



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

DEMETRIOS JOSÉ DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA

**ANÁLISE METABOLÔMICA E DE METABÓLITOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM
PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM ASSOCIAÇÃO COM MICRORGANISMOS
DIAZOTRÓFICOS**

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL

MACEIÓ
2015

DEMETRIOS JOSÉ DE ALBUQUERQUE

**ANÁLISE METABOLÔMICA E DE METABÓLITOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM
PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM ASSOCIAÇÃO COM MICRORGANISMOS
DIAZOTRÓFICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química e Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia. Subárea: Produtos Naturais -Ecologia Química

Orientador: Dr. Alessandro Riffel

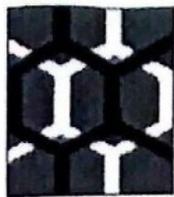
MACEIÓ
2015

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- O48a Oliveira, Demétrios José de Albuquerque.
Análise metabolômica e de metabólitos orgânicos voláteis em plantas de cana-de-açúcar em associação com microrganismos diazotróficos / José Anderson Silva de Freitas. – 2016.
101 f. : il., graf., tabs.
- Orientador: Alessandro Riffel.
Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.
- Bibliografia: f. 90-101.
1. Rizobactéria promotora do crescimento de plantas (RPCP).
2. Metabolômica. 3. Compostos orgânicos voláteis (COVs). 4. Aromáticos.
5. *Diatraea saccharalis*. I. Título.

CDU: 547-3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A C. Sinões
 Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
 57072-970, Maceió-AL, Brasil
 Fone/Fax: (82) 3214-1144
 email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **Demétrios José de Albuquerque Oliveira**, intitulada: “**Análise Metabolômica Preliminar de Plantas de Cana-de-Açúcar em Associação com Microrganismos Diazotróficos e sua Influência na Herbivoria por *Diatraea Saccharalis***”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 06 de novembro de 2015, às 09h, na Sala de Reuniões do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alessandro Riffel
 Orientador (PPGQB/EMBRAPA)

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
 Coorientador (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Luis Carlos Caetano
 (IQB/UFAL)

Prof.ª Dr.ª Jaqueline-Maria dos Santos
 (UFAL)

Ao meu Pai George Mascarenhas de Oliveira e à minha mãe Maria José de Albuquerque Oliveira, à minha namorada Thamires Santos e aos meus irmãos Diego, Denisson Davi e Mayra por acreditarem no meu sonho, pela compreensão, carinho e por se fazerem presentes em todos os momentos de dificuldade e alegria.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me guiado, me protegido e ter colocado pessoas iluminadas na minha vida. (Deus é a luz do meu Caminho).

Ao Professor Dr. Antonio Euzébio Goulart Santana e ao Dr. Alessandro Riffel pela orientação, paciência, incentivo, oportunidades e ensinamentos imprescindíveis para realização deste trabalho.

Aos Amigos Thyago, Bira, Pamela, Aryanna, Cícero, Kelly e Henrique pelas boas horas de estudo e distração.

A todos os Amigos e colegas do laboratório de Pesquisa em Produtos e Recursos Naturais (LPqRN).

Aos técnicos Aldy e Margarida pela atenção, colaboração e amizade.

A todos os amigos e parentes que sempre acreditaram no meu potencial e ajudaram direta ou indiretamente para a realização desse objetivo.

RESUMO

Na agricultura atual é essencial a adoção de estratégias de manejo, de baixo impacto ambiental. Nesse contexto o ambiente que engloba as raízes das plantas é de extrema importância, uma vez que ela está em constante contato com microrganismos tais como rizobactérias promotoras do crescimento (RPCPs), conhecidos por afetar o metabolismo e a resistência das plantas, podendo ajuda-las a lidar com estresses bióticos e abióticos via promoção de crescimento, resistência induzida, produção de compostos fitohormônios, compostos orgânicos voláteis (COVs) e capacidade de fixar nitrogênio. Estudos com as rizobactérias associativas levaram a descoberta do gênero *Azospirillum*, isolado em gramíneas forrageiras e cereais cultivados em diversos países de clima tropical e temperado. Em relação aos microrganismos endofíticos *G. diazotrophicus* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica obrigatória e não-formadora de esporos isolada inicialmente a partir de cana-de-açúcar no Brasil. O presente estudo foi embasado na hipótese de que as RPCPs podem alterar a resistência de plantas a insetos herbívoros, tendo como objetivo avaliar a influência da ação conjunta de duas estirpes de RPCPs (*Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azospirillum sp*) no metaboloma de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP 79-1011 como também nos mecanismos de defesa da planta a herbivoria por *Diatraea saccharalis*. Os metabólitos presentes em maior concentração tanto em plantas inoculadas quanto em plantas do controle foram identificados por análise metabolômica pela técnica de RMN. Os compostos identificados em maior concentração nas plantas inoculadas foram carboidratos, compostos aromáticos, aminoácidos e ácidos orgânicos. Nas plantas do controle os compostos foram aminoácido e intermediários do ciclo de Krebs. Alterações no perfil de compostos orgânicos voláteis COVs foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Alterações qualitativas e quantitativas ocorreram no perfil geral de voláteis emitidos pelas plantas inoculadas quando comparado ao perfil de voláteis emitido pelas plantas do controle, fato que poderia estar contribuindo para preferência de *Diatraea saccharalis* pelas plantas do controle em relação as plantas inoculadas no bioensaio com chance de escolha. Ocorreu alteração no perfil de COVs de plantas infestadas com *Diatraea saccharalis*. No bioensaio sem chance de escolha não se observou diferença significativa no ganho de peso de *Diatraea saccharalis* alimentadas com plantas do controle ou inoculadas.

Palavras chave: RPCP; metabolômica, resistência; COVs; aromáticos.

ABSTRACT

In the current agriculture is essential to adopt management strategies, low environmental impact. In this context, the environment comprising plant roots is of utmost importance, since they are in constant contact with microorganisms such as growth promoting rhizobacteria (RPCPs), known to affect the metabolism and resistance of plants, may help them dealing with biotic and abiotic stresses via promotion of growth, induced resistance, production of phytohormones compounds, volatile organic compounds (VOCs) and ability to fix nitrogen. Studies of associative rhizobacteria led to discovery of *Azospirillum* genus isolated in grasses and cereals grown in several countries of tropical and temperate. Regarding endophytic microorganisms *G. diazotrophicus* is a Gram-negative bacteria, obligatory aerobic and non-spore forming isolated initially from sugar cane in Brazil. This study was based on the assumption that the RPCPs can change the resistance of plants to insect herbivores, and to evaluate the influence of the joint action of two strains of RPCPs (*Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Azospirillum* sp) in metabolome of plant cane - Sugar variety SP 79-1011 but also in plant defense mechanism herbivory by *Diatraea saccharalis*. The metabolites present in higher concentration both in inoculated plants as on control plants were identified by analysis metabolomics by the NMR technique. Compounds identified in higher concentration in inoculated plants were carbohydrates, aromatic compounds, amino acids and organic acids. In control plants and amino compounds were intermediaries Krebs cycle. Changes in the volatile organic compounds VOCs profile were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Qualitative and quantitative changes have occurred in the overall volatile profile emitted by plants inoculated as compared to the profile of volatile issued by the control plants, which could be contributing to preference *Diatraea saccharalis* the control plants from the plants inoculated in bioassay choice. VOCs present changes in the profile of infested plants with *Diatraea saccharalis*. Bioassay no choice there was no significant difference in *saccharalis* *Diatraea* weight gain fed control or inoculated plants.

Keywords: PGPR; metabolomics, resistance; VOCs; aromatics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação do ciclo do nitrogênio.....	26
Figura 2	Micrografias eletrônicas de transmissão de <i>G diazotrophicus</i> dentro de cana de 10 dias após a inoculação de raízes.....	33
Figura 3	Toletes de cana de açúcar em bequeres a 34 graus °C.....	41
Figura 4	Plantio das canas, mudas em desenvolvimento.....	41
Figura 5	<i>Diatraea saccharalis</i> em alimentação artificial.....	42
Figura 6	Lagartas <i>D saccharalis</i> aprisionadas em gaiolas para o Bioensaio sem chance de escolha.....	43
Figura 7	Imagem ilustrativa do bioensaio da arena com as plantas dos dois tratamentos para o bioensaio com chance de escolha.....	44
Figura 8	Aeração de plantas.....	44
Figura 9	Imagem ilustrativa dos traps confeccionados com adsorvente porapak q, usados para a aeração.....	45
Figura 10	Gráfico OPLS-DA scores plot da primeira componente.....	47
Figura 11	(OPLS-DA): Validação do modelo.....	48
Figura 12	Comparação dos espectros de RMN-1H das amostras controle e inoculadas.....	50
Figura 13	Espectro J-resolvido da amostra controle.....	50
Figura 14	Espectro COSY da amostra controle.....	51
Figura 15	Espectro HSQC da amostra controle.....	51
Figura 16	Espectro HMBC da amostra controle.....	52
Figura 17	Regiões do espectro J-resolvido para identificação do lactato.....	53
Figura 18	Espectro COSY para a identificação do lactato.....	53
Figura 19	Regiões do espectro J-resolvido para identificação do aspartato.....	54

Figura 20	Espectro COSY para a identificação do aspartato.....	54
Figura 21	Espectro J-resolvido indicando o sinal da Glicia.....	55
Figura 22	Espectro J-resolvido referente aos hidrogênios anoméricos em carboidratos comuns da cana-de-açúcar.....	56
Figura 23	Espectro HSQC referente aos hidrogênios anoméricos em carboidratos comuns da cana-de-açúcar.....	56
Figura 24	Espectro J-resolvido referente a identificação do ácido fumárico e ácido gálico.....	57
Figura 25	Espectro HSQC referente a identificação do ácido gálico.....	58
Figura 26	Ganho de peso das lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> alimentadas em cana-de-açúcar inoculada com os microrganismos e plantas controle.....	60
Figura 27	Preferência de lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> por plantas de cana-de-açúcar inoculadas com microrganismos endofíticos e controle	60
Figura 28	Comparação entre perfis de voláteis de plantas controle e inoculadas sem infestação.....	62
Figura 29	Comparação entre perfis de voláteis de plantas controle e inoculadas com infestação.....	63
Figura 31	Biossíntese dos compostos fenólicos.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	As classes encontradas e seus compostos presentes nos dois cultivares nos dois tratamentos.....	49
-----------------	---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2 Revisão bibliográfica	14
2.1. Interação cana-de-açúcar rizobactérias	14
2.2. Microrganismos promotores do crescimento: influencias sobre as plantas.	16
2.2.1. Produção de fito hormônios	18
2.2.2. Solubilização de fosfato inorgânico	21
2.2.3. Sideróforos	22
2.6. Resistencia em plantas	22
2.7. Fixação biológica de nitrogênio	24
2.7.1. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas	27
2.7.2. Fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas	28
2.8. Bactérias envolvidas com plantas	29
2.8.1. Diazotrófos associativos	29
1.8.2. Diazotrófos endofíticos	32
2.8.2.1. Gluconacetobacter diazotrophicus	31
2.9. Controle biológico (insetos e microrganismos)	36
2.10. Interação planta hospedeiro e análise metabolômica	34
2.16. Metabolômica por RMN	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Material Vegetal	42
3.2. Microrganismos	42

3.3. Carreador Polimérico de inoculante.....	42
3.4. Preparação dos microrganismos e inoculantes.....	43
3.5. Procedimento para inoculação das plantas.....	43
3.6. Plantio da cana.....	44
3.7. <i>Diatraea saccharalis</i>	44
3.8. Bioensaios sem chance de escolha	46
3.9. Bioensaios sem chance de escolha.....	47
3.10. Identificação dos Metabólitos Voláteis Emitidos.....	48
3.11. Preparo da amostra para a análise metabolômica (RMN ¹ H) e (RMN 2D)	50
3.12. Análise por RMN e estatística multivariada.....	50
4. RESULTADOS	52
4.1. Metabolômica.....	52
4.2. Bioensaios.....	67
5. DISCUSSÃO	64
5.1. Análise metabolômica.....	64
5.1.1. Aromáticos.....	64
5.1.2. Aminoácidos.....	69
5.1.3. Carboidratos.....	72
5.1.4. Ácidos orgânicos.....	74
5.1.5. Intermediários do ciclo do ácido cítrico.....	75
5.2. Alterações no comportamento de <i>Diatraea saccharalis</i> - Antibiose.....	79
5.3. Alterações no comportamento de <i>Diatraea saccharalis</i> – Antixenose.....	85
6. Conclusão	89

REFERÊNCIAS.....

1. INTRODUÇÃO

Na agricultura atual é essencial a ação conjunta de uma série de estratégias que auxiliem na melhoria da execução de práticas de manejo, causem baixa degradação

ambiental, diminuam a entrada de fertilizantes exógenos e melhorem a fertilidade natural do solo.

Nesse sentido, o aumento da utilização de medidas que auxiliem no controle de pragas e doenças e promova o crescimento de plantas é uma importante ferramenta (G. RAMOS et al., 2001; SAIKIA & JAIN, 2007; PEDRAZA, 2008). Nesse contexto, o ambiente que engloba as raízes das plantas é de extrema importância, uma vez que elas estão em constante contato com microrganismos provenientes do solo, tais como rizobactérias promotoras do crescimento (RPCP) e fungos micorrízicos, que são conhecidos por afetar o metabolismo e a resistência das plantas. Estes, por sua vez, podem ajudar as plantas a lidar com estresses bióticos e abióticos via promoção de crescimento e resistência induzida (ERB et al., 2009; PINEDA et al., 2010; PINEDA et al., 2012). Uma tecnologia que vem ganhando destaque no cenário agrícola brasileiro e mundial é o uso de RPCP que atuam através de um conjunto de mecanismos, quais sejam, o controle biológico, o aumentando a absorção de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e solubilização de fosfato. Além disso, muitas rizobactérias podem alterar o estado hormonal de plantas através da produção de auxinas e citocininas ou por diminuição dos níveis de etileno da planta (BERG, 2009; DOOD et al., 2010; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011, SOO SO et al., 2014).

A análise metabolômica tem o intuito de mapear todos os metabólitos em organismos sob determinadas condições. O mapeamento pode ser de cunho qualitativo como também quantitativo. O uso de RMN na análise metabolômica é bastante difundido. LEISS et al 2009 mostrou, por exemplo que metabolômica por RMN para a identificação de metabólitos em plantas resistentes e susceptíveis ao ataque de trips *Haplothrips senecionis*, indicando três diferentes metabólitos como potenciais candidatos para a resistência a tripés.

O presente estudo foi embasado na hipótese de que as RPCPs influenciam na resistência de plantas a insetos herbívoros, tendo como objetivo avaliar a influência da ação conjunta de duas estirpes de RPCPs (*Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azospirillum* sp.) no metaboloma de plantas de cana-de-açúcar da variedade sp 79-1011 como também na defesa à herbivoria por *Diatraea saccharalis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interação cana-de-açúcar rizobactérias

A cana-de-açúcar é uma cultura importante em todo o mundo tendo em vista os mais de 20 milhões de hectares que são plantados em mais de 110 países. Cerca de 80% do açúcar no mundo é produzida a partir de cana-de-açúcar, principalmente em países em desenvolvimento (GOEBEL & SALLAM, 2011). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*), seguido por Índia e China, como também é o maior produtor de açúcar e etanol de cana-de-açúcar. Responsável por mais de 50% do açúcar comercializado no mundo, estimativas indicam que o país deve ter um aumento de 5,0%. na sua produção este ano (CONAB, 2015)

A cana é uma monocotiledônea economicamente importante, com uma capacidade única de acumular grandes quantidades de sacarose em suas hastes. Pertence à família das gramíneas (Poaceae), como arroz, milho, trigo e sorgo. A cana pode interagir especificamente com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria fixadora de nitrogênio. Ao contrário da simbiose rizóbio/leguminosa, onde as bactérias são restritas a nódulos, estas bactérias diazotróficas endofíticas, colonizam espaços intercelulares e tecidos vasculares da maioria dos órgãos da planta, sem causar danos ao hospedeiro. Eles promovem o crescimento das plantas, possivelmente, através da fixação de N₂ e também pela produção de hormônios vegetais. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de sinalização que estão envolvidas na criação deste tipo particular de interação endofítica.

