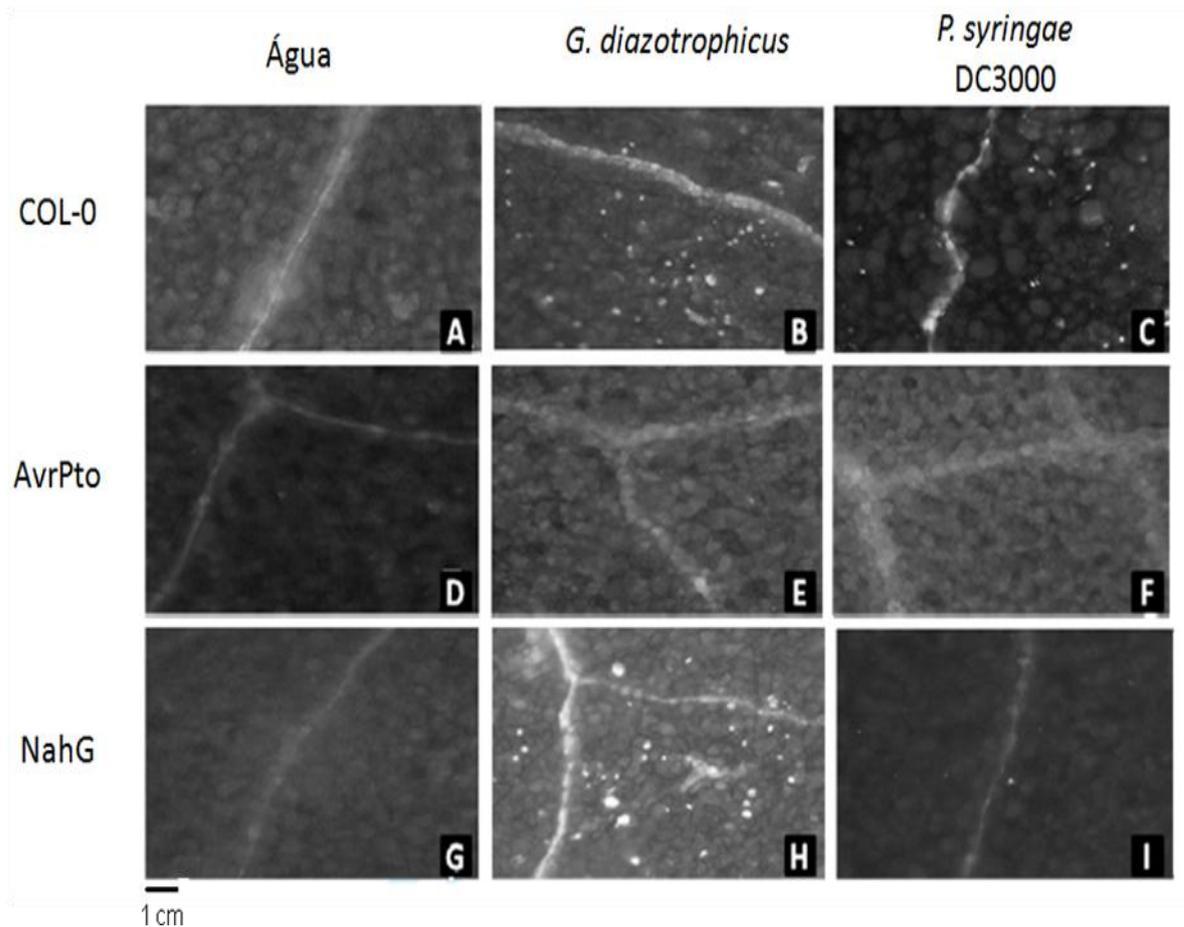


Figura 12: Deposição de calose em folhas de *A. thaliana* inoculadas *G. diazotrophicus* e *P. syringae* DC3000. (A-C): Porções de folha de *A. thaliana* ecótipo COL-0 coradas para deposição de calose após inoculadas com água (A), *G. diazotrophicus* (B), e *P. syringae* DC3000 (C). (D-F): Porções de folhas de planta transgênica de *A. thaliana* expressando a proteína AvrPto coradas para mostrar deposição de calose após inoculação com água (D), *G. diazotrophicus* (E) e *P. syringae* DC3000 (F). (G-I): Porções de folhas de *A. thaliana* transgênicas expressando a proteína NahG, coradas para mostrar deposição de calose após inoculação com água (G), *G. diazotrophicus* (H), e *P. syringae* DC3000 (I).

5.5 – Análise dos níveis de colonização de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus*

A fim de analisar os efeitos da subversão da resposta imune da planta hospedeira nos níveis de colonização por *G. diazotrophicus*, as linhagens transgênicas de *A. thaliana* contendo o gene *AvrPto* inoculadas com este endófito foram comparadas com outras inoculadas com a bactéria patogênica *P. syringae* (Figura 13A e 13B). O resultado mostra que *G. diazotrophicus* tem baixa eficiência de multiplicação nos tecidos da planta controle (COL-0). A população da bactéria nestas plantas permaneceu similar à encontrada nos níveis iniciais cerca de dez dias após a inoculação. Entretanto, nas três linhagens transgênicas de *AvrPto*, a população bacteriana foi fortemente aumentada sete dias após a inoculação. Entre as linhagens transgênicas testadas, a linhagem 44-5 T4 apresentou um alto nível de colonização tanto para *G. diazotrophicus* quanto para *P. syringae* DC3000.

O papel da resposta de defesa mediada por ácido salicílico na colonização de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* também foi estudado nesta etapa. Os mutantes *sid* 2.2 (defectivo para a produção de ácido salicílico induzida por patógenos) e *npr1* (defectivo para a expressão de genes de resistência R, ativada por ácido salicílico) foram testados, além da planta transgênica expressando o gene bacteriano *NahG* (acumula pouco ou nenhum ácido salicílico). Os níveis de multiplicação de *G. diazotrophicus* nestas plantas foram avaliados dez dias após o processo de inoculação (Figura 14A e 14B). Os resultados mostraram que todas as linhagens comprometidas na produção ou acúmulo do hormônio ácido salicílico proveram fortes níveis de colonização em comparação com a planta controle. Aparentemente, a resposta mediada por ácido salicílico é um fator limitante para a multiplicação da bactéria nos tecidos de *A. thaliana*.