No Brasil, seu cultivo é capaz de proporcionar contribuições, graças a adoção de tecnologias que contribuem, por exemplo, com a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e leva a um aumento no balanço energético da cultura. Diferentes populações de bactérias endofíticas foram identificadas em associação com cana. Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), essas bactérias promovem crescimento do vegetal por mecanismos que envolvem a solubilização de nutrientes, produção de hormônios de plantas, além de possuir atividade antagonista a patógenos. A eficiência da contribuição da FBN para a cana é influenciada pelos genótipos das plantas e bactérias, bem como pelas condições ambientais (CARVALHO et al., 2011).

Em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas, por exemplo, os ganhos vão desde incrementos na FBN, aumento de biomassa e produtividade. OLIVEIRA e colaboradores (2002) trabalhando com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas, e mostraram, por intermédio do uso da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, que houve um aumento na contribuição da FBN. Mostraram também

aumentos teor de matéria seca da raiz de plantas que foram inoculadas em comparação a plantas controle.

VARGAS e colaboradores (2014) em trabalho com a cultivar de cana-de-açúcar SP70-1143 mostraram que *G. diazotrophicus* PAL 5 foi capaz de promover um maior crescimento em canas inoculadas em relação a plantas do controle, 14 dias após a inoculação. Além disso, eles também relataram que as plantas inoculadas desenvolvem uma maior capacidade de resistir ao estresse hídrico em comparação as plantas não inoculadas, argumentando que este e outros microrganismos promotores de crescimento de plantas podem induzir tolerância ao estresse, melhorando a condição hídrica da planta através do reforço de compostos protetores como a trealose, prolina e ascorbato.

LIN e colaboradores (2012) avaliaram o potencial para a promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar de duas estirpes de *Enterobacter* spp. NN145S NN143E em conjunto e isoladamente. Eles demonstraram que ambas as estirpes aumentaram o teor de biomassa e nitrogênio de mudas de cana, demonstrando que a fixação biológica de nitrogênio contribuiu para promoção do crescimento de plantas.

Em trabalho utilizando dez bactérias endofíticas com potencial para promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar, CHAUHAN e colaboradores (2013) avaliaram parâmetros como a solubilização de fósforo, a produção de ácido indol acético (AIA), a produção de sideróforos, como também a inibição do crescimento do fungo *Colletotrichum falcatum*, promovido por bactérias endofíticas, em trabalho onde foram isolados bactérias endofíticas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. Como resultado eles verificaram que todos os isolados foram capazes de produzir AIA e três delas solubilizaram fósforo em ágar, além disso, dois dos isolados foram capazes de produzir sideróforos e outros dois se mostraram antagonistas a *C. falcatum*.

2.2 Microrganismos promotores do crescimento: influencias sobre as plantas

As plantas são organismos de vida altamente adaptáveis. Essa capacidade é atribuída à maneira com a qual elas utilizam as diversas moléculas disponíveis em seu habitat para desempenhar as funções necessárias ao funcionamento de seu metabolismo (TAIZ & ZEIGLER, 2006). A interação entre as plantas e os microrganismos pode

acontecer de tal forma que a planta manipula o microrganismo a fim de potencializar os efeitos benéficos que podem ser trazidos através desta associação (TIKHONOVICH & PROVOROV, 2009). O uso de fertilizantes inorgânicos, água, herbicidas e pesticidas poderia ser diminuído com utilização de microrganismos na agricultura (ANDREWS et al., 2010)

Algumas RPCPs podem ser comumente encontradas na rizosfera, porém, também podem ser isoladas a partir de tecidos internos de plantas, sendo chamadas bactérias endofíticas. Muitas vezes, uma espécie pode ser isolada tanto interna como externamente, assim *Azospirillum* sp que geralmente é encarada em associações rizosféricas com plantas como milho, arroz, trigo e sorgo, também pode ser encontrada no interior de vegetais como cana-de-açúcar, embora, em alguns casos em densidades mais baixas, assim denominadas endofíticos facultativos (ROTHBALLER et al., 2003; BHATTCHARIA & JHA, 2012; HUERGO et al., 2008).

Trabalhos demonstram ganhos obtidos por plantas quando essas interagem com microrganismos que são transmitidos pelo solo. Em alguns casos esses organismos podem influenciar na produção de compostos orgânicos voláteis, os quais desempenham papéis diversos e de extrema importância em distintas comunidades ecológicas, eles estão diretamente envolvidos, por exemplo, na comunicação inter e intra-planta (KARBAN et al., 2013).

Os trabalhos de PANKA e colaboradores (2013) demonstram resultados a respeito da produção de compostos fenólicos e compostos orgânicos voláteis envolvidos na defesa de plantas. Em seu trabalho o objetivo foi avaliar como três genótipos diferentes de azevem perene (NI22, NI60 e NIA6) respondiam a inoculação com uma estirpe de fungo endofítico *Neotyphodium lolii*, frente ao ataque do patógeno *Fusarium poae*. Em relação ao teor de fenólicos, as avaliações efetuadas até o sexto dia após a inoculação demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos foi maior nas plantas inoculadas em comparação com as plantas do controle, sendo que as maiores quantidades de compostos fenólicos foram observados no segundo e sexto dia após a inoculação e o genótipo NI22 mostrou o efeito mais pronunciado do endófito na produção de compostos fenólicos, com um aumento de mais de 61%.

No mesmo experimento, tanto as plantas do controle quanto as plantas inoculadas emitiram conteúdo qualitativo idênticos de compostos orgânicos voláteis e a emissão de dois voláteis de folha verde foi mais acentuada para as plantas dos dois

tratamentos, além disso nas plantas inoculadas todos os voláteis foram emitidos em maior quantidade (PANKA et al., 2013).

O mecanismo responsável pelo crescimento de plantas, quando promovido por rizobactérias, é um processo que pode incluir desde a produção até a degradação dos principais hormônios reguladores do seu crescimento como, por exemplo, ácido indol-3-acético, citocininas, auxinas e giberelinas, pela solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio atmosférico. Além disso, bactérias promotoras de crescimento de plantas podem colonizar competitivamente as raízes das plantas, e além de estimular o seu crescimento, podem reduzir a incidência de doenças por mecanismos diretos que envolvem a produção de antibióticos, sideróforos, e enzimas líticas, tais como glucanase e quitinase ou por mecanismos indiretos que incluem a indução de resistência local ou sistêmica contra a grande variedade de agentes patogênicos virais, bacterianos e fúngicos (LEE et al., 2004; HAAS & DÉFAGO, 2005; PINEDA et al., 2010; PHI et al., 2010).

Rizobactérias promotoras do crescimento podem atuar na promoção do crescimento de plantas como também na modificação da arquitetura da raiz pela produção de fitohormônios como AIA, giberelina e citocininas. Entre fito-hormônios, AIA é o hormônio produzido em maior quantidade por RPCPs. Além disso, o AIA é difundido em todo o corpo das plantas, especialmente em tecido meristemático e regiões de crescimento, incluindo as sementes em germinação; ponta do caule ou raiz e em botões terminais. AIA provoca vários processos fisiológicos importantes, como a divisão de feixes vasculares, as respostas tropismo, e desenvolvimento de gemas laterais, flor, e fruto.

A Solubilização de fosfato por RPCPs é um dos fatores mais importantes na promoção do crescimento de plantas. O fósforo é considerado um dos elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, uma vez que participa no metabolismo energético e é um componente importante dos ácidos nucleicos, tais como ATP e ADP em plantas (TAIZ & ZEIGER, 2006; OLDROYD et al., 2011).

2.3 Produção de fito hormônios

Muitas RPCPs são capazes para produzir quantidades substanciais de compostos fitohormônios, tais como auxinas e giberelinas (LUGTENBERG KAMILOVA, 2009; SIRRENBERG et al., 2007). Tem sido demonstrado que vários fito hormônios podem interagir negativamente por cros talk com a via de sinalização AS

afetando o resultado da resposta imune da planta (PIETERSEN et al., 2009;. VERHAGE et al., 2010). Por isso, é tentador especular que os microrganismos não simbióticos podem produzir fitormônios, a fim de atenuar a força relativa da sinalização hormonal AS via cross-talk.

A produção de substâncias fito-hormonais tais como auxinas e giberelinas por RPCP tem sido proposta como um dos mecanismos que explicam a promoção de crescimento de plantas (PEDRAZA, 2008). O crescimento e funcionamento da planta decorrem dos efeitos fito-hormonais que são desencadeados quando PGPR produzem ou metabolizam compostos de sinalização química que alteram o alongamento e a arquitetura da raiz, proporcionando um aumento no volume de solo explorado pela planta, aumentando indiretamente a captura de recursos vegetais já no solo. Hormônios vegetais, ácido abscísico (ABA), auxinas, citocininas (CCs), etileno, giberelinas (GAs), ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico AS, regulam múltiplos processos fisiológicos, incluindo a iniciação de raiz, alongamento, arquitetura e formação de pêlos radiculares (DOOD et al., 2010)

A Biossíntese de ácido abscísico começa com a clivagem oxidativa do carotenóide 9' *cis*-violaxantina ou 9' *cis*-neoxantina para xantoxina pelas enzimas plastidiais 9-*cis*dioxigenases -epoxicarotenóide (NCEDs). Xantoxina é convertido no aldeído pela enzima abscísico xantoxina oxidase, em seguida, abscísico aldeído oxidase catalisa a conversão de aldeído abscísico a ABA (FINKELSTEIN et al., 2002).

As auxinas mais importantes parecem ser ácido indole-3-acético AIA, ácido indole-3-butírico e ácido fenoxiacético. Geralmente, AIA segregado por rizobactérias interfere com os vários processos de desenvolvimento da planta, porque o conteúdo de AIA endógeno pode ser alterado através da aquisição de AIA que foi secretada pelas bactérias do solo (DOOD et al., 2010). A produção de AIA por *G. diazotrophicus* foi relatada em diversos trabalhos (LEE et al., 2004; PEDRAZA et al., 2004). A importância de auxinas para o crescimento de plantas foi demonstrado quando SEVILLA e colaboradores (2001) mostraram em seu trabalho que mesmo com mutantes de *G. diazotrophicus* PAL5 com capacidade de fixação de N₂ alterada, ainda poderia estimular o crescimento das plantas quando inoculadas em plantas de cana, o que sugere a implicação da produção de auxina.

O desenvolvimento radicular estimulado por AIA é dependente da capacidade de resposta do genótipo da planta à auxina. Os resultados de trabalho realizado por REMANS e colaboradores (2008), no qual se usou dois genótipos de feijão (BAT477 e DOR364) em relação a inoculação com *Azospirillum brasilense* Sp245 mostraram que o aumento do peso seco das raízes foi significativamente maior no genótipo BAT477 inoculado, enquanto que o peso seco das raízes das plantas DOR364 quase não foi afetada após a inoculação. Neste mesmo trabalho eles mostraram também que houve diferença na resposta dos genótipos a nodulação provocada pela co-inoculação por *Rhizobium*. O número de nódulos nas raízes de BAT477 foi significativamente reduzido mediante co-inoculação com *Rhizobium etli* CNPAF512 e *A. brasilense* Sp245 em comparação com tratamento onde ocorreu apenas inoculação com *Rhizobium etli* CNPAF512. De modo contrário ocorreu um aumento significativo quando DOR364 foi co-inoculada com *Rhizobium etli* CNPAF512 e *A. brasilense* Sp245 em comparação com inoculação somente com de *Rhizobium*.

Alguns autores especulam que a concentração de AIA tanto no interior quanto na superfície das raízes é regulada pela ação de bactérias que produzem e\ou degradam AIA. Trabalhando com *Pseudomonas putida* estirpe 1290, LEVEAU e LINDOW (2005) argumentaram que AIA pode ser um substrato para o crescimento da bactéria, assim como também uma maneira de estabelecer as concentrações específicas de ou AIA no exterior e no interior da planta. Além disso, pode ser uma forma da planta poder regular a composição da comunidade de rizobactérias através da secreção de AIA na rizosfera ou proteger a planta de infecção por patógenos 'limpando' AIA da superfície radicular.

Outro hormônio sintetizado pelos microrganismos é a citocinina, que também auxilia no crescimento de diversas espécies vegetais, atuando nas divisões celulares, na germinação das sementes, na expansão das raízes e folhas e também na senescência do vegetal. Dentre os microrganismos produtores deste composto podemos citar a espécie *Pseudomonas fluorescens* que produz altas concentrações deste fitormônio (GRAY & SMITH, 2005). Algumas bactérias como o *Bacillus* sp. também produzem altos níveis de giberelinas, que induzem efeitos positivos no crescimento de caules e galhos de diversas plantas (GRAY & SMITH, 2005; TAIZ & ZEIGER, 2006).

Giberelinas são ácidos diterpenóides tetracíclicos que estão envolvidas numa série de processos fisiológicos e de desenvolvimento em plantas. Esses processos incluem a germinação das sementes, emergência de plântulas, caule e folha crescimento, indução floral e flor e crescimento dos frutos. Giberelinas também estão implicados na promoção do crescimento radicular, a abundância de pelos da raiz, na inibição da brotação, diferenciação floral em angiospermas lenhosas, regulação do tecido vegetativo e broto de dormência reprodutiva e atraso de senescência em muitos órgãos de uma variedade de espécies de plantas (mais de 120 tipos têm sido encontrados em plantas, fungos, e bactérias). GAs foram isoladas pela primeira vez como metabólitos de um patógeno de arroz, *Gibberella fujikuroi*, atualmente *Fusarium fujikuroi* (BOMKE et al., 2009). *Rhizobium meliloti* são capazes de produzir GAs. *Azospirillum* tem a capacidade de sintetizar e metabolizar GAs in vitro e em planta. Um efeito de promoção do crescimento de *Azospirillum* spp. em plantas tem sido sugerido para ser parcialmente causados pela produção de GAs pela bactéria (CROZIER et al., 2000; REINOSO et al 2002; DODI et al., 2004).

DOBERT e colaboradores (1992) demonstraram que plantas de *lunatus Phaseolus* inoculadas com uma cepa específica de *Bradyrhizobium sp.* mostraram um alongamento do entrenó marcada que não foi observada em plantas inoculadas com outras bactérias nodulantes. A medição do teor de giberelina mostraram que o aumento dos níveis de GAs em nódulos formados pelas duas estirpes bacterianas estava associado ao aumento do crescimento de alongamento.

Para a biossíntese de etileno deve ocorrer a conversão de *S*-adenosilmetionina a etileno catalisada pela enzima ACS. Ácido 1-aminociclopropano-carboxílico podendo ser conjugada a malonil-ACC, desaminada ou oxidada (catalisado pela enzima ACC-oxidase) para dar etileno, dióxido de carbono e cianeto. A importância relativa destas vias varia de acordo com o tecido da planta e das condições ambientais (DOOD et al., 2010).

Geralmente, o etileno é um metabolito essencial para o crescimento normal e desenvolvimento de plantas. Este hormônio de crescimento vegetal é produzido endogenamente por cerca de todas as plantas e também é produzida por diferentes processos bióticos e abióticos em solos e é importante na indução de alterações fisiológicas em múltiplas plantas. Além de ser um regulador de crescimento da planta,

etileno também foi estabelecida como um hormônio do estresse (SALEEM et al., 2007). Sob condições de estresse, como aqueles gerados pela salinidade, seca, alagamento, metais pesados e patogenicidade, o nível endógeno de etileno é aumentada significativamente, o que afeta negativamente o crescimento geral da planta. Por exemplo, a alta concentração de etileno induz desfolha e outros processos celulares que podem levar à redução do desempenho da cultura (SALEEM et al., 2007; BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

Rizobactérias promotoras do crescimento que possuem a enzima, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, podem facilitar o crescimento e desenvolvimento das plantas, diminuindo os níveis de etileno, induzindo tolerância ao sal e reduzir o estresse hídrico em plantas (NADEEM et al., 2007; ZAHIR et al., 2008).

Foi demonstrado que RPCPs segregam a enzima ACC-desaminase, que degrada ACC o precursor de ET, resultando em reduzida produção de ET na planta (GLICK et al., 2007). Além disso, uma significativa redução na expressão de genes que codificam fatores de transcrição relacionados a síntese de ET foi relatada para raízes de *Arabidopsis* colonizadas pela RPCP *P. fluorescens* e WCS417 FPT9601-T5 (Verhagen et al 2004; WANG et al 2005), que suporta a hipótese de que modulam PGPR imune do hospedeiro respostas por interferir com a via de sinalização de ET. (PIETERESE et al., 2012)

2.4 Solubilização de fosfato inorgânico

A solubilização de fosfato envolve mecanismos genéticos e bioquímicos que ainda não são completamente compreendidos, além disso, a concentração de fósforo solúvel no solo é geralmente muito baixa, variando a níveis de 1 ppm ou inferior (PRIMAVESI, 2002).

Entre os gêneros bacterianos habitantes do solo e da rizosfera com a capacidade para solubilizar as várias formas de fosfato insolúvel, tais como fosfato de tricálcio, fosfato de cálcio, hidroxiapatita, e rocha fosfática estão: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia*. É geralmente aceito que o principal mecanismo de solubilização de fosfato mineral é a ação de ácidos orgânicos sintetizados por microrganismos do solo, entre eles, o ácido glucônico que parece ser o mais comum agente de solubilização do fosfato mineral. Outros ácidos orgânicos identificados em

estirpes bacterianas com capacidade solubilizante de fosfato é o ácido 2-cetoglucônico, que está presente em *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Bacillus firmus*. linhagens de *Bacillus liqueniformis* e *B. amyloliquefaciens*. Estes podem produzir misturas de ácido láctico, isovalérico, isobutírico e ácidos acéticos. Outros ácidos orgânicos, tais como ácido glicólico, ácido oxálico, malônico, succínico, também foram identificados entre solubilizantes de fosfato (VASSILEV & VASSILEVA, 2003).

2.5 Sideróforos

O ferro é um elemento essencial para o crescimento de todos os organismos vivos. A escassez de ferro biodisponível em habitat de solo e na superfície das plantas é responsável pela concorrência. Sob condições limitantes de acesso a ferro RPCPs produzem compostos de baixo peso molecular, chamados sideróforos, para adquirir competitivamente íon férrico. Ferro (Fe^{3+}) é biologicamente importante, pois ele é um constituinte de citocromo e outros do heme ou as proteínas não-heme e também um cofator em várias enzimáticas.

Sideróforos são moléculas sintetizadas por RPCP em ambientes com pouca disponibilidade de íons ferro para competição por esses íons. As RPCPs competem com microrganismos patogênicos pelos íons de ferro, fato que afeta o desenvolvimento de patógenos (SARAF et al., 2014). Em revisão feita por WHIPPS (2000), por exemplo, são abordados trabalhos que mostram que a competição por íons ferro influencia a estrutura da comunidade microbiana da rizosfera de plantas.

2.6 Resistência em plantas

Resistência sistêmica induzida (RSI) e resistência sistêmica adquirida (RSA), que fazem parte das respostas de resistência sistêmica de plantas, são ativadas por certas moléculas produzidas por microrganismos conhecidos como indutores. A ISR é o fenômeno desencadeado pela interação de algumas bactérias benéficas com plantas que começa na raiz, e se estende para a parte aérea. (RAMOS E SOLANO, 2008). Esta resposta de defesa é dependente da sinalização de ácido jasmônico e etileno na planta (VAN LOON, 2007) A colonização da raiz de *Arabidopsis* por microrganismos benéficos, como *Pseudomonas fluorescens* desencadeia essa resposta de resistência sistêmica induzida, a qual é eficaz contra uma séria de atacantes, tais como insetos herbívoros. A primeira etapa da ISR é o reconhecimento do microrganismo através de padrões moleculares associados a microrganismos (mAmps) como inibidores de proteinases que afetam a alimentação do inseto. Estes compostos incluem moléculas da superfície celular, tais como flagelina e lipopolisacarídeos, ou compostos que são

excretados pelo microrganismo como sideróforos quelante de ferro, antibióticos, biosurfactantes e compostos orgânicos voláteis (VAN LOON et al., 2006; HOWE, 2004). Muitos micróbios com origem no solo têm a capacidade para induzir a resistência das plantas em tecidos sistêmicos, um processo denominado RSI. Tradicionalmente, RSI é conhecido por ser desencadeada por RPCPs e particularmente por *Pseudomonas sp.* e *Bacillus sp.*

Pensava-se que a importância dos fitormônios ácido jasmônico (AJ) e etileno para a resistência sistêmica induzida (RSI) estava relacionada a alterações na produção desses hormônios, porém, de acordo com pietersen e colaboradores (2000) não ocorreu alteração qualquer na produção AJ ou ET em folhas de plantas induzidas que, sugerindo que o estado de RSI se baseia em uma sensibilidade aumentada a estas hormonas de plantas, em vez de um aumento da sua produção caracterizando um efeito priming.

O priming é um estado fisiológico que pode ser induzido por padrões moleculares oriundos de microrganismos benéficos ou plantas, efetores originários de organismo patogênicos, microrganismos benéficos, tratamentos com alguns compostos sintéticos ou naturais. O priming confere a planta poder de resposta melhorado e acelerado quando esta é atacada posteriormente por microrganismo, inseto ou ainda sofre algum estresse abiótico (CONRATH, 2015). No entanto, os mecanismos moleculares ao priming ainda são pouco conhecidos. Hipoteticamente, o estado (priming) baseia-se na acumulação, ou modificação após a tradução de uma ou mais proteínas de sinalização que, ainda permanecem inativas mesmo depois de ser expressas e/ou modificados. Após a percepção de algum sinal de um patógeno ou de algum estresse por insetos esta capacidade de sinalização de defesa reforçada permite uma reação mais rápida (VAN DER ENT et al., 2009).

A antibiose é um mecanismo, usado pelas RPCP para promover a supressão da ação de patógenos ou pela produção de metabólitos secundários, sendo incluídos na categoria de metabólitos secundários, compostos tóxicos, que em baixas concentrações, são prejudiciais para o crescimento ou atividades metabólicas dos outros microrganismos. Entre todas as estirpes de PGPR, *Bacillus* e *Pseudomonas* são os dois gêneros mais importantes e bem estudados para antibiose. Compante e colaboradores (2006) mostraram 60 tipos diferentes de antibióticos, tais como amphisin, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), cianeto de hidrogênio, oomicins A, fenazina, pioluteorina, pirrolnitrina, tensina, tropolona e lipopeptídeos cíclicos que são produzidos por pseudomonas. A maior parte de polipeptídeos identificados a partir de *Bacillus*

subtilis possui efeitos anti fúngicos e alguns compostos também podem ajudar na promoção do crescimento de plantas.

RPCP podem produzir compostos orgânicos voláteis (COVs) capazes de induzir o crescimento em plantas e ainda levar plantas a uma resistência sistêmica induzida. Ryu e colaboradores (2003) em trabalho usando oito estirpes bacterianas de rizobactérias promotores do crescimento de plantas demonstraram que essas RPCP podem promover o crescimento de mudas *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*) a partir da emissão de uma mistura de produtos voláteis. (MINERDI et al 2011). Além disso, RPCPs também podem induzir alterações no conjunto de compostos orgânicos voláteis emitidos pelas plantas (PANKA et al., 2013).

2.7 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um nutriente essencial para as plantas, sua disponibilidade limita a produtividade em distintos ecossistemas do globo terrestre, e influencia o crescimento da planta de modo mais significativo do que qualquer outro nutriente (BRENDEMEIER e MUNDSTOCK, 1999). Em plantas superiores o nitrogênio é a segunda substância assimilada em maior quantidade ficando atrás apenas do CO₂. As plantas absorvem N principalmente na forma de nitrato de amônio disponibilizado a partir da mineralização da matéria orgânica e aplicação de fertilizantes químicos. Ele serve como constituinte de muitos componentes da célula vegetal, nos quais estão inclusos ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (MIFLIN & LEA, 1976).

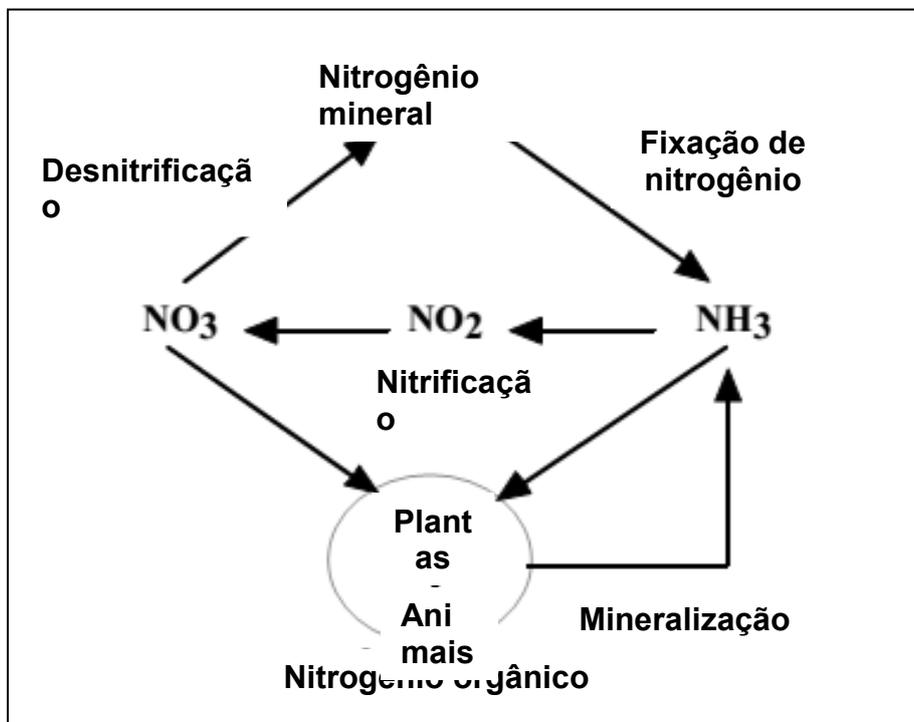
Os sintomas da deficiência de nitrogênio são de aparecimento rápido. Ocorre retardo do crescimento vegetal e o amarelecimento das folhas (clorose), que é o sintoma mais eminente se a deficiência for persistente, ocorrendo de modo mais acentuado nas folhas mais velhas, aquelas próximas a base das plantas. Em situações onde o nível de deficiência de nitrogênio é muito elevado, nota-se que as folhas tornam-se amarelas ou castanhas podendo ocorrer posterior queda da planta. Com relação às folhas mais jovens, os sintomas podem não ser exibidos inicialmente, devido a possível mobilização do nitrogênio a partir das folhas mais velhas (TAIZ & ZEIGER, 2006).

A atmosfera terrestre possui em sua constituição 78% de N₂, porém, este N não pode ser utilizado diretamente pelas plantas devido a alta energia demandada para a quebra da ligação tripla entre os átomos de N. deste modo para ser utilizado pelas plantas o N tem de ser "fixado" em uma forma assimilável pelos vegetais (por exemplo, NO₃⁻ ou NH₄⁺) (SHANTHARAM & MATTOO, 1997). Para entrar no sistema

solo planta, estão disponíveis para o nitrogênio atmosférico, três caminhos gerais: deposição atmosférica de N, fertilizantes e fixação biológica de nitrogênio. No mecanismo da FBN, alguns microrganismos possuem a capacidade de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia. Em ecossistemas terrestres não fertilizados, FBN é normalmente o caminho mais importante para disponibilização de N (REED et al., 2011).

A quantidade de nitrogênio presente na biosfera é alta. Cerca de 78% da atmosfera é composta por moléculas de N_2 altamente estáveis, devido a presença de uma ligação tripla que ocorre entre os dois átomos de N, fato que torna nitrogênio indisponível para os organismos vivos. A aquisição de N a partir da atmosfera pode acontecer por meio distintos caminhos: fixação biológica, fixação industrial, fixação por descargas elétricas ou decomposição da matéria orgânica dentre outros. O nitrogênio uma vez fixado na forma de NH_4^+ ou NO_3^- sofre diversas transformações, as quais copõem seu ciclo biogeoquímico (Figura 1) até serem assimilado em aminoácidos e outros compostos nitrogenados na planta. No solo microrganismos e vegetais travam uma intensa batalha pelos íons oriundos da fixação. Os vegetais dispõem de alguns mecanismos que os ajudam a capturar esses íons integrantes da solução do solo (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Figura 1-Representação do ciclo do nitrogênio. (modificado de ELMERICH e NEWTON 2007)



A fixação biológica de nitrogênio pode ser conceituada como o processo pelo qual o nitrogênio molecular presente na atmosfera é convertido a uma forma acessível aos vegetais, sendo este processo realizado por microrganismos, de diversos gêneros, denominados diazotróficos. Ao longo dos anos, diversos tipos de bactérias fixadoras de nitrogênio, que tem interação com distintos organismos vegetais, foram descobertas, caracterizando diferentes modos de fixação de nitrogênio (RIGGS et al., 2001). A primeira classe de bactérias diazotróficas descobertas foram as simbióticas, como as do gênero *Rhizobium* e do gênero *Frankia* associados com leguminosas e com não leguminosas respectivamente. O segundo tipo foram as bactéria não-simbióticas, incluindo as cianobactérias (ou algas azuis) *Anabaena* e *Nostoc* e gêneros como *Azotobacter*, *Beijerinckia* e *Clostridium* que vivem no solo ou na água. O terceiro tipo descoberto era integrado por bactérias que residem em torno das raízes das plantas (rizosfera) e fornece nitrogênio para estes vegetais, sendo tal interação denominada de "fixação de nitrogênio associativa". A quarta classe foi a das bactérias endofíticas,

constituída de bactérias que vivem no interior do tecido vegetal como cereais e gramíneas e são capazes fixar o nitrogênio atmosférico (OHYAMA et al., 2014).

Desde os primórdios da pesquisa relacionada a fixação biológica de nitrogênio em gramíneas no Brasil, grandes avanços ocorreram (BALDANE e BALDANE 2005). Com o passar dos anos o país tornou-se o país líder no uso de FBN em detrimento do uso fertilizantes nitrogenados tanto no universo do cultivo da soja quanto no cultivo de gramíneas (DÖBEREINER,1992; DÖBEREINER, 1997; KASCHUK et al., 2010).