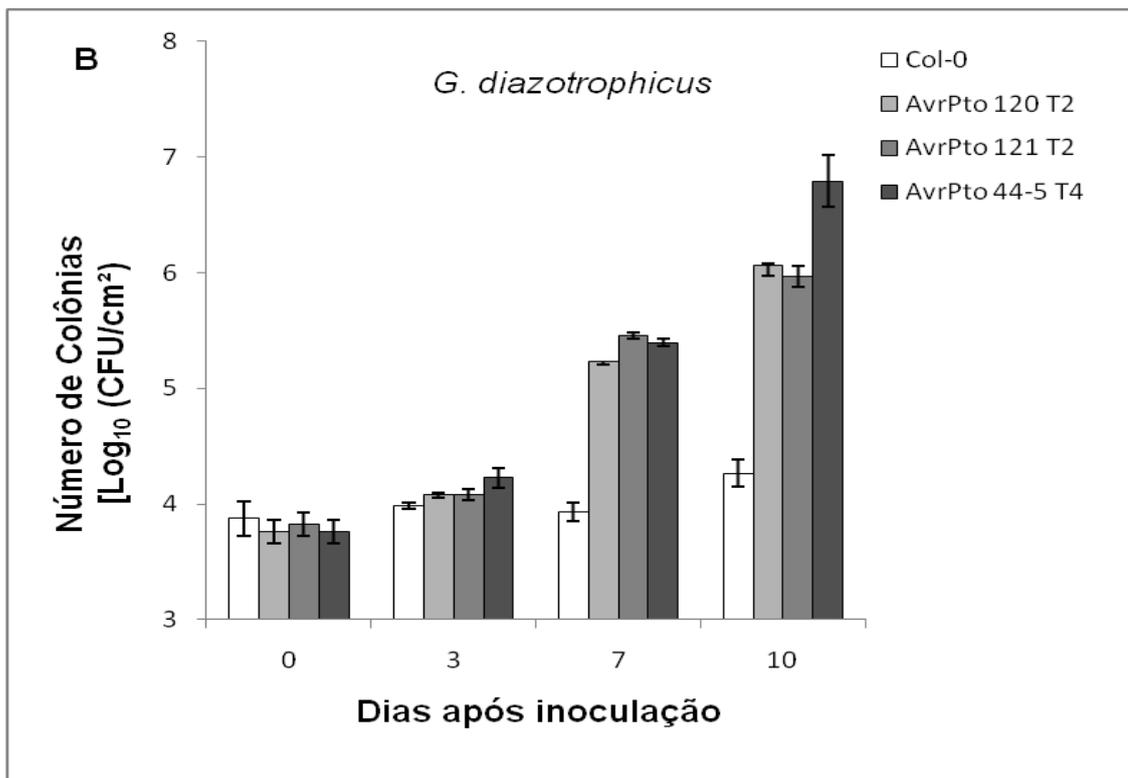
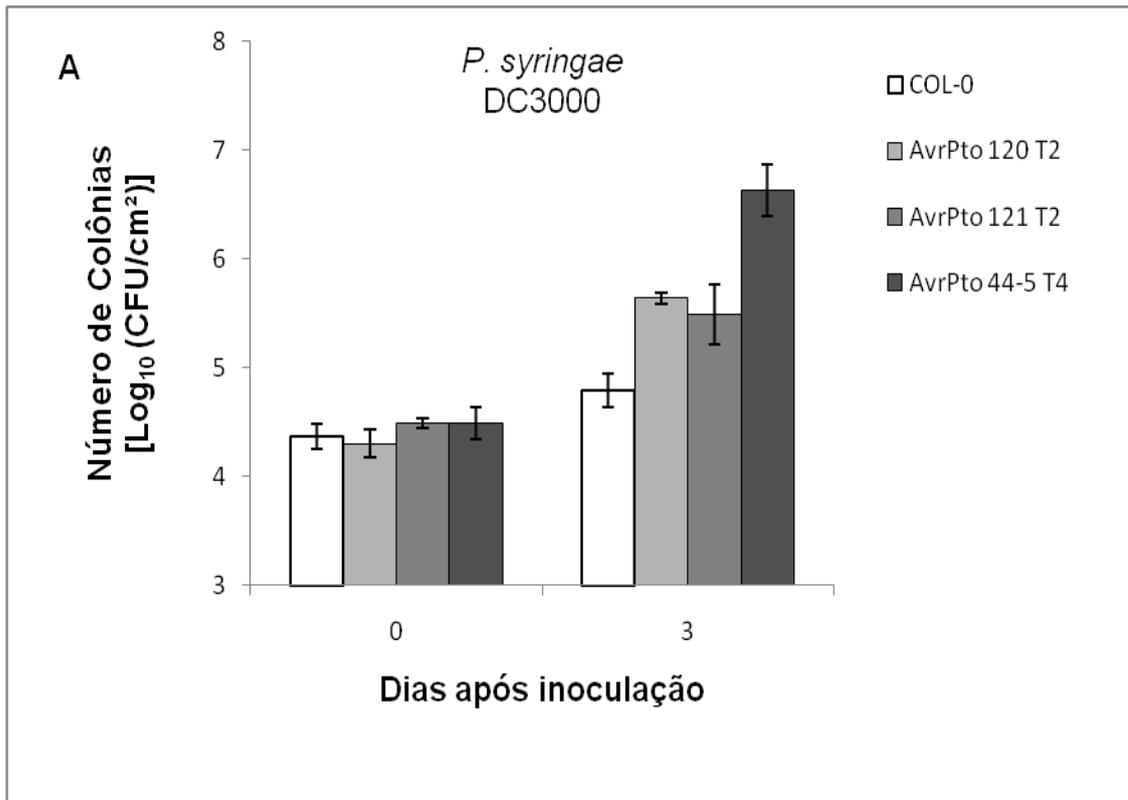


Figura 13: Ensaios de colonização usando *G. diazotrophicus* e *P. syringae* DC3000, em plantas de *A. thaliana* controle e linhagens transgênicas de *AvrPto* (A and B): Plantas controle (COL-0) e linhagens transgênicas de *AvrPto* inoculadas com *P. syringae* DC3000 (A) e *G. diazotrophicus* (B). As barras representam o desvio padrão para unidades formadoras de colônia extraídas a partir de três amostras de discos foliares independentes.