Os primeiros passos para o entendimento da interação envolvendo planta e bactérias ocorreram no Brasil entre os anos de 1958-1990, período no qual a colonização dos tecidos vegetais por bactérias diazotróficas recebeu muita atenção. Neste período duas novas bactérias fixadoras de nitrogênio, capazes de colonizar o interior dos tecidos vegetais foram encontradas, uma isolada a partir de plantas de milho sorgo e arroz e a outra a partir de plantas de plantas de cana-de-açúcar: *Herbaspirillum seropedicae* e *G. diazotrophicus* (synon. *Acetobacter diazotrophicus*) respectivamente (BALDANE e BALDANE, 2005).

A partir de então o conceito endofítico foi introduzido no campo da agricultura dando início a uma nova área dentro FBN levando a grandes avanços na compreensão da fisiologia, ecologia e genética, assim como na interação planta bactéria, propiciando a identificação de novas bactérias fixadoras de nitrogênio: *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *A. doebereineriae*, *G. johannae*, *G. azotocaptans* e *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004; BALDANI et al., 1996; BALDANI et al., 1997a; KIRCHHOF et al., 2001; ECKERT et al., 2001; FUENTES-RAMÍREZ et al. 2001).

2.7.1 Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas

Diversos grupos de microrganismos tem a capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente, podendo, em alguns casos, ocorrer a formação de estruturas diferenciadas responsáveis por abrigar uma alta densidade de bactérias em seu interior. As leguminosas, por exemplo, possuem o mecanismo simbiótico mais sofisticado e eficiente entre as associações de plantas superiores com bactérias fixadoras de N₂. Döbereiner (1990), resultando na formação de nódulos, no sistema de raízes, que irão proporcionar um ambiente propício para a fixação biológica de nitrogênio pelos rhizobios. O mecanismo de formação do nódulo, de maneira geral, consiste em duas etapas: organogênese do nódulo e infecção bacteriana, sendo que ambos os mecanismos podem exigir da planta, um reconhecimento molecular via sinalização rhizobial. O nódulo é formado através de um processo complexo que envolve a germinação das

sementes, exsudação de diferentes moléculas (compostos fenólicos) que exercem funções distintas estimulando processos como: a atração química dos rhizobios, o estímulo do crescimento das bactérias na rizosfera da planta hospedeira e desencadeamento a expressão de genes tanto da bactéria quanto da planta hospedeira. Para uma revisão completa ver (OLDROYD et al., 2011).

As bactérias penetram as raízes e provocam crescimento de células específicas, onde ficarão alojadas, sendo esse processo de crescimento dependente de modificações coordenada nos níveis de fito homônios presentes no interior das raízes, esses fito-homônios influenciam tanto na iniciação da nodulação (organogênese) quanto no crescimento das raízes (OLDROYD et al., 2011). Os nódulos apresentam, internamente, cor rósea intensa quando em plena atividade, devido a presença da leghemoglobina, cuja função é o transporte de oxigênio, do mesmo modo que a hemoglobina humana.

Diversos autores mostram o desencadeamento de mecanismos de defesa de leguminosa quando estas são inoculadas com rizóbios. Em alguns casos parece que determinadas plantas são imunes ao processo de infecção por rizóbios, é o caso do processo de infecção da semi-planta aquática *Sesbania rostrata* (gabaceae) e de plantas do gênero *Aeschynomene* (gabaceae), onde se observou que a morte celular maciça é uma reminiscência da resposta de hipersensibilidade a patógeno.

2.7.2 Fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas

Estudos relacionados a fixação biológica de nitrogênio tem demonstrado a existência de uma grande diversidade de microrganismos isolados de várias espécies de plantas forrageiras, cereais e frutíferas. Diversas plantas tropicais da família Poaceae abrigam bactérias fixadoras de nitrogênio dentro de seu caule e rizoma que podem contribuir para a nutrição nitrogenada da planta hospedeira. Em Poaceae agronomicamente importantes, como a cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*), Arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) sorgo (*Sorghum bicolor*), milho (*Zea mays*), *Panicum maximum*, *Brachiaria spp.*, e *Pennisetum purpureum* são encontradas numerosas bactérias diazotróficas, tais como, *A. diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp.* e *Azospirillum spp.*

Existem estudos que mostram a ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas (*Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*) em poaceas (*Ammophila arenaria* e *Elymus mollis*) usadas em estabilização de dunas, por exemplo, (DALTON et al., 2004).

Além da família Poaceae outras famílias de plantas de interesse agrícola também abrigam bactérias diazotróficas que promovem o crescimento de plantas. Em trabalho

utilizando plantas de banana (*Musa spp*) e bactérias tipo *Herbaspirillum* e *B. cepacia*. Weber e colaboradores (2000) avaliaram o crescimento de mudas micropropagadas de banana e constataram que a inoculação de bactérias diazotróficas do tipo *Herbaspirillum* e do tipo *Burkholderia* propiciam melhor crescimento.

2.8 Bactérias envolvidas com plantas

2.8.1 Diazotrófos associativos

Bactérias do gênero *Sphingomonas*, que ainda não tiveram posicionamento taxonômico correto foram descritas em associação com raízes de arroz. (XIE & YOKOTA, 2006).

As bactérias mais estudadas que se enquadram nessa categoria são as do gênero *Azospirillum*. Os estudos com as bactérias denominadas associativas levaram a descoberta do gênero *Azospirillum*, inicialmente com duas espécies: *A. lipoferum* (sinônimo de *Spirillum lipoferum*) e *A. brasilense*, encontradas em gramíneas forrageiras e cereais cultivados em diversos países de clima tropical e temperado. O genoma completo da estirpe *A. brasilense* Sp245, isolada de raiz de trigo cultivado no Brasil, está sendo sequenciado por consórcio de laboratórios nos EUA. Dados baseados no sequenciamento de 96% do genoma mostram que a estirpe Sp245 apresenta mais de 6000 genes (diversos replicons circulares e lineares e plasmídeos), genes individuais e ilhas genômicas, presença de nitrogenase alternativa de Mo-Fe e Vanádio-Fe, cinco sistemas de quimiotaxia, dois sistemas de flagelos, grupo adesão de pili (adesão a raiz), além de genes envolvidos na degradação de polímeros de plantas (alfa-amilase, celulases pectinases) e degradação de benzoato, dentre outros (BALDANI et al., 1983; TARRAND et al., 1978; BALDANI et al., 1999; ULRICH et al., 2007).

A espécie do gênero *Azospirillum*, denominada *A. amazonense*, foi descrita por Magalhães et al. (1983), ao mesmo tempo isolada de raízes de gramíneas forrageiras crescidas nos Estados do Amazonas e Rio de Janeiro, e posteriormente, de raízes dos cereais arroz, milho e sorgo, em plantas crescidas no Estado do Rio de Janeiro, correndo também em outras gramíneas como a cana-de-açúcar, onde altas populações desta bactéria têm sido detectadas (BALDANI et al., 1999). Esta mesma espécie pode ocorrer em raízes de diversas espécies de capim como, por exemplo, *Brachiaria* (*B. humidicola*, *B. decumbens* e *B. brizantha*), capim Corona (*Elyonurus muticus*) Mimoso (*Axonopus purpusi*), arroz e cana-de-açúcar cultivada na Argentina (REIS JUNIOR et al., 2004; PEDRAZA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008). Possui a capacidade de usar sacarose como fonte de carbono, característica que a diferencia das outras espécies, é

intolerante ao meio alcalino e possui menor diâmetro da célula (MAGALHÃES et al., 1983).

Estudos mais recentes confirmaram a diversidade genética de estirpes de *A. amazonense* isoladas de arroz, milho e sorgo, na qual a planta hospedeira influencia significativamente na estrutura da população dessa espécie, principalmente as estirpes isoladas do interior das raízes (AZEVEDO et al., 2005).

Diversas outras espécies de *Azospirillum* foram descritas em diferentes regiões da terra: *A. halopraeferens*, isolado da gramínea *Kallar grass*; *A. irakense*, isolado de arroz cultivado no Iraque, *A. largimobile*, com uma estirpe isolada de lago na Austrália e *A. doebereineriae*, isolado de forrageira C4- *Miscanthus*, crescida na Alemanha. *A. oryzae*, é constituída por uma única estirpe, isolada de raízes de arroz, esta estirpe se desenvolve usando o hidrogênio como substrato, *A. melinis*, isolada do capim gordura (*Melinis minutiflora*) (poaceae), crescido em solos pobres de região tropical na China *A. zae* e *A. canadense*, ambas isoladas da rizosfera de milho (REINHOLD et al., 1987; KAMMAS et al., 1989; DEKHIL et al., 1997; ECKERT et al., 2001; XIE e YOKOTA, 2005c; PENG et al., 2006; MEHNAZ et al., 2007a; MEHNAZ et al., 2007b).

2.8.2 Diazótrofos endofíticos

Diversos organismos que vivem em associação com vegetais são considerados endofíticos, micorrizas, bactérias do gênero *Rhizobium* ou ainda alguma bactérias fixadoras de nitrogênio que não formam nódulos são exemplos de endofíticos. Micorrizas são distintos de outros endófitos pelo fato de possuírem estruturas externas como hifas. Da mesma forma, as bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium* se distinguem de outros endofíticos, pois, formam estruturas externas denominadas nódulos. (AZEVEDO et al 2000).

Historicamente, bactérias diazotróficas foram relatadas a pouco mais de duas décadas, porém, o termo endofítico foi empregado no contexto da pesquisa com bactérias fixadoras de nitrogênio associadas com gramíneas forrageiras e cereais a apenas uma década (DOBREINER, 1992). A denominação endofítico engloba microrganismos, que ao menos em um período do seu ciclo de vida, coloniza os tecidos internos das plantas sem que cause a elas nenhum dano aparente (AZEVEDO et al., 2000).

As primeiras bactérias endofíticas descobertas pertenciam ao gênero *Herbaspirillum*, estas foram isoladas a partir de rizosfera de plantas de milho, arroz e sorgo como também do solo. *H. seropedicae* *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *H.*

frisingense a partir de isolados obtidos de raízes e folhas de gramíneas forrageiras crescidas na Alemanha e no Brasil (KIRCHHOF et al., 2001; BALDANI et al., 1986). Alguns estudos citam a presença de 4940 genes envolvidos com sistemas de secreção (tipo I, II e III), absorção de íons inorgânicos, fontes de nitrogênio (amônia, nitrato, d-glutamato), fontes de carbono (ácidos orgânicos ou monossacarídeos), C-4 dicarboxilato, dentre outros (PEDROSA e GENOPAR CONSORTIUM, 2007).

O gênero *Burkholderia* constituído pelas espécies *B. vietnamiensis*, que foi isolada da rizosfera de raízes de plantas de arroz cultivadas no Vietnã. *B. unamae* encontrada em milho, cana-de-açúcar e café cultivados no México; *B. tropica* isolada de plantas de cana-de-açúcar, milho e teosinto, crescidas no Brasil, México e África do Sul da rizosfera; *B. silvatlantica*, associada a plantas de cana-de-açúcar e milho crescidas no Brasil (PERIN et al., 2006; CABALLERO MELLADO et al., 2004; REIS et al., 2004).

O gênero *Gluconacetobacter* engloba as espécies: *G. azotocaptans* e *G. johannae*, *G. diazotrophicus* e *G. kombuchae*, (DUTTA & GACHHUI, 2007; GILLIS et al., 1995)

2.8.2.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

G. diazotrophicus é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica obrigatória e não-formadora de esporos. Possui formato de bacilo com extremidades arredondadas. Suas células se movem por meio de flagelos peritríqueos ou laterais, sem movimento espiralado. Elas podem se apresentar de modo isolado, em arranjos de diplobacilos ou em cadeias de tamanho variável (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; STEPHAN et al., 1991)

G. diazotrophicus foi inicialmente isolada a partir de raízes e talos de variedades de cana cultivadas no Nordeste (PE e AL) e Sudeste (SP e MG) do Brasil (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). Não foi detectada em amostras de solo coletadas entre linhas de cana ou nas raízes de plantas daninhas cultivadas em canaviais nem no grão de sorgo sacarino. Elas são endofíticas obrigatórias devido provavelmente as condições que a planta as oferece. A planta fornece, por exemplo, fotossintato para a alimentação das bactérias, em seu interior uma planta pode proporcionar uma baixa concentração de enxofre ambiente, que é necessária para a expressão do O₂, além disso, as bactérias endofíticas não terão que competir com outros micróbios do solo para recursos escassos (JAMES et al., 2000; DÖBEREINER et al., 1988).

É encontrada habitando tanto plantas que são propagadas vegetativamente, como em plantas que se propagam por sementes. *G. diazotrophicus* foi detectado

também em insetos sugadores que habitam canaviais e em esporos de fungos micorrízicos coletados de raízes de batata-doce (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; PAULA et al 1990; ASHBOLT e INKERMAN, 1990; PAULA et al., 1991; FUENTES-RAMIREZ et., al., 2001; MUTHUKURAMASAMY et al., 2005; MEHNAZ et al., 2006; BALDANI et al., 2002; TAPIA-HERNANDEZ et al., 2000).

O crescimento da bactéria ocorre em temperatura ótima de 30 °C e o pH ótimo é 5,5. *G. diazotrophicus* exibe fixação de nitrogênio microaeróbica e de modo distinto das demais bactérias diazotróficas. *G. diazotrophicus* não cresce em meios com valores de pH superiores a 7,0, enquanto a FBN pode ocorrer em pH tão baixo quanto 2,5, apesar de menos eficiente nesta condição, podendo causar mudanças na anatomia e na fisiologia da planta. A promoção do crescimento causada por *G. diazotrophicus* de plantas pode estar relacionada a tais mudanças na fisiologia da planta. As mudanças na anatomia podem ocorrer na região das raízes laterais, aumentando o número de raízes emitidas, podendo ocorrer também mudanças na geometria das raízes proporcionando aumento do sistema radicular como um todo. (BALDANI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2002; (CAVALCANTE e DÖBEREINER et al., 1988). ;STEPHAN et al., 1991; LIMA, BODDEY, J. DÖBEREINER, 1987)).

Estudos mostraram que o *G. diazotrophicus* secreta em cultura líquida, uma proteína do tipo bacteriocina (atividade lizossímica) com capacidade de inibição do crescimento do fitopatógeno causador da esculadadura da folha (*Xantomonas. Albilineans*) em meio sólido (PIÑÓN et al., 2002). A inoculação com *G. diazotrophicus* também pode auxiliar na diminuição de efeitos patogênicos da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em dois genótipos de cana-de-açúcar com suscetibilidade distintas ao raquitismo da soqueira no Brasil (CARNEIRO, 2006). Dentre outras características *G. diazotrophicus* usa diferentes fontes de carbono, cresce em pH 5,5 e não possui enzima nitrato redutase (STEPHAN et al., 1991). A atividade da nitrogenase não é inibida ou reprimida por altas concentrações (25 mM) de nitrato, mas é parcialmente inibida por NH_4^+ (TEIXEIRA et al., 1987, STEPHAN et al., 1991).

As raízes das plantas abrigam uma grande diversidade de microrganismos que têm um papel essencial no funcionamento do ecossistema, bactérias endofíticas se distribuem por todas as partes das plantas e em folhas de plantas adultas o xilema é o principal local de bactérias, embora com uma ligeira resposta do hospedeiro. *G. diazotrophicus* pode também ser ligeiramente patogênica, quando inoculado em números elevados (DÖBEREINER et al., 1992; BALDANI et al., 1997; JAMES &

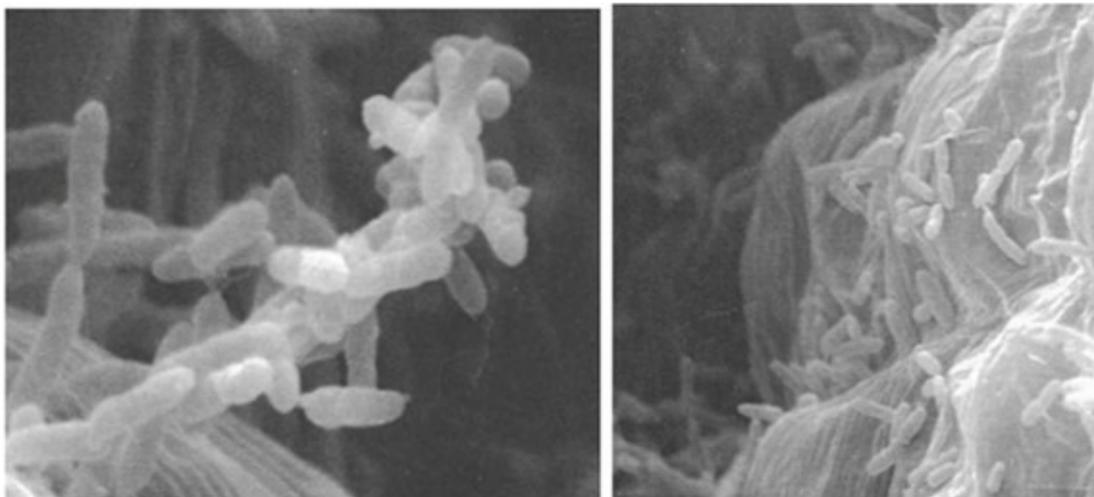
OLIVARES 1997; JAMES e OLIVARES, 2000; BLANCO et al., 2005; VANDENKOORNHUYSE, et al., 2007).

Propõe-se que, nas condições experimentais, *G. diazotrophicus* em primeiro lugar colonizaram as superfícies radiculares e em menor escala as superfícies epidérmicas do tronco e depois usam as pontas e as junções de raízes laterais para entrar na planta de cana-de-açúcar (PERIN et al.,1994)

Quanto a localização da *G. diazotrophicus* é conhecida como um endófito que coloniza os tecidos radiculares e a parte aérea de cana-de-açúcar (JAMES et al., 1994). Na superfície radicular, a bactéria se concentra nas regiões de junção das raízes laterais. Dentro da raiz, localiza-se no interior de células da epiderme e no apoplasto do colmo da cana-de-açúcar. A bactéria é encontrada ainda dentro dos vasos de xilema, através do qual migra para parte aérea por fluxo induzido pela transpiração vegetal (DONG et al., 1994).

Em cana de açúcar devido ao baixo teor de oxigênio presente neste tecido, condição necessária para funcionamento da nitrogenase, no ambiente dos vasos do xilema é encontrada a maior população de *G. diazotróphicus*, figura 2.

Figura 2- Micrografias eletrônicas de transmissão de *Gluconacetobacter diazotrophicus* dentro de cana de 10 dias após a inoculação de raízes.



Quanto ao metabolismo de carbono *G. diazotrophicus* pode utilizar sacarose, de modo que a bactéria suporta variações na concentração mais favorável ao seu crescimento de 10% a 30%, sendo 10% a concentração mais favorável (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). No entanto, o maior crescimento da bactéria

ocorre em gluconato, seguido por glicose, glicerol e então, sacarose (URETA et al., 1995). *G. diazotrophicus* é ainda capaz de metabolizar diversos outros compostos como os monossacarídeos frutose, galactose e xilose.

2.9 Controle biológico (insetos e microrganismos)

O controle biológico usando microrganismos introduzidos com a capacidade para provocar resistência sistêmica induzida (RSI) contra doenças de plantas tem sido extensivamente estudado em casa de vegetação e em campo contra o ataque de inseto herbívoro e agente patogênico. Para isso os microrganismos, podem, por exemplo, produzir compostos orgânicos voláteis e outros metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de insetos herbívoros, ou ainda podem produzir antibióticos que combatem agentes patogênicos de plantas (PINEDA et al., 2012; PANKA et al 2013; (JETIYANON e KOEPPER 2002)

Plantas de azevem perene (*Lolium* sp.) (Poaceae) inoculadas por endófitos produzem diversos alcalóides que conferem benefícios à planta hospedeira, principalmente resistência a insetos, no entanto, estes mesmos alcalóides também podem ser tóxicos para mamíferos herbívoros (EASTON e FLETCHER et al 2007). De acordo com Panka e colaboradores (2013) plantas de azevem perene associadas com o fungo endofítico *N. lolii* e infectadas com o agente patogênico *Fusarium poae* foram capazes de produzir compostos orgânicos voláteis e compostos fenólicos de defesa em maior quantidade do que plantas apenas infectadas com o patógeno *Fusarium poae* não associadas com o endófito.

Zhao e colaboradores (2010) em estudo com o endofítico *Bacillus vallismortis* ZZ185 demonstrou que este possui atividade antifúngica contra *F. graminearum* e *Alternaria alternata*, que são patógenos causadores de doenças do sistema radicular do trigo. Essa atividade reduziu por volta 90% os sintomas para *F. graminearum* e 50% dos sintomas para *A. alternata*.

Jetiyanon e Koepper (2002) selecionaram misturas de estirpes de RPCPs que possuíam a capacidade de induzir resistência sistêmica em quatro hospedeiros contra doenças específicas. As doenças e os hospedeiros específicos testados em seu estudo incluíram: murcha bacteriana do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (Solanaceae) causada por *Ralstonia solanacearum*, antracnose de pimenta caiena longa causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, tombamento de verde kuang futsoi (*Brassica chinensis* var. *parachinensis*) (Brassicaceae) causadas por *Rhizoctonia solani* e o vírus do mosaico do pepino (CMV) em pepino (*Cucumis sativus*) (Cucurbitaceae). Os resultados

indicaram que o tratamento com RPCPs reduziu significativamente a gravidade de todas as quatro doenças em relação ao controle não inoculado.

Os primeiros relatos com relação ao controle de insetos praga executado por microrganismos endofíticos datam da década de 1980. Neste período os trabalhos eram voltados para casos que envolviam a interação entre fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras como também aos insetos praga que atacavam estas plantas. Neste período se demonstrou a existência de uma possível proteção de plantas contra insetos herbívoros advinda da interação entre fungos endofíticos e a planta hospedeira. Neste mesmo período iniciaram-se pesquisas relacionadas aos mecanismos envolvidos nessa proteção e as variáveis pertinentes ao processo.

Os trabalhos de Weber e colaboradores (1981) e Claydon e colaboradores (1985) foram os primeiros a demonstrar que os fungos endofíticos da família Xilariaceae como *phomopsis oblonga* eram capazes de controlar o ataque de insetos. Trabalhos realizados com plantas de Ameiro (*Alnus* sp.) (Botulaceae) e espécie do gênero *Fagus* (*Fagoceae*), foi observado que o combate aos insetos ocorria por intermédio de metabólitos secundários produzidos por esses fungos. (AZEVEDO et al., 2007; Werber et al., 1981; CLAYDON et al., (1985)

G. diazotrophicus apresenta atividade contra o patógeno *Colletotrichum falcatum*, causador da podridão vermelha em cana-de-açúcar. In vitro inibição do crescimento da bactéria causa o controle do patógeno. (MUTHUKUMARASAMY et al., 2000).

Arencibia e colaboradores (2006) em trabalho envolvendo *G. diazotrophicus* e *Xanthomonas albilineans* verificaram que *G. diazotrophicus* possuía e / ou produzia moléculas elicitoras que ativam a resposta de defesa da cana-de-açúcar, resultando na resistência de plantas a *X. Albilineans*. Nesse trabalho, os autores identificaram um total de 47 fragmentos de transcritos expressos diferencialmente (derivado TDFS) que foram identificados por cDNA-AFLP. Transcrições mostraram homologias significativas com os genes da via de sinalização de etileno (26%), proteínas reguladas por auxinas (9%), 1,3-β proteínas Glucanase (6%) e genes de ubiquitina (4%). Os resultados apontam para uma forma de indução de resistência sistêmica devido a interações de *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar que protegem a planta contra o ataque de *X. albilineans*.

O papel de etileno na simbiose leguminosa-rizóbios tem afinidade de manter o número de nódulos das bactérias em níveis controlados. Arencibia e colaboradores (2006) sugerem que as gramíneas também podem utilizar a via de etileno (incluindo

também outra síntese de proteína induzida por este hormônio) para controlar o número de células de *G. diazotrophicus* colonizadoras seus tecidos. É possível sugerir que o controle da população de endofíticos mantém a defesa da planta em estado de alerta. Esse status permanente de "vigilância", produzido pela planta de sinalização, poderia incluir a expressão de proteínas de defesa, originando uma forma de resistência sistêmica em cana. *G. diazotrophicus* pode induzir os mecanismos de proteção específicos de cana de açúcar, tal como a indução da via de etileno, que normalmente não será disparado por um microrganismo patogênico. A identificação de várias proteínas relacionadas com o metabolismo, incluindo o processo de divisão celular e via das pentoses fosfato indicam que em *G. diazotrophicus* as células estariam ativas e em replicação. Eles também incluem proteínas envolvidas no metabolismo de hidratos de carbono (tais como aconitato hidratase, frutose-1,6-bisfosfato-aldolase, enolase, fosfoacetolase proteína bifuncional, transaldolase / fosfoglucose isomerase, e transcetolase).

2.10 Interação planta microrganismos e análise metabolômica por RMN

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tornou-se uma ferramenta analítica de grande valia para a detecção de uma ampla gama de compostos envolvidos na resistência de plantas hospedeiras. Apesar de ser menos sensível do que outras técnicas (espectrometria de massa (MS) p.e.). A RMN é uma técnica complementar poderosa para a identificação e análise quantitativa dos metabolitos de plantas seja *in vivo* ou em extratos de tecido. (KRISHNAM et al., 2004)

As plantas interagem com uma série de organismos em diferentes ambientes abaixo e acima do solo sejam esses organismos, insetos, microrganismos patógenos ou simbiontes (BEZEMER e VAN DAM, 2005; PINEDA et al., 2010). As interações multitróficas causam variação nas respostas bioquímicas da planta de modo a tornar, as interações planta-hospedeiro extremamente interessantes em termos de riqueza de metabolitos, como também no que diz respeito à enorme diversidade de diferentes classes químicas e também em termos de identificar as alterações de metabolitos individuais associados com o hospedeiro em interação com outros organismos dentro de um sistema dinâmico (ALLWOOD et al., 2007).

Os metabolitos de um determinado organismo refletem os processos celulares que controlam o fenótipo bioquímico da célula, tecido ou do organismo inteiro. Quando se faz uma medição de metabolitos intracelulares, seja ela quantitativa ou qualitativa, o objetivo que se deseja é o de mapear o estado bioquímico de um organismo e

proporcionar uma imagem metabólica clara de um organismo vivo sob certas condições. (ALLWOOD et al., 2007). Assim, devido à alta complexidade do metaboloma é mais corente buscar uma visão geral dos metabólitos de um organismo ao invés de identificar todos os seu metabólitos individualmente (KIM et al., 2010). Além disso, o número de metabólitos deve ser menor que o número de genes e de proteínas em uma célula (DUNN e ELLIS, 2005).

Neste contexto, RMN é um método adequado para realizar tal análise, pois permite a detecção simultânea de diversos grupos de metabólitos secundários (flavonóides, alcalóides, terpenóides e etc), além de metabólitos primários (açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos). Além disso, em um espectro de RMN, os sinais são proporcionais a sua concentração molar, possibilitando a comparação direta das concentrações de todos os compostos possíveis, sem a necessidade do uso de curvas de calibração de cada composto individual, refletindo os níveis molares reais de metabólitos presentes em uma planta. Adicionalmente, RMN é uma técnica muito útil para a elucidação da estrutura. Usando várias medições de RMN bidimensionais, muitos sinais pode muitas vezes ser identificados sem a necessidade de fracionamento adicional do extrato. (KIM et al., 2010)

A RMN é capaz de detectar moléculas (metabólitos) com um ou mais átomos com um momento magnético não nulo, sendo que estes metabólitos possuem isótopos com momentos magnéticos não nulos (^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , e ^{31}P), as moléculas biologicamente importantes têm pelo menos um sinal de NMR. Tais sinais são caracterizados pela sua frequência (deslocamento químico), intensidade, resolução e propriedades de relaxação magnéticas, os quais refletem o ambiente preciso do núcleo detectado. Assim, os espectros de RMN, muitas vezes contêm uma variedade de informações sobre a identidade das moléculas da amostra, e é nesta base que RMN pode ser utilizado para identificar e quantificar os metabólitos nas amostras de origem biológica (KRISHNAM et al., 2004).

O espectro de RMN (especificamente o deslocamento químico) depende do efeito de blindagem dos elétrons do núcleo. O deslocamento químico para ^1H -RMN é determinado como a diferença (em ppm) entre a frequência de ressonância do próton observada e de uma referência de prótons presentes num composto de referência (para experiências de ^1H RMN, tetrametilsilano em solução, é fixado em 0 ppm). Os deslocamentos químicos medidos variam de 0-10 ppm para ^1H ; e de 0-250 ppm para ^{13}C . A intensidade do sinal depende do número de núcleos idênticos, e a presença de

amostras complexas não interfere com a intensidade medida como a supressão de ionização, o que permite execução de quantificações (DUNN & ELLIS, 2005).

Espectroscopia de RMN é uma técnica de impressão digital, de alto rendimento, rápida e que requer pouca manipulação da amostra. As amostras brutas são misturadas com uma solução contendo um composto de referência (por exemplo, tetrametilsilano dissolvido em D₂O para ¹H RMN), adicionadas a uma sonda de RMN (que geralmente tem menos do que 2 ml), inserido dentro do instrumento e analisados (DUNN & ELLIS, 2005).

Para o processamento de dados, devido a sua complexidade, o espectro é geralmente dividido em (buckets) de deslocamentos químicos com larguras de 0,02-0,04 ppm. Todos os sinais neste segmento são somados. Os deslocamentos químicos podem ser atribuídos a metabólitos específicos e metabólito puro pode ser adicionado para mais esclarecimentos.

Para análise dos dados oriundos dos espectros de qualquer técnica de impressão digital podem ser usados métodos de métodos multivariados de reconhecimento de padrões não supervisionados ou métodos supervisionados que são diferenciados pelo conhecimento prévio de grupos (DEFERNEZ & COLQUHOUN, 2003). O uso dessas técnicas requer a construção de uma matriz de dados X, contendo observação de N vetores linha de K variáveis cada e é quase universalmente comum a todas. A matriz de dados X pode ser imediatamente decomposta usando os métodos de redução de dimensionalidade não supervisionados, tais como PCA, ou pode ser combinada com uma matriz Y de N correspondente a saídas M-dimensionais para a utilização na redução de dimencinalidade supervisionada, usando regressão PLS e derivados. (WORLEY & POWERS, 2013).

Chamam e colaboradores (2013) ao trabalharem com análise metabolômica por HPLC estudaram a influencia de duas diferentes estirpes de *Azospirillum* (*A. lipoferum* 4B e *Azospirillum* sp. B510) em diferentes cultivares de arroz (*Nipponbare* e *Cigalon*), mostraram que o perfis de metabólitos secundários de arroz foram modificados em resposta a inoculação de RPCPs, com compostos fenólicos, como flavonóides e derivados hidroxicinâmicos, sendo os principais metabólitos afetados. Além disso, alterações metabólicas nas plantas diferiu de acordo com a estirpe de *Azospirillum* e combinações de cultivares; de fato, onde a estirpe 4B induziu grandes modificações em seu perfil metabólico secundário somente em raízes na cultivar *Cigalon*, a B510,

provavelmente devido a sua característica endofítica, induziu variações metabólicas em brotos e raízes das duas cultivares, desencadeando uma resposta sistêmica.