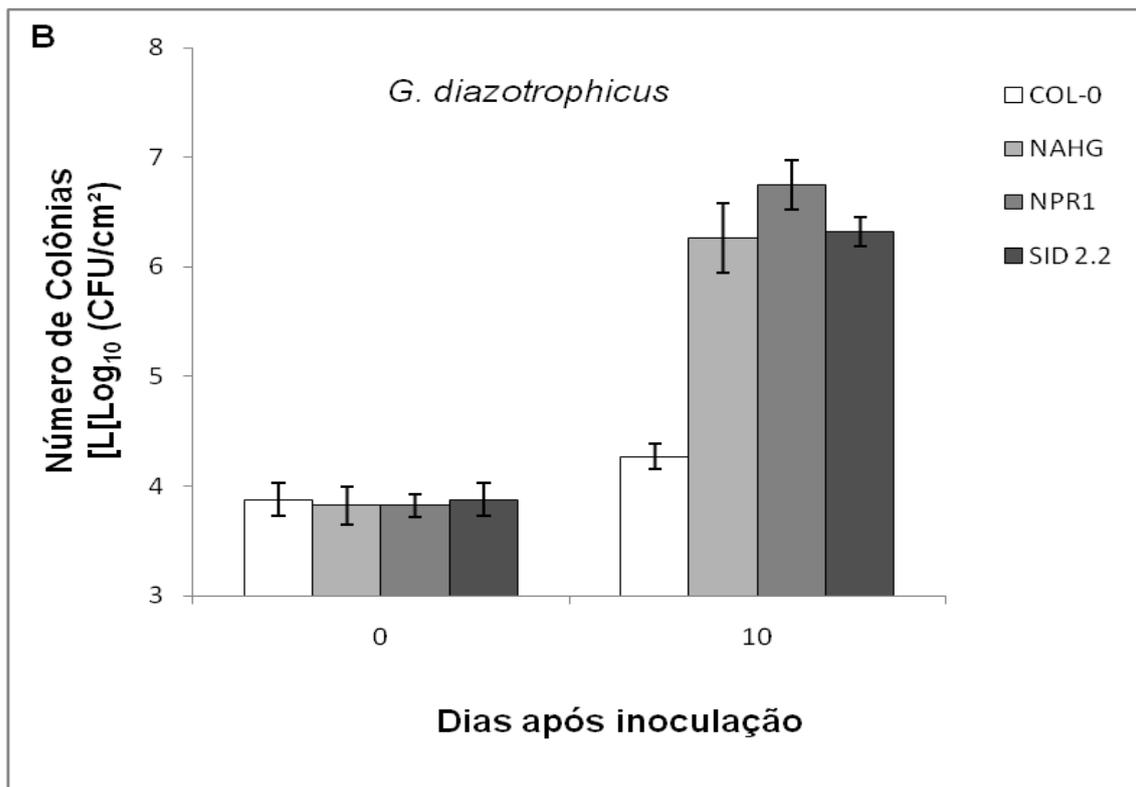
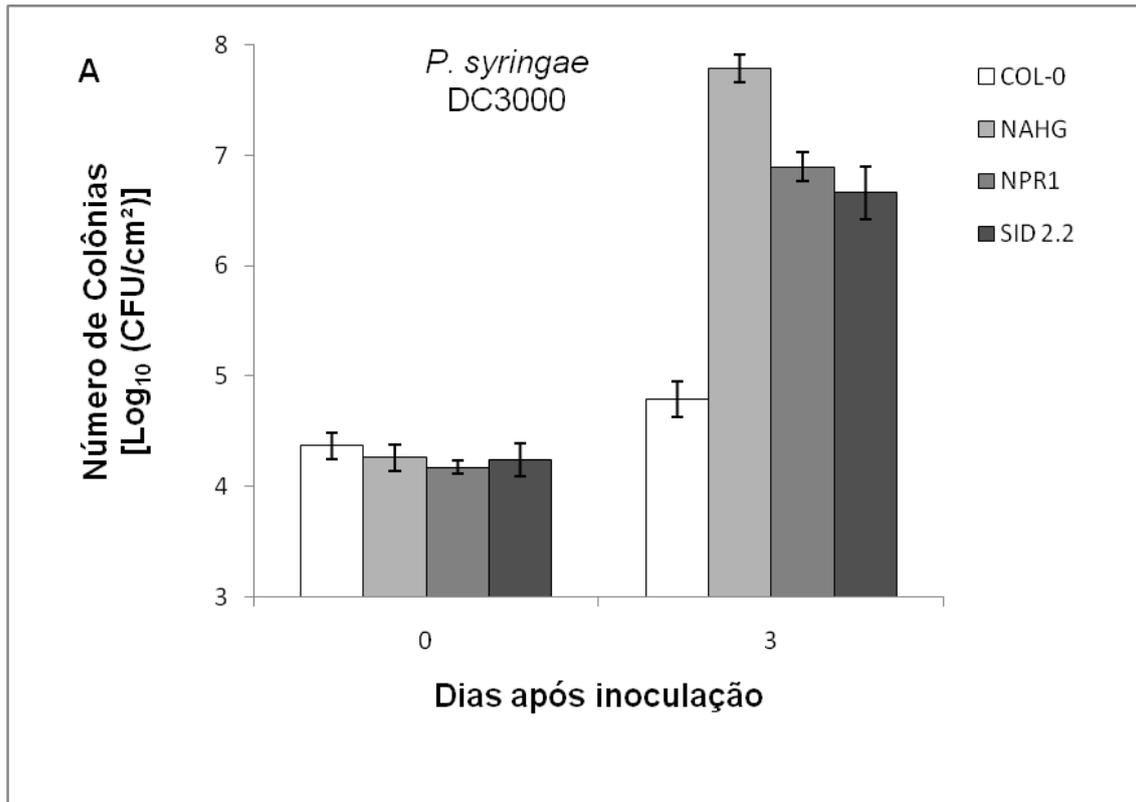


Figura 14: Ensaios de colonização usando *G. diazotrophicus* e *P. syringae* DC3000, em plantas de *A. thaliana* controle, linhagem transgênica *NahG* e mutantes *npr1* e *sid2.2*. (A and B): Plantas controle (COL-0) linhagem transgênica *NahG* e mutantes *npr1* e *sid2.2*., inoculados com *P. syringae* DC3000 (A) e *G. diazotrophicus* (B). As barras representam o desvio padrão para unidades formadoras de colônia extraídas a partir de três amostras de discos foliares independentes.

5.6 – Análise dos níveis de colonização de *A. thaliana* pelos endófitos *H. seropedicae* e *B. brasiliensis*

Os testes de colonização buscando verificar se as plantas de *A. thaliana* atenuadas quanto à resposta de defesa apresentam suscetibilidade aos endófitos *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasiliensis*, além de *G. diazotrophicus*, mostraram que, tanto *H. seropedicae* quanto *B. brasiliensis* são capazes de colonizar linhagens transgênicas e mutantes de *A. thaliana* cuja resposta de defesa inata ou sistêmica tenha sido previamente reprimida (Figura 15A e 15B). Entretanto, dez dias após ter sido feito o inóculo, os níveis de colonização observados foram inferiores aos obtidos para *G. diazotrophicus*.

Para ambas as bactérias, não houve diferença considerável entre as linhagens transgênicas de AvrPto. Entretanto, para as plantas defectivas na capacidade de produzir ou acumular ácido salicílico, o mutante *npr1* pareceu melhor colonizado por *H. seropedicae* (Figura 15A). Já no ensaio utilizando *B. brasiliensis* a linhagem transgênica *NahG* apresentou um nível de colonização superior ao encontrado para *npr1* e *sid 2.2* (Figura 15B).