Walker e colaboradores (2011) compararam os impactos da inoculação de três estirpes de *Azospirillum* em perfis de metabólitos secundários de duas cultivares de milho (*Zea mays*) (poaceae) e verificaram que ocorreram alterações no perfil de metabólitos secundários das plantas dependendo da tensão da associação, sugerindo que nesse tipo de associação ocorre o estabelecimento de interações complexas entre *Azospirillum* de plantas milho dependente da estirpe de da cultivar de milho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Em todos os experimentos foi utilizada a cultivar SP79-1011 de cana-de-açúcar fornecida pela a Usina Triunfo Agroindustrial LTDA, localizada no município de Boca da Mata, estado de Alagoas, a 132 m de altitude e coordenadas geográficas de 09° 38' 27,6'' de latitude sul e 36° 13' 12, '' de longitude oeste.

As canas foram coletadas manualmente seguindo procedimento adotado pela equipe de trabalho da própria usina.

3.2 Microrganismos

As duas estirpes de bactérias usadas no presente trabalho previamente selecionados foram *Gluconacetobacter diazotrophicus*. e *Azospirillum* sp. fornecidas pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ, Brasil), cultivadas como descrito a seguir.

3.3. Carreador Polimérico de inoculante

Como carreador de células básicas foi utilizado uma mistura em CMC (carboximetilcelulose), um polímero a base de celulose que atua como espessante, estabilizador aniônico e sequestrador de água a baixa temperatura, e amido que é utilizado como fonte de carbono e tem boa estabilidade e resistência térmica. O gel formado pela mistura apresenta boa resistência mecânica, porém os polímeros usados por serem pouco miscíveis entre si, apresentaram a necessidade da adição de um agente de acoplamento como óxido de magnésio (MgO) para evitar separação de fase e melhorar a adesão entre o polímero e as moléculas. Esta mistura de carreadores foi então dispersa em água a diferentes concentrações para o preparo de suspensões líquidas coloidais, para uma concentração final de 2 g.L⁻¹. Amostras de 9,0 ml destas formulações foram colocadas em bolsas seladas de 0,05 milímetros de espessura de polipropileno em que uma agulha hipodérmica previamente autoclavada a 121 °C foi

introduzida. Em seguida 1mL do inoculante contendo a mistura das duas estirpes foi adicionado a cada carreador (SILVA et al., 2012).

3.4 Preparação dos microrganismos e inoculantes

As cepas foram cultivadas em meio de cultura líquido DYGS (em g.L⁻¹: glicose, 2,0; ácido málico, 2,0; extrato de levedura, 2,0; ácido glutâmico, 1,5; peptona, 1,5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄, 0,5) em frascos de Erlenmeyer com capacidade volumétrica de 1,0 L de volume, em agitador orbital (120 rpm) a 30 °C. As duas estirpes foram misturadas e a densidade das células foi ajustada para o mesmo número de células. Então, 1 mL desta mistura contendo aproximadamente $2,0 \times 10^9$ células (contadas usando uma câmara de contagem de bactérias do tipo Petroff-Hausser) foram adicionados às bolsas de polipropileno usando uma seringa e agulha hipodérmica. A agulha foi retirada e o orifício foi selado com fita adesiva, sendo as bolsas armazenadas a 24 °C em sala fechada por um período de até 120 dias, simulando armazenamento prolongado (SILVA et al., 2012).

No LPqRN (Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais- UFAL) as bactérias foram transferidas para tubos de polipropileno com capacidade volumétrica de 50 mL previamente esterilizados. A transferência foi efetuada em capela de fluxo laminar vertical, previamente desinfetado com solução de etanol 70% e luz UV durante 50 minutos.

3.5 Procedimento para inoculação das bactérias diazotróficas

Colmos de cana-de-açúcar foram cortados em toletes com tamanho variável de 5 a 10 cm. Os toletes foram imersos em béqueres com capacidade volumétrica de 2 litros contendo a solução do inóculo a qual foi constituída de mistura entre água potável e inóculo (bactérias diazotróficas) na proporção de 1 L:40 mL. Os toletes foram incubados em banho de água, figura 3, por 10 minutos a 34 °C posteriormente procedeu-se o plantio. Plantas controle seguiram o mesmo tratamento exceto a adição do inóculo.

Figura 3- Inoculação das Estirpes em toletes de cana de açúcar em bequeres a 34 °C.



Foto: (Autor, 2015)

3.6 Plantio da cana-de-açúcar

Após tratamento com inóculo, os toletes foram plantados através de propagação de entrenós, cultivadas em copos plásticos de 500 mL contendo substrato a base de fibra de coco (Bioplant Nova Ponte, Minas Gerais, Brasil). As canas-de-açúcar desenvolveram-se em casa de vegetação sob condições de temperatura e umidade controladas, onde receberam os devidos tratos culturais. Na base dos copos plásticos foram abertos orifícios para o escoamento de possível excesso de água.

Figura 4 – a) copos com substrato para plantio de toletes de cana.

b) Mudas de cana-de-açúcar em desenvolvimento.

a)

b)



Foto: (Autor, 2015)

3.7 Obtenção e manutenção de *Diatraea saccharalis*

Os insetos foram adquiridos junto a Usina Triunfo Agroindustrial LTDA. Para os experimentos com e sem chance de escolha foram utilizadas lagartas de terceiro ínstar . As lagartas foram mantidas em tubos de vidro com dieta artificial figura 5, porém, três dias antes do experimento, as lagartas foram privadas da alimentação. As lagartas foram mantidas em recipientes de vidro, sem alimentação, contendo somente algodão umedecido com água destilada. A privação de alimentação foi usada para garantir que as lagartas brocassem a cana durante os experimentos.

Figura 5: Tubos de vidro com *Diatraea saccharalis* em dieta artificial



Foto: (Autor, 2015)

3.8 Bioensaios sem chance de escolha

Afim de avaliar a resistência do tipo antibiose, a taxa de crescimento das lagartas foi avaliada pela realização de um bioensaio sem chance de escolha para alimentação. O bioensaio foi realizado colocando-se a lagarta na base da planta e deixando-a brocar por um período de cinco dias. Após esse período, as lagartas foram cuidadosamente removidas do interior do colmo com auxílio de uma pinça. A taxa de crescimento das lagartas foi calculada a partir da diferença do peso das mesmas antes e após sua introdução nas. Para manter a lagarta na base do colmo da planta, utilizou-se uma gaiola telada. Cada repetição foi composta por dez plantas de cada tratamento e uma lagarta por planta. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística utilizando o teste de wilcoxon.

Figura 6 - Plantas com gaiolas teladas para realização do bioensaio sem chance de escolha.



Foto: (Autor, 2015)

3.9 Bioensaios com chance de escolha

O comportamento de preferência pela planta esposta a herbivoria planta hospedeira foi investigado utilizando uma arena de vidro com possibilidade de escolha entre duas plantas oriundas de dois distintos tratamentos (controle e inoculadas). A arena de vidro consistiu em uma estrutura em formato de cubo com duas aberturas circulares na base, por onde as plantas foram cuidadosamente inseridas para evitar que fossem danificadas, de modo que a base do colmo ficou na altura da base do cubo (figura 7). As lagartas foram liberadas no centro da arena apenas 1 lagarta por vez. Avaliou-se então a preferência das lagartas entre plantas inoculadas e não inoculadas. O período de observação permitido para as escolhas foi de 30 minutos. Quando não havia escolha as lagartas eram retiradas da arena que eram então higienizadas. O bioensaio foi realizado em sala contendo luz infravermelha. Este bioensaio foi composto de 18 repetições (9 plantas por tratamento). O teste estatístico usado para o bioensaio com chance de escolha foi o teste t.

Figura 7- Arena com as plantas dos dois tratamentos para o bioensaio com chance de escolha



Foto: (Autor, 2015)

3.10 Coleta dos metabólitos voláteis emitidos

Os Metabólitos orgânicos voláteis emitidos pela parte aérea das plantas inoculadas e não inoculadas foram coletados por aeração em experimentos com e sem infestação com *D. saccharalis* (Figura 8)

Figura 8: Plantas em processo de aeração



Foto: (Autor, 2015)

A parte aérea das plantas foi envolta por sacos de poliéster como descrito por Stewart-Jones e Poppy (2006) onde foi injetado ar no saco plástico passando antes por um filtro de carvão ativado a um fluxo de 700 mL/min por planta. Tubos de vidro com o adsorvente Porapak Q (80/100 mesh, 0,05 g; Supelco) (Figura 9) foram introduzidos na parte superior para que o ar fosse coletado a uma vazão de 400 mL/min para cada planta. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a

espectrometria de massas (CG/EM), utilizando coluna DB-5 (30m x 0,25 mm i.d. x 0,25 μm ; J&W scientific) e Hélio como gás de arraste. A programação de análise iniciou com temperatura de 30 °C a 250 °C com uma razão de 8 °C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 °C e 280 °C, respectivamente. A identificação dos metabólitos voláteis foi realizada por comparação dos dados de tempo de retenção e espectros de massas com os bancos de dados disponíveis, índice de Retenção de Kovats e com os perfis de padrões obtidos comercialmente.

Figura 9 - Traps confeccionados com adsorvente Porapak Q usados para a coleta de COVs.



Foto: (Autor 2015)

A aeração ocorreu por um período de 120 horas. Ao término das aerações, os metabólitos foram eluídos com 500 μL de hexano e armazenados a em microtubos de vidro de 1,5mL 20°C até a análise.

3.11. Preparo da amostra para a análise metabolômica (RMN ^1H e RMN 2D homonuclear e heteronuclear).

Para a análise dos metabólitos coletou-se 20 amostras de folhas de plantas de cana-de-açúcar aos 60 dias de idade tratadas com os microrganismo diazotrofos e outras 20 amostras de folhas de cana usadas como controle. O procedimento para RMN 2D foi o mesmo, porém foi analisada uma amostra de cada tratamento.

As folhas foram seccionadas junto ao caule das plantas e imediatamente congeladas em N_2 líquido, armazenadas em temperatura de -80 °C. As amostras foram trituradas em N_2 líquido, secadas e então submetidas a extração. Para a extração pesou-se 50 mg de cada amostra em tubos de 1,5mL (tipo eppendorf) devidamente identificados, onde foi adicionado 500 μL de tampão fosfato (90 mmol/L, pH 6.0), o

qual foi preparado adicionando 1,232 g de KH_2PO_4 e 10 mg de TSP (0,01%) para 100 mL de D_2O e posteriormente 500 μL metanol deuterado. Procedeu-se com a extração por microondas durante 30 minutos e centrifugação a 14000 RPM durante 15 minutos para a remoção dos resíduos sólidos. Posteriormente coletou-se o sobrenadante e procedeu-se com a análise por RMN em tubo adequado para este procedimento.

3.12 Análise por RMN e estatística multivariada

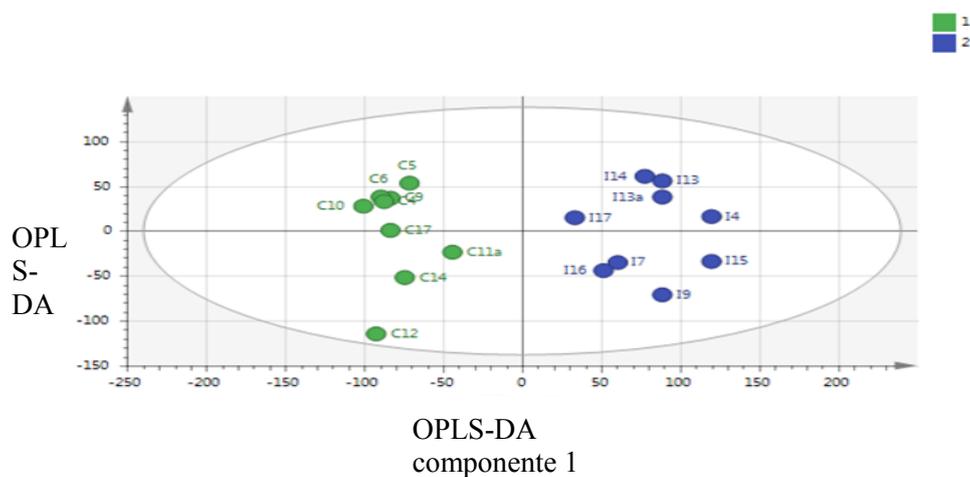
A identificação dos metabólitos não voláteis ocorreu através do uso da técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) $\text{RMN-}^1\text{H}$, os espectros foram obtidos a 25°C em espectrômetro Bruker AVANCE operando a 400 MHz na frequência do hidrogênio. Cada espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ consistiu de 128 pulsos (10 min e 26 s) com tempo de aquisição de 5 s, largura do pulso de $90^\circ = 9,75 \mu\text{s}$, atraso (delay) de relaxamento (RD) de 2 segundos. Foi utilizada a técnica de supressão do sinal da água para reduzir a razão sinal ruído. Os decaimentos livre de indução (FID) passaram por transformadas de Fourier com um line broadening (LB) = 0,3 Hz. O espectro de J-resolvido foi adquirido com 32 pulsos por 128 incrementos em 8K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz e 60 Hz em acoplamento spin-spin com RD = 1,5s. O espectro COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ foi obtido com 32 pulsos por 512 incrementos em 2K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz em ambas as dimensões com RD = 1,5s. Os espectros HMBC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ e HSQC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ foram adquiridos com 64 pulsos por 512 incrementos em 4K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 KHz para o ^1H e 22,149 KHz para o ^{13}C com RD = 1,5s. Os espectros resultantes foram calibrados com o TSP como padrão interno em 0,0 ppm, usando o programa TopSpin RMN (versão 2.1, Bruker). Os espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$ otimizados foram reduzidos (δ 0,3-10,0 ppm) e divididos em regiões de largura (bucket = 0,0004 ppm), normalizados e alinhados através do programa MATLAB versão 2014a. As regiões de δ 4,7-5,0 e 3,24-3,33 δ foram excluídas da análise por causa dos sinais residuais de água e de metanol. A análises estatística efetuada foi a OPLS-DA foi realizado com o software SIMCA-P (versão 14.0, Umetrics, Umeå, Suécia) com escalonamento baseado no método de única variância (UV).