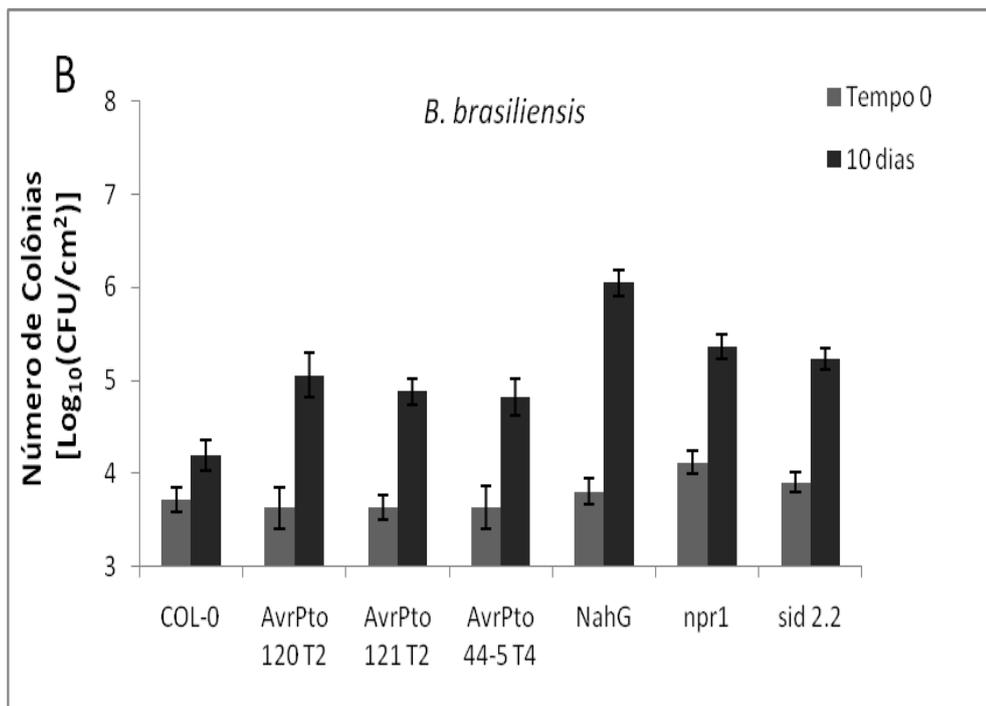
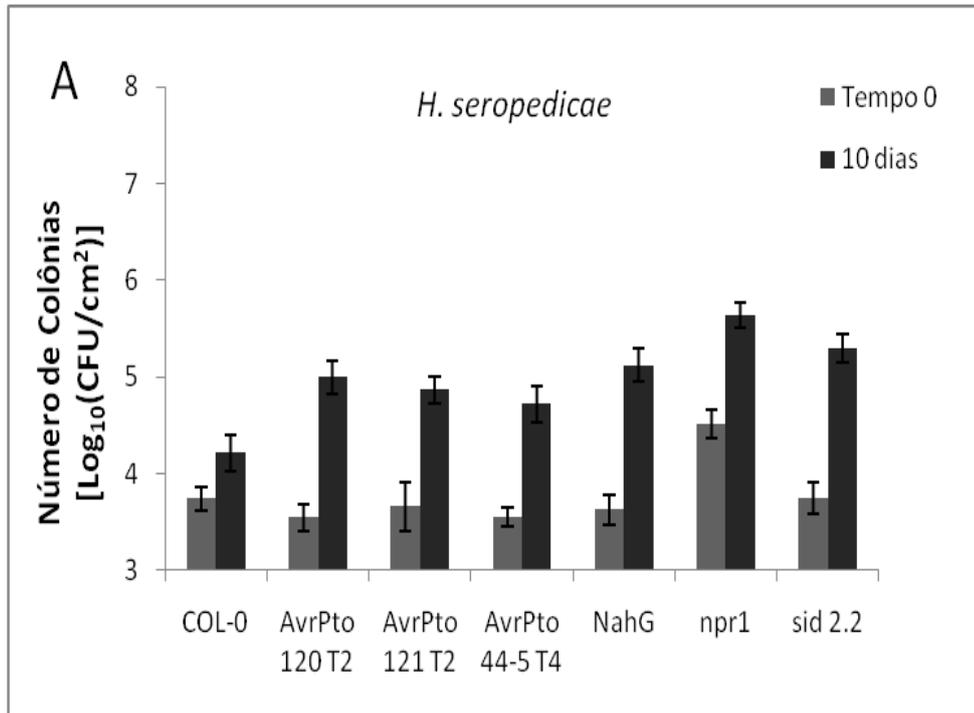


Figura 15: Ensaios de colonização usando *H. seropedicae* e *B. brasiliensis*, em plantas de *A. thaliana* controle, linhagens transgênicas de *AvrPto*, linhagem transgênica *NahG* e mutantes *npr1* e *sid 2.2*, após dez dias. Plantas inoculadas com *H. seropedicae* (A) e *B. brasiliensis* (B). As barras representam o desvio padrão para unidades formadoras de colônia extraídas a partir de três amostras de discos foliares independentes.

VI – DISCUSSÃO

Plantas estão sujeitas ao contato com uma ampla variedade de microrganismos. Para proteger-se, ativam numerosos mecanismos de defesa (GLAZEBROOK, 2005). A primeira fase da percepção de microrganismos pelas plantas envolve a detecção de MAMPs, que desencadeia uma rápida ativação de mecanismos de defesa tais como o reforço da parede celular mediante a deposição de calose (KIM *et al.*, 2005), a indução de vários genes e proteínas de defesa (NAVARRO *et al.*, 2004), além da produção de ROS (NURNBERGER *et al.*, 2004).

Na segunda fase, patógenos dispõem de estratégias que interferem com o sistema imune do hospedeiro (HAUCK *et al.*, 2003, HE *et al.*, 2006, LI *et al.*, 2005, TORRES *et al.*, 2006, ZHANG *et al.*, 2007). O efetor AvrPto, de *P. syringae*, por exemplo, penetra no interior celular para subverter a resposta imune através da ligação a receptores, bloqueando a transmissão de sinais necessários à eficácia da resposta (SHAN *et al.*, 2008). Na terceira fase, as plantas ativam genes de resistência (R), que detectam efetores microbianos e ativam a resposta hipersensitiva (HR). A resistência mediada por genes R está associada com a rota de sinalização por ácido salicílico. Este composto é responsável pela indução de muitas proteínas relacionadas com patogênese (PR).

A descoberta e uso de mutantes ou plantas transgênicas que apresentam distúrbios no sistema de defesa têm provido uma importante contribuição para entendimento acerca de interações planta/microrganismo compatíveis e incompatíveis. O mutante *sid 2.2*, por exemplo, que tem sua habilidade de acúmulo de ácido salicílico reduzida, é mais suscetível à colonização por fungos e bactérias (CHEN *et al.*, 2009). Semelhantemente, o mutante *npr1*, afetado na habilidade de ativar e expressar genes PR em resposta ao ácido salicílico tem sua resistência a microrganismos reduzida (DONG, 2004).

A expressão do gene *avrPto* de *P. syringae* em plantas transgênicas de *A. thaliana* resulta na redução da capacidade de resposta a MAMPs, intensificando a colonização destas plantas por bactérias (HE *et al.*, 2006). Finalmente, a expressão do gene bacteriano *nahg* promove uma forte redução dos níveis de SA endógeno em plantas transgênicas de tabaco e *A. thaliana*, afetando a resistência das mesmas a microrganismos (FRIEDRICH *et al.*, 1995).

Microrganismos benéficos podem induzir uma resposta sistêmica fenotipicamente similar àquela ativada por patógenos, chamada imunidade sistêmica induzida (POZO e AZCON-AGUILAR, 2007). Assim como os PAMPs presentes nos patógenos, microrganismos benéficos contêm MAMPs que são reconhecidos pelas plantas, resultando em uma menor, mas efetiva ativação da resposta imune sistêmica (VAN WEES *et al.*, 2008). Quando o conjunto de mecanismos de defesa desenvolvidos pela planta não é suficiente para conter a invasão de microrganismos patogênicos, estes estabelecem a colonização no interior dos tecidos vegetais, causando sintomas de doença.

Em *A. thaliana*, a colonização por *P. syringae* DC3000 causa sintomas típicos que consistem de necrose ou extensiva clorose cerca de três dias após o inóculo bacteriano na concentração de 10^8 CFU.mL⁻¹ na superfície foliar (WANG *et al.*, 2005). Neste trabalho, as análises mostraram que plantas inoculadas com *P. syringae* DC3000 não apresentaram sintomas de doença como necrose ou clorose nos três dias seguintes ao inóculo (Figuras 6B). Entretanto, em nossos ensaios utilizamos uma concentração de 10^5 CFU.mL⁻¹, visto que tínhamos como objetivo realizar uma análise comparativa de colonização entre *P. syringae* DC3000 e *G. diazotrophicus*. Neste caso, uma concentração muito elevada para a bactéria endofítica poderia causar uma resposta imune forte, impedindo a proliferação bacteriana. Considerando a redução da concentração do inóculo do patógeno feito no tecido foliar de *A. thaliana*, nosso resultado demonstrando que os sintomas de doença são notáveis no sétimo dia está de acordo com o descrito na literatura (Figura 8) (WANG *et al.*, 2005).

Para *G. diazotrophicus* nada se tem descrito acerca dos efeitos relacionados com a resposta imune em *A. thaliana*. De acordo com nossos dados, a manifestação de sintomas de doença pode ser notada a partir do décimo dia após a injeção da solução bacteriana, em plantas selvagem e linhagens transgênicas de *AvrPto*. Já as plantas incapazes de desenvolver uma resposta imune sistêmica baseada na produção e/ou acúmulo de ácido salicílico não mostraram alterações fenotípicas características de doença (Figura 9). Estes resultados sugerem que outras vias, independentes da ativação por MAMP's, participem do disparo desta resposta.

Além disso, foram analisados os teores de pigmentos fotossintéticos de folhas inoculadas com *G. diazotrophicus* após o décimo dia. Os resultados mostraram que plantas inoculadas sofreram redução nos teores de clorofila *a* para linhagens

transgênicas de *AvrPto* e planta selvagem (Figura 10A). Os níveis de clorofila *b* foram reduzidos também nas plantas incapazes de produzir ou acumular ácido salicílico, porém a diferença foi menor em relação ao obtido para a planta selvagem e linhagens transgênicas de *AvrPto* (Figura 10B). Tal dado sugere que após dez dias plantas de *A. thaliana* selvagem e as atenuadas para a resposta imune primária, inoculadas com *G. diazotrophicus*, são afetadas na eficiência fotossintética em decorrência do desenvolvimento de clorose foliar. Também foi evidenciado que a ativação da clorose é dependente das vias de produção/percepção de ácido salicílico.

Análises sobre deposição de calose, feitas em plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, mostraram uma forte resposta. Resultados similares têm sido reportados em estudos buscando avaliar a resposta em plantas de ervilha inoculadas com bactéria endofítica (BENHAMOU *et al*, 1996). Deposição de calose é uma resposta primária ativada pelos MAMPs, tais como flagelina, presentes em microrganismos (LI *et al*, 2005). Baixos níveis de deposição de calose foram observados em plantas controle (COL-0), inoculadas com *P. syringae*. Esta bactéria possui o sistema de secreção tipo III (TTSS), o qual permite a injeção de moléculas efetoras capazes de suprimir a resposta primária de defesa (GÖHRE e ROBATZEK, 2008). Quando plantas transgênicas expressando a proteína *AvrPto* foram utilizadas, nenhuma deposição de calose foi observada para ambas as bactérias testadas. *AvrPto* tem sido descrito como um potente repressor da resposta imune, o qual interrompe a sinalização por múltiplos MAMPs, reprimindo a imunidade vegetal (SHAN *et al*, 2008).

Os testes com a planta transgênica *NahG* mostraram um resultado contrastante para as análises feitas com *G. diazotrophicus* e *P. syringae*. A ausência de deposição de calose em plantas *NahG* inoculadas com *P. syringae* está de acordo com os resultados obtidos por Debroy *et al* (2004), que demonstrou que esta bactéria possui proteínas efetoras capazes de suprimir a deposição de calose dependente de ácido salicílico. Entretanto, plantas *NahG* inoculadas com *G. diazotrophicus* mostraram níveis de deposição de calose similares àqueles observados para o controle, revelando que a imunidade baseada no fortalecimento da parede celular, eliciada por esta bactéria, é independente de ácido salicílico.

Os ensaios de colonização foram feitos em *A. thaliana* de modo a comparar os níveis de colonização obtidos para *G. diazotrophicus* com aqueles relacionados

ao patógeno natural desta espécie vegetal, *Pseudomonas syringae*. Os resultados mostraram que a multiplicação de *G. diazotrophicus* em *A. thaliana* é favorecida nas plantas cuja resposta imune fora previamente subvertida (Figura 12). Em folhas destas plantas um considerável aumento da população bacteriana pode ser observado sete dias após a inoculação. A lenta multiplicação observada para *G. diazotrophicus* em relação a *P. syringae* nestes ensaios está de acordo com o crescimento mais lento desta bactéria em meio de cultura.