4 RESULTADOS

4.1 Metabolômica

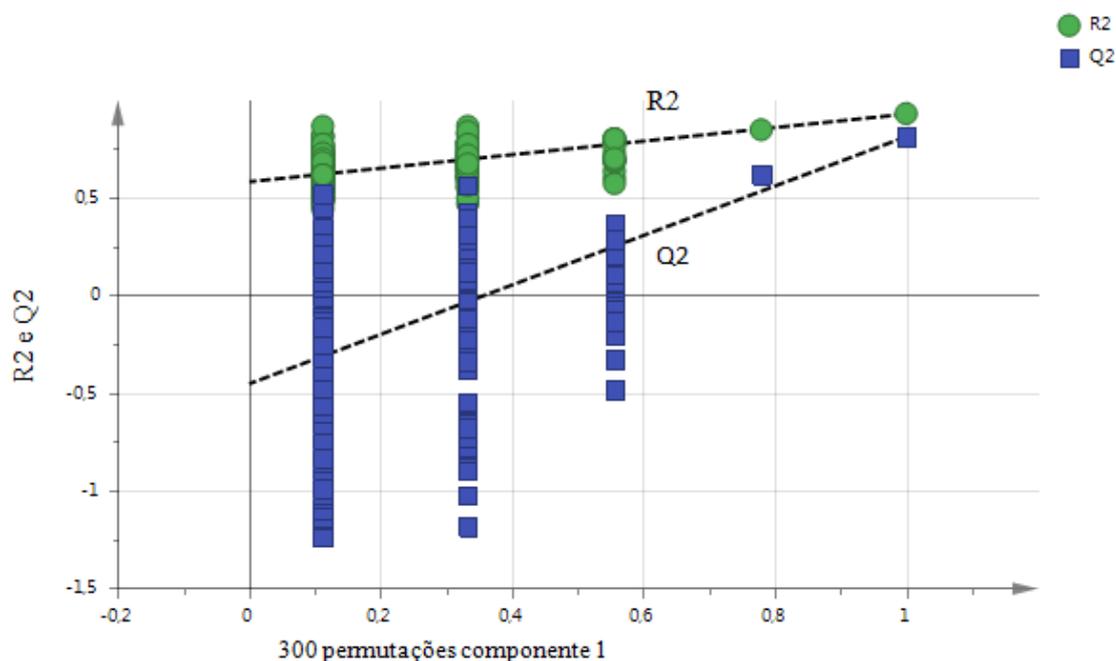
O gráfico de escores de um modelo OPLS (Análise discriminante de Mínimos quadrados Parciais Ortogonais) montado a partir e dados de RMN unidimensional (Figura 10) dos extratos das plantas controle e inoculadas em nosso trabalho, revelaram a separação entre o grupo formado pelas plantas controle e plantas inoculadas. Isto sugere que o sistema metabólico destas plantas é afetado pela inoculação com as RPCPs. Além disso, implica que as plantas possivelmente são capazes de adequar seu metabolismo às condições a que são submetidas, de modo a beneficiar a si próprias como também às RPCPs. Esta constatação é corroborada pelos bioensaios com chance de escolha que mostraram a não preferência das lagartas de *D. sacharalis* pelas plantas inoculadas.

Figura 10: Gráfico OPLS-DA scores plot da primeira componente. 1 - plantas controle (n = 9) e 2 – plantas inoculadas (n = 9)



A OPLS-DA foi aplicada para verificar quais os possíveis metabólitos que discriminam os dois grupos, que são, os compostos com alta correlação e covariância com cada classe. A validação do modelo (figura 11) foi feita aplicando-se o teste de permutação que resultou na variância R^2 de 0,93 e análise de validação cruzada Q^2 de 0,82 (figura 1C) demonstrando a robustez do modelo.

Figura 11: (OPLS-DA): Validação do modelo. $R^2=(0.0, 0,583)$, $Q^2=(0.0, -0,451)$



Como apresentado na figura acima houve uma clara separação entre os grupos, sendo que para valores positivos de $t[1]$ (componente 1) está o grupo de amostras Inoculadas (azul; $n=9$) e para valores negativos de $t_0[1]$ (componente 2) está o grupo de amostras controle (verde; $n=9$). A análise dos loadings plots (carregamentos) resultou nos metabólitos que discriminam cada grupo como mostrado na tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Metabólitos estatisticamente significantes para a discriminação das classes correlação positiva – (plantas inoculadas) Correlação negativa – (plantas controle)

Metabólito	Inoculada	Controle	Deslocamento Químico	Correlação	Multiplicidade
Sacarose	+	-	5.40	0,918	d (H-1)
Glicose	+	-	3.72	0.923	d (H-1)
Ácido gálico	+	-	7.04	0.927	S
Glicina	+	-	3.49	0.925	S
Prolina	+	-	2.08	0.867	
Lactato	+	-	1.315	0.883	d (metila), q (metina)
Fumarato	-	+	6.61	-0,912	S
Aspartato	-	+	2.82	-0.903	m (H2 α), dd (H-2 β)
Desconhecido (Ácido Clorogênico)	-	+	7.43	-0.905	

(s) – simpleto;

(d) – duplete;

(dd) – duplete de duplete;

(m) – multiplete;

(q) – quarteto

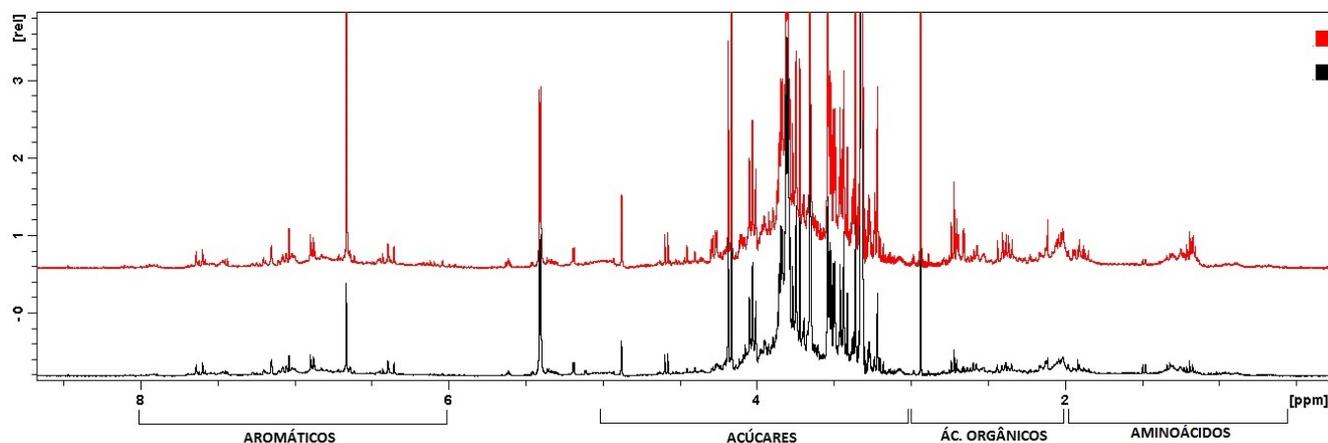
(+)- metabólitos em maior concentração no tratamento.

Fonte: Autor

O espectro de RMN ^1H de extrato de planta geralmente é dividido em 4 regiões de deslocamentos químicos: aminoácidos (0.5 – 2 ppm), ácidos orgânicos (2 – 3 ppm), açúcares (3 – 5 ppm) e aromáticos (6 – 8 ppm). A figura 12 mostra a comparação entre os espectros de RMN- ^1H das plantas inoculadas (vermelho) e plantas controle (preto). A análise desses espectros somente com o experimento de hidrogênio é muito complexa devido à sobreposição de sinais de dezenas de metabólitos, sendo difícil a identificação dos mesmos. Para a identificação dos metabólitos discriminantes (Tabela 1) entre as

plantas controles e plantas inoculadas, análises de ressonância magnética nuclear em duas dimensões (RMN-2D) foram feitas.

Figura 12: Comparação dos espectros unidimensional de RMN-¹H das amostras controle (preto) e inoculadas (vermelho) com as regiões características de algumas classes de metabólitos.



A combinação dos experimentos J-resolvido, COSY (acoplamento homonuclear ¹H - ¹H), HSQC (acoplamento heteronuclear ¹H - ¹³C J¹) e HMBC (acoplamento heteronuclear ¹H-¹³C J^{2,3}) são de fundamental importância para a confirmação dos metabólitos identificados em estudos de metabolômica. A figura 13 mostra um espectro J-resolvido de um espectro pseudo-2D, pois na dimensão horizontal tem-se o deslocamento químico do hidrogênio e na outra dimensão vertical tem-se a constante de acoplamento (J) em Hz. Este experimento é muito útil, pois soluciona os problemas de sobreposição de sinais encontrados no RMN-1H, visto que todos os sinais passam a ser “simpletos” e sendo possível tirar as constantes de acoplamento.

Figura 13: Espectro J-resolvido da amostra controle.

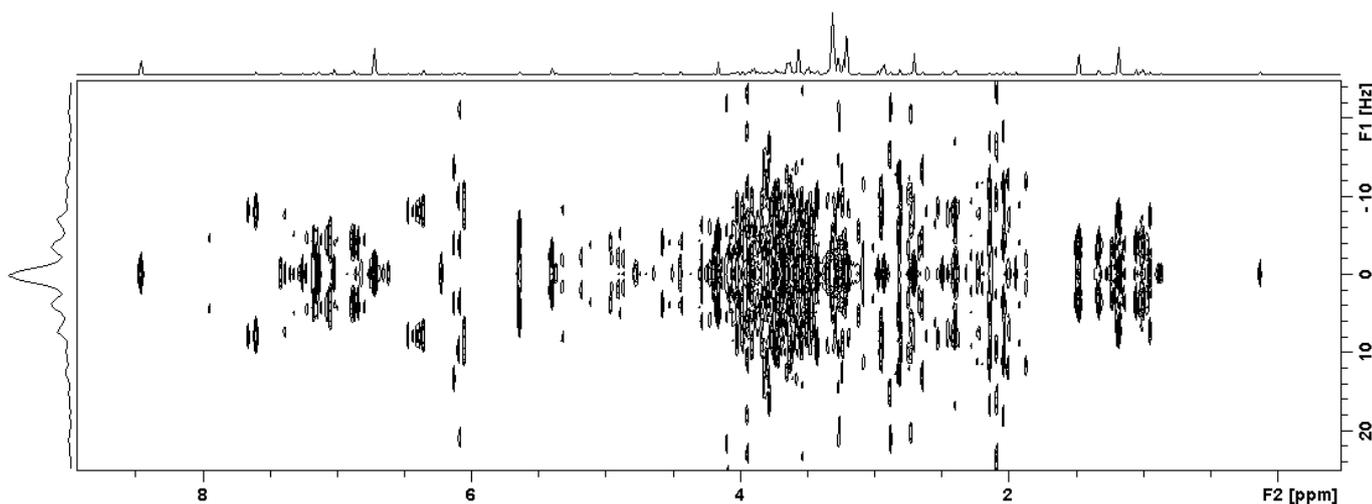


Figura 14: Espectro COSY da amostra controle.

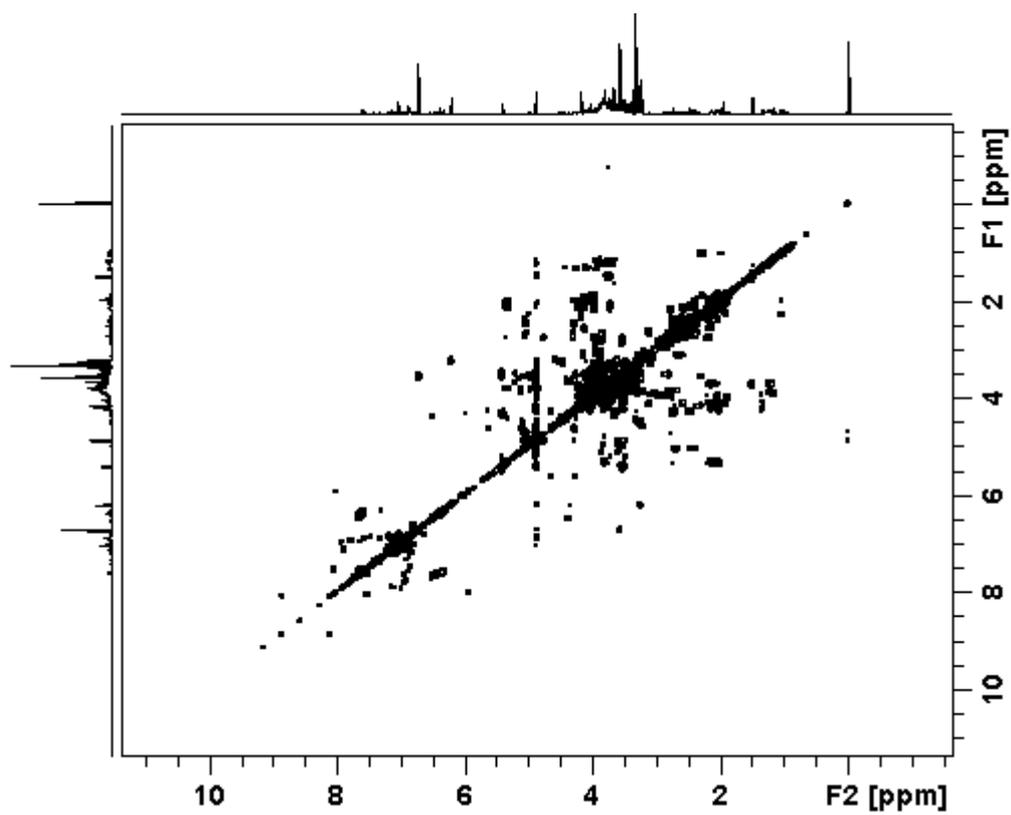


Figura 15: Espectro HSQC da amostra controle.