Um resultado interessante foi obtido nos ensaios de colonização em plantas transgênicas portando o gene *NahG*. Apesar de essas plantas mostrarem forte deposição de calose em resposta a *G. diazotrophicus* (Figura 12H), altos níveis de multiplicação da bactéria foram observados (Figura 14B). Estes resultados sugerem que o reforço da parede celular provido pela produção e acúmulo de calose não é suficiente para conter o crescimento bacteriano. Além disso, outras respostas mediadas por ácido salicílico atuam na repressão da colonização em plantas selvagem.

Os resultados mostrando que a colonização de plantas de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* aumenta quando a planta hospedeira apresenta a resposta de defesa subvertida trouxeram o interesse de verificar tal hipótese para outros endófitos. Nesse sentido, tais plantas foram testadas quanto à sua capacidade de serem colonizadas pelas bactérias endofíticas *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia brasiliensis*. Assim como para *G. diazotrophicus*, não se tem relatos de estudos acerca de interação entre *A. thaliana* e tais bactérias. Os dados aqui apresentados mostraram que, plantas atenuadas na capacidade de resposta inata ou sistêmica, também são colonizadas pelos endófitos em níveis superiores aos encontrados para a planta selvagem. Entretanto, em comparação com os dados obtidos em testes de colonização de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus*, tais níveis são inferiores. Apesar desta diferença, os dados mostram que *H. seropedicae* e *B. brasiliensis* têm sua capacidade de colonização de plantas de *A. thaliana* favorecida quando a planta hospedeira possui a resposta imune previamente subvertida.

Vários aspectos acerca da interação planta/patógeno têm sido esclarecidos nos anos recentes, mas pouco conhecimento existe sobre a influência da resposta imune concernente à colonização de plantas por endófitos. Juntos, nossos dados mostram que a eficiência de colonização de *Arabidopsis thaliana* por *Gluconacetobacter diazotrophicus* é definida pela ativação do sistema de defesa da

planta.

A identificação de plantas transgênicas ou genótipos mutantes de *A. thaliana*, nos quais ocorre eficiente colonização por esta bactéria, permitirão estudos posteriores acerca dos aspectos moleculares relacionados com a fixação de N₂ e a promoção do crescimento vegetal, em um sistema modelo de fácil manipulação.

VII – CONCLUSÕES

- Plantas de *A. thaliana* incapazes de desenvolver uma resposta imune sistêmica baseada na produção e/ou acúmulo de ácido salicílico não desenvolvem sintomas de doença em decorrência da presença de *G. diazotrophicus* tão severos como ocorre devido à colonização por *P. syringae*.
- A colonização de plantas do tipo selvagem por *G. diazotrophicus* provoca, após dez dias de inoculação, sintomas de doença que incluem forte clorose. A manifestação de tais sintomas é dependente das vias de produção ou percepção de ácido salicílico.
- *G. diazotrophicus* induz deposição de calose em folhas de *A. thaliana*, revelando a ativação da resposta imune inata. Tal resposta, entretanto, é independente de ácido salicílico.
- O reforço da parede celular provido pela produção e acúmulo de calose não é suficiente para conter o crescimento bacteriano em plantas colonizadas por *G. diazotrophicus*.
- A multiplicação de *G. diazotrophicus* em *A. thaliana* é favorecida nas plantas cuja resposta imune fora previamente subvertida.
- *H. seropedicae* e *B. brasiliensis* também têm sua capacidade de colonização de plantas de *A. thaliana* favorecida quando a planta hospedeira possui a resposta imune previamente subvertida.

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVITCH, R.B.; ANDERSON, J.C.; MARTIN, G.B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 601–11. 2006.
- AKEDA, Y.; GALAN, J.E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. **Nature**, v. 437, p. 911–915. 2005.
- AMALRAJ, V. A.; BALASUNDARAM, N. On the taxonomy of the members of “Saccharum complex”. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 35 - 41. 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 373–99. 2004.
- ARENCIBIA, A. D.; VINAGRE, F.; ESTEVEZ, Y.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CAVALCANTI, J.; SANTANA, I.; HEMERLY, A. S. *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicitate a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signaling and Behavior**, v. 1, p. 265-273. 2006.
- ARRUDA, P. Sugarcane transcriptome: A landmark in plant genomics in the tropics. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p. 1-4. 2001.
- 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. **Tese** (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 238. 1996.
- BALDANI J. I.; CARUSO L.; BALDANI, V. L.; GOE S. R.; DÖBEREINER J. Recents advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 516, p. 911-922. 1997.

- BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V. BARALDI, R.; BOTTINI, R.
Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7-11. 1998.
- BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**. Kluwer academic publishers. 2000.
- BELKHADIR, Y.; NIMCHUK, Z.; HUBERT, D.A.; MACKEY, D.; DANGL, J.L.
Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of theNDR1signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. **The Plant Cell**, v. 16, p. 2822–35. 2004.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALLMAN, A.; TUZUN, S. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, v. 112, p. 3919-929. 1996.
- BENITEZ-ALFONSO, Y.; CILIA, M.; ROMANA, A. S.; THOMAS, C.; MAULE, A.; HEARNA, S.; JACKSONA, D. Control of *Arabidopsis* meristem development by thioredoxin-dependent regulation bof intercellular transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 3615–3620. 2009.
- BENT, A. F.; KUNKEL, B. N.; DAHLBECK, D.; BROWN, K. L.; SCHMIDT, R.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J.; STASKAWICZ, B. J. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science**, v. 265, p. 1856. 1994.
- BIRCH R. G.; BOWER, R.; ELLIOT, A.; HANSOM, S.; BASNAYAKE, S.; ZHANG, L.
Regulation of transgene expression: Progress towards practical development in sugarcane, and implications for others species. **Plant Genetic Engineering towards the Third Millennium**. p. 118-125. 2000.

- BLUME, B.; NÜRNBERGER, T.; NASS, N.; SCHEEL, D. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1425–40. 2000.
- BOCADO, M. R. Efeitos de fontes e doses de nitrogênio, aplicadas nas formas fluida e sólida, em soqueiras de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Tese** (Mestrado em Agronomia – Fitotecnia). Lavras – MG, UFLA, p. 50. 1998.
- BODDEY R.M.; POLIDORO J. C.; RESENDE A. S.; ALVES B. J. R.; URQUIAGA S. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 889–905. 2001.
- BODDEY, M. R.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149. 2003.
- BOLLER, T., FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**, v. 125, 749–760. 2006.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 379-406. 2009.
- BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545–580. 2005.
- BUTTNER, D. BONAS, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 193–200. 2006.

- CAO, H.; GLAZEBROOK, J.; CLARK, J.D.; VOLKO, S.; DONG, X. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. **Cell**, v. 88, p. 57–64. 1997.
- CAVALCANTE, J. J. V.; VARGAS, C.; NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; SCHWARCZ, K.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G; HEMERLY, A. S. Members of the ethylene signaling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 673–686, 2007.
- CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31. 1988.
- CHANG, C.; KWOK, S. F.; BLEECKER, A. B.; MEYEROWITZ, E. M. *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. **Science**, v. 262, p. 539-544. 1993.
- CHANG, J.H.; URBACH, J.M.; LAW, T.F.; ARNOLD, L.W.; HU, A. A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 2549–54. 2005.
- CHEN, H.; XUE, L.; CHINTAMANANI, S.; GERMAIN, H.; LIN, H.; CUI, H.; CAI, R.; ZUO, J.; TANG, X.; LI, X.; GUO, H.; ZHOU, J. Ethylene insensitive3 and ethylene insensitive3-like1 repress *salicylic acid induction deficient2* expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, p. 2527-2540. 2009.
- CHINCHILLA, D., ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., KEMMERLING, B., NURNBERGER, T., JONES, J.D., FELIX, G., BOLLER, T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. **Nature**, v. 448, p. 497–500. 2007.

- CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B. J. Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, p. 803 – 814. 2006.
- COCKING, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, v. 252, p. 169 – 175. 2003.
- COCKING, E. C.; DAVEYMR, K. S. L.; SRIVASTAVA, J. S.; JING, Y., RIDGE, R. W.; ROLFE, B. G. Altering the specificity control of the interaction between rhizobia and plants. **Symbiosis**, v. 14, p. 123 – 130. 1992.
- COHJO, E. H., REIS, V. M., SCHENBERG, A. C., DOBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture **FEMS Microbiology Letters**, v. 106, p. 23–31. 1993.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Revista de Acompanhamento da Safra Brasileira**, p. 5. 2009.
- CONRATH, U. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.19, p. 1062–1071. 2006.
- CUI, H.; XIANG, T.; ZHOU, T. Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. **Cellular Microbiology**, v. 11, p. 1453–1461. 2009.
- DARDICK C, RONALD P. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. **PLoS Pathogens**, v. 2, p. 14–28. 2006.
- DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors—a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 243–75. 1984.

- DAY, B., DAHLBECK, D., HUANG, J., CHISHOLM, S.T., LI, D., STASKAWICZ, B.J. Molecular basis for the RIN4 negative regulation of RPS2 disease resistance. **The Plant Cell**, v. 17, p. 1292–1305. 2005.
- DEBROY, S.; THILMONEY, R.; KWACK, Y.B.; NOMURA, K.; HE, S.Y. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 9927–9932. 2004.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 621-31, 2004.
- DONG, X. *NPR1*, all things considered. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 547–552. 2004.
- 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. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1139 – 1147. 1994.
- DOUGLAS, A. **Symbiotic Interactions**. Oxford University Press. 1994.
- DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 185–209. 2004.
- ENGELHARD, M., HUREK, T., AND REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, v. 2, p. 131 – 141. 2001.
- ENRÍQUEZ-OBREGÓN, G. A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I.; PRIETO-SAMSONOV, D. L.; DE LA RIVA, G. A.; SELMAN-HOUSEIN, G. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, v. 206, p. 20 – 27. 1998.

- FELIX, G., DURAN, J.D., VOLKO, S., BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **Plant Journal**, v. 18, p. 265–276. 1999.
- FIGUEIREDO, P. A. M. Efeitos da vizinhança e de sua complementação nitrogenada e biológica no palhão, no solo e na cana-de-açúcar. **Tese** (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia). Lavras – MG, UFLA, p. 77. 2000.
- FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A Biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 68 - 74, 1994.
- FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; GAFFNEY, T.; MORSE, A.; RYALS, J. Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. **Plant Molecular Biology**, v. 5, p. 959–968. 1995.
- FUENTES-RAMIREZ L. E.; JIMENEZ-SALGADO T.; ABARCA-OCAMPO I. R.; CABALLERO-MELLADO J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145-150. 1993.
- GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemically acquired resistance. **Science**, v. 261, p. 754. 1993
- GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 205-227. 2005.
- GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 189 – 215. 2008.

- GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. **Molecular Cell**, v. 5, p. 1003–1011. 2000.
- HAUCK, P.; THILMONY, R.; HE, S.Y. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 8577–82. 2003.
- HE, P.; SHAN, L. ; LIN, N.; MARTIN, G. B.; KEMMERLING, B.; NÜRNBERGER, T. SHEEN, J. Specific Bacterial Suppressors of MAMP Signaling Upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* Innate Immunity. **Cell**, v. 125, p. 563–575. 2006.
- HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 1462-5822. 2007.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.** v. 347, p.36-39. 1938.
- HUCKELHOVEN, R. Cell wall associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 101-127. 2007.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. www.ibge.gov.br/ safra 2009.
- INTORNE, A. C.; de OLIVEIRA, M. V. V.; LIMA, M. L.; da SILVA, J. F. OLIVARES, F. L.; de SOUZA FILHO, G. A. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Archives of Microbiology**, v. 191, p. 477–483. 2009.
- JAGLO-OTTOSEN, K. R.; GILMOUR, S. J.; ZARKA, D. G.; SCHABENBERGER, O.; THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis* CBF1 Overexpression Induces COR Genes and Enhances Freezing Tolerance. **Science**, v. 280, p. 104. 1998.

- JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugarcane by nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 757 – 766. 1994.
- JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arábica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3676 – 3683. 1997.
- JONES, J.D., DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329. 2006.
- JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. **Nature reviews microbiology**, v. 5, p. 619 – 633. 2007.
- JUNQUEIRA, E. D. *Jornal da Cana*
<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/HistoriadoSetor.asp>, Setembro, 2006.
- KAUFMANN, S. H. E.; MEDZIHITOV, R.; GORDON, S. The innate immune response to infection. **American Society for Microbiology Press**, v. 21, p. 131-137. 2004.
- KIM, H.S.; DESVEAUX, D.; SINGER, A.U.; PATEL, P.; SONDEK, J.; DANGL, J.L. The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, p. 6496–501. 2005.
- KIM, M.; DA CUNHA, L.; MCFALL, A.; BELKHADIR, Y.; DEBROY, S.; DANGL, J.; MACKEY, D. Two Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 121, p. 749-759, 2005.

- KIM, Y.J., LIN, N.C., MARTIN, G.B. Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. **Cell**, v. 109, p. 589–598. 2002.
- KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 1219 – 1232. 1992.
- KNEIP, C.; LOCKHART, P.; VOß, C.; MAIER, U. Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 1 – 12. 2007.
- KNISKERN, J.M.; TRAW, M.B.; BERGELSON, J. Salicylic acid and jasmonic acid signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 20, p. 1512–22. 2007.
- LAMBAIS, M. R. *In silico* differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 103–111. 2001.
- LI, J.; NAGPAL P.; VITART, V.; MCMORRIS, T. C.; CHORY, J. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. **Science**, v. 272, p. 398. 1996.
- MACKEY, D., HOLT, B.F., WIIG, A., DANGL, J.L. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 108, p. 743–754. 2002.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; HARI, K.; SARAVANAN, V.S. Influence of pesticides on the growth rate and plant growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticide Biochemistry**, v. 84, p.143–154. 2006.

- MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; JÚNIOR, G. B. M. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 295 – 301. 2001.
- MCNELLIS, T.W.; MUDGETT, M.B.; LI, K.; AOYAMA, T.; HORVATH, D.; CHUA, N.H.; STASKAWICZ, B.J. Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *The Plant Journal*, v 14, p. 247–257. 1998.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v. 91, p. 295-298. 2001.
- MEDZHITOV. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 135–145. 2001.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 496–501. 2006.
- MEINKE, D. W. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. **Science**, v. 282, p. 662. 1998.
- MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v. 126, p. 969-980. 2006.
- MEYEROWITZ, E. M.; SOMERVILLE, C. R. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor **Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**. 1994.
- MITHÖFER. A. Suppression of plant defence in rhizobia–legume symbiosis. **Trends in Plant Science**. v. 7, p.1 - 10. 2002.

- MUTHUKUMARASAMY, R., CLEENWERCK, I., REVATHI, G., VADIVELU, M., JANSSENS, D., HOSTE, B., GUM, K.U., PARK, K.D., SON, C.Y., CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systems Applied Microbiology**, v. 28, p. 277–286. 2005.
- MYSORE, K.S, RYU, C. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 97-104. 2004.
- NAVARRO, L.; ZIPFEL, C.; ROWLAND, O.; KELLER, I.; ROBATZEK, S.; ROBATZEK, S.; BOLLER, T.; JONES, J.D. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1113–1128. 2004
- NIEBEL, F. C.; LESCURE, N.; CULLIMORE, J. V.; GAMAS, P. The *Medicago truncatula* MtAnn1 Gene Encoding an Annexin Is Induced by Nod Factors and During the Symbiotic Interaction with *Rhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 6, p. 504 - 513. 1998.
- NIMCHUK, Z.; EULGEM, T.; HOLT, B.F.; DANGL, J.L. Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetic**, v. 37, p. 579–609. 2003.
- NOGUEIRA, E.M., VINAGRE, F., MASUDA, H.P, VARGAS, C., PÁDUA, V.L.M., SILVA, F.R., SANTOS, R.V., BALDANI, J.I., FERREIRA, P.C.G., AND HEMERLY, A.S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 199-206. 2001.
- NOMURA, K.; MELOTTO, M.; HE, S.Y. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 361-8. 2005.

- NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, p. 335–345. 2005.
- NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F.; KEMMERLING, B.; PIATER, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249–266. 2004.
- OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L. D., REIS, V. M., BALDANI, J. I., AND DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p.197-200. 1996.
- PECK, S.C.; NÜHSE, T.S.; HESS, D.; IGLESIAS, A.; MEINS, F.; BOLLER, T. Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. **The Plant Cell**, v. 13, p. 1467–75. 2001.
- PEDLEY, K.F., MARTIN, G.B. Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 215–243. 2003.
- PEDRAZA, R. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 25–35. 2008.
- PHILLIPS, D. A.; TORREY, J. G. Studies on cytokinin production by *Rhizobium*. **Plant Physiology**, v. 49, p. 11 – 15. 1972.
- PIETERSE, C. M. J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S. C. M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature**, v. 5, p. 308-316. 2009.
- PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is

independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1225-1237. 1996.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P. J.; VAN LOON, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 10, p.1571–1580. 1998.

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 *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 345-351. 2002.

POZO, M.J.; AZCON-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 393–398. 2007.

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

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 139–144. 1998.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiol and Biotechnology*, v 10, p. 401–405. 1994.

REMHOLD-HUREK, B.; FENDRIK, T. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 520 - 526. 1986.

- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 19, p. 827–837. 2006.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VITOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16. 1986.
- RYAN, C.A.; HUFFAKER, A.; YAMAGUCHI, Y. New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. **Cellular Microbiology**, [v. 9](#), p. 1902-8. 2007.
- SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 130 – 140. 2007.
- SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, v. 66, p. 1794-1798. 2007b.
- SARAVANAN, V. S.; SUBRAMONIAM, S. R.; RAJ, S. A. Assessing *in vitro* solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (ZSB) isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 121-125. 2003.
- SEVILLA M.; BURRIS R. H.; GUNAPALA N.; KENNEDY C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif- mutant strains. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 14, p. 358-366. 2001.
- SHAN, L.; HE, P.; SHEEN, J. Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. **Cell Host Microbe**, v. 1, p. 167–174. 2008.
- SPANU, P.; GROSSKOPF, D.G.; FELIX, G.; BOLLER, T. The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate synthase in tomato cells is regulated by

protein phosphorylation and dephosphorylation. **Plant Physiology**, v. 106, p. 529–35. 1994.

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

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; YADAV, R.L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 155-162. 2005.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3° ed., Porto Alegre: Artemed, 2004.

TORRES, M. A.; JONATHAN, D. G.; DANGL, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiology**, v. 141, p. 373–378. 2006.

TSUDA, K., SATO, M., GLAZEBROOK, J., COHEN, J.D.; KATAGIRI, F. Interplay between MAMP triggered and SA-mediated defense responses. **Plant Journal**, v. 53, p. 763–775. 2008.

VAN WEES, S.C.M.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C.M.J. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 443–448. 2008.

VARGAS, C.; PÁDUA, V. L. M.; NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; SILVA, F. R.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Signalling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. **Symbiosis**, v. 35, p. 159 – 180. 2003.

- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141. 2001.
- VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; MORSE, A.; REIST, R.; KOLDITZ-JAWHAR, R.; WARD, E.; UKNES, S.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. **The Plant Cell**, v. 6, p. 959-965. 1994.
- VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E.M.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.; HEMERLY, A.S. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant–N₂-fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 559-69. 2006.
- WANG, Y.; OHARA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 18, p. 385–396. 2005.
- WEBER, O. B., BALDANI, V. L. D., TEIXEIRA, K. R. S., KIRCHHOF, G., BALDANI, J. I., AND DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, p.103-113. 1999.
- WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B. R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 137-144. 2001.
- WILDERMUTH, M.C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F.M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, p. 562–565. 2001.

ZIPFEL, C., KUNZE, G., CHINCHILLA, D., CANIARD, A., JONES, J.D.G., BOLLER, T., FELIX, G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. **Cell**, v. 125, 749–760. 2006.

ZIPFEL, C., ROBATZEK, S., NAVARRO, L., OAKELEY, E.J., JONES J.D.G. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature**, v. 428, p. 764–67. 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)