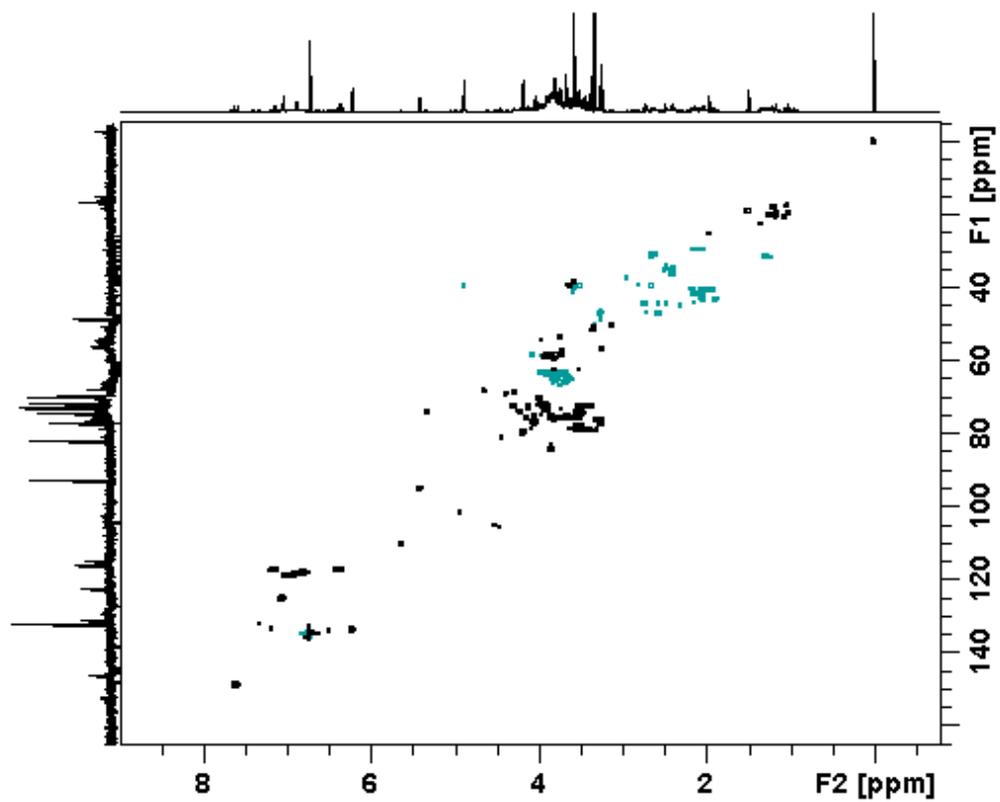
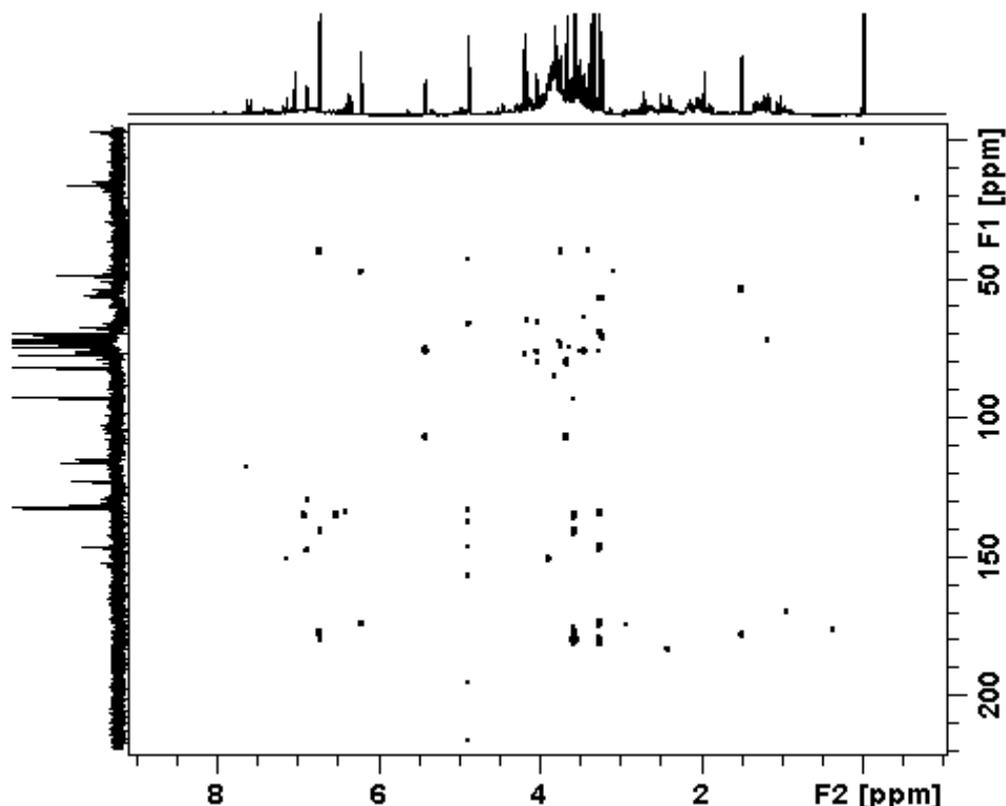
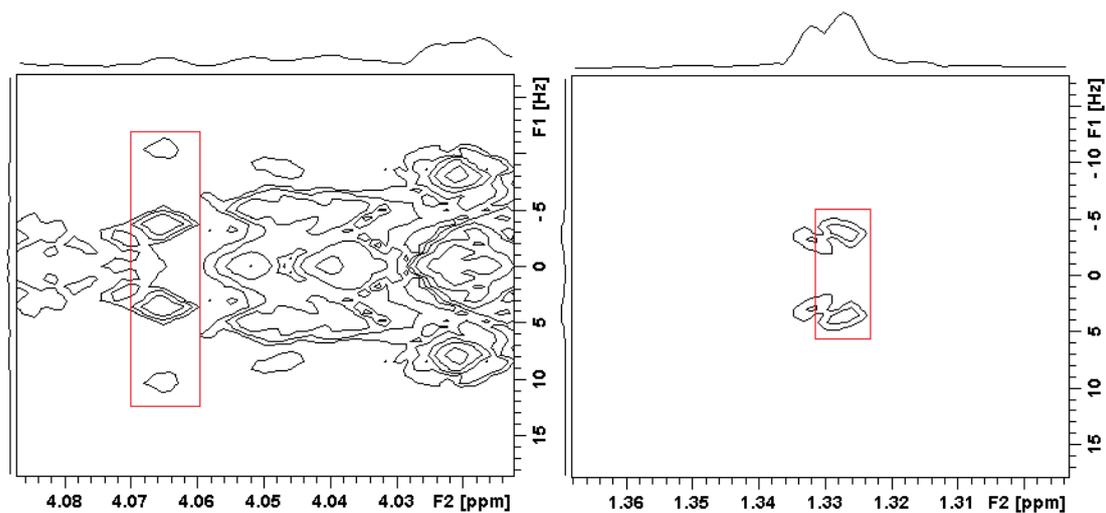


Figura 16: Espectro HMBC da amostra controle:

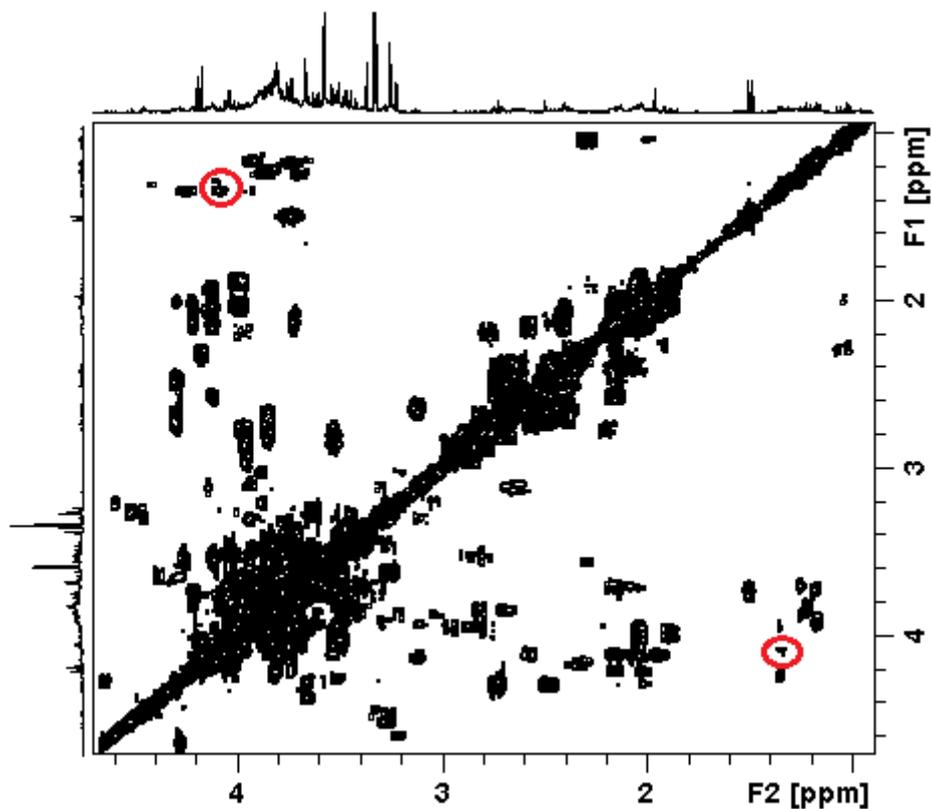
Como o objetivo do trabalho foi verificar a alteração metabólica das plantas após a inoculação com bactérias RPCP, para entendermos e verificarmos se a planta se torna mais resistente ao ataque do inseto, decidiu-se identificar somente os metabólitos envolvidos na discriminação entre os dois grupos (grupo controle e grupo inoculado). Como mostrado na tabela 1 os compostos discriminantes foram pré- identificados com a ajuda dos espectros de RMN-¹H e J-resolvido seguidos da consulta de artigos e HMDB (Human Metabolome Database). Na região entre 1.30 e 1.36 do espectro J-resolvido (Fig.17) foi possível identificar o duplete ($J = 7$ Hz) referente ao grupo metila do lactato.

Figura 17: Regiões do espectro J-resolvido para identificação do lactato.



No mesmo espectro J-resolvido identificou-se o grupo metino como um quarteto ($J = 7$ Hz). O espectro COSY (Fig 9) confirmou o acoplamento entre os sinais identificados no espectro J-resolvido confirmando a identificação do lactato na amostra.

Figura 18: Espectro COSY para a identificação do lactato.



Na região entre 2,5 e 3,0 ppm do espectro J-resolvido (Fig 19) identificou-se os multipletos referentes aos H2 α (δ 2,68 ppm δ , J = 8,9 Hz e 17,5 Hz) e H-2 β (δ 2,81 ppm, dd, j = 4 Hz e 17,2 Hz) metilênicos do aspartato. No espectro COSY (Fig.13) observou-se a correlação do H-2 α com o hidrogênio metínico (H-3) em δ 3,84 confirmando a substância.

Figura 19: Regiões do espectro J-resolvido para identificação do aspartato.

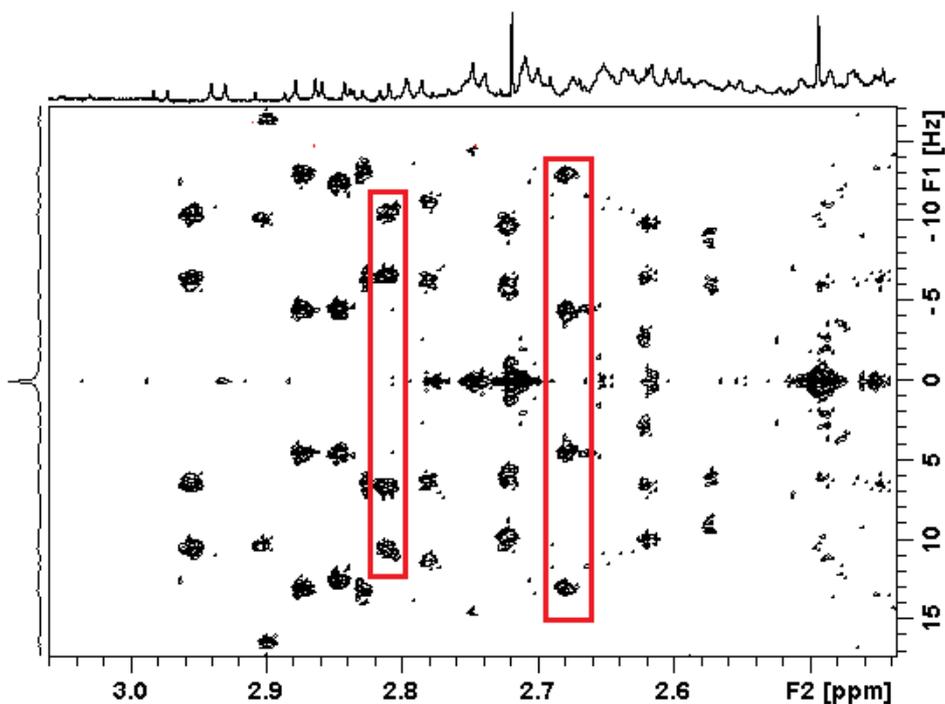
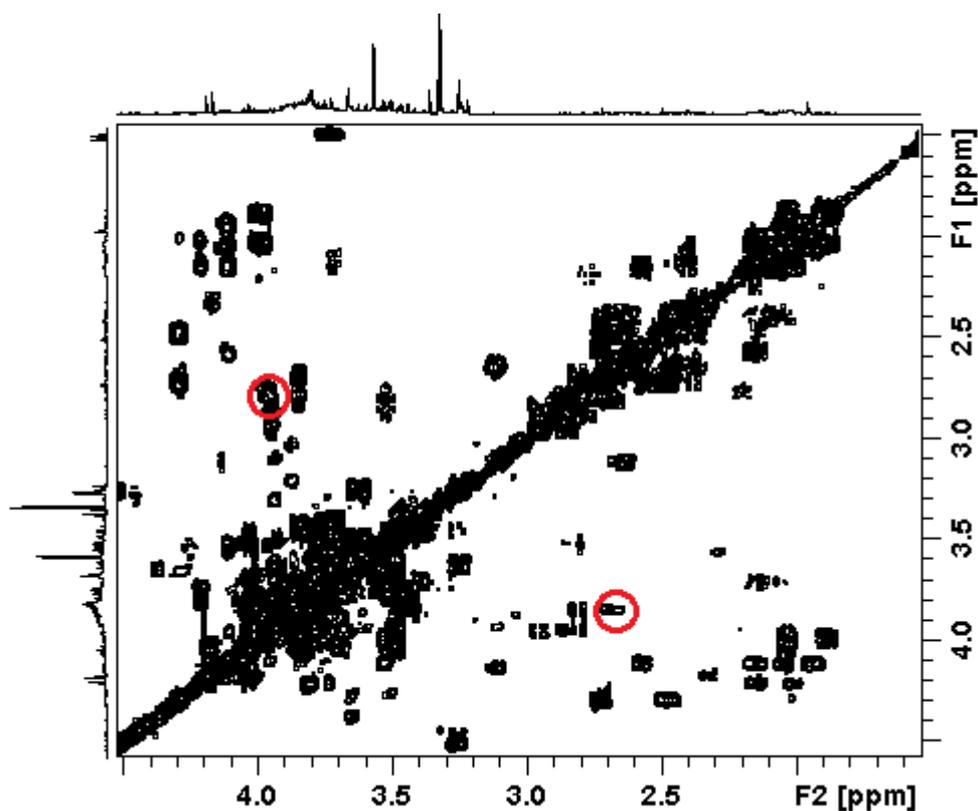
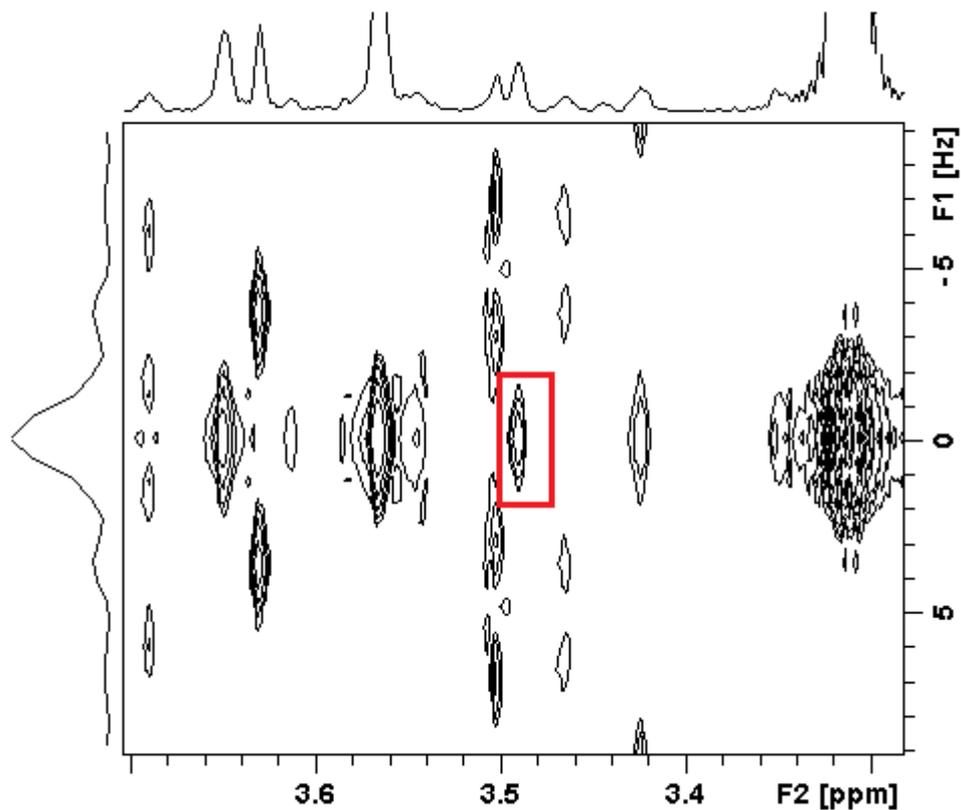


Figura 20: Espectro COSY para a identificação do aspartato.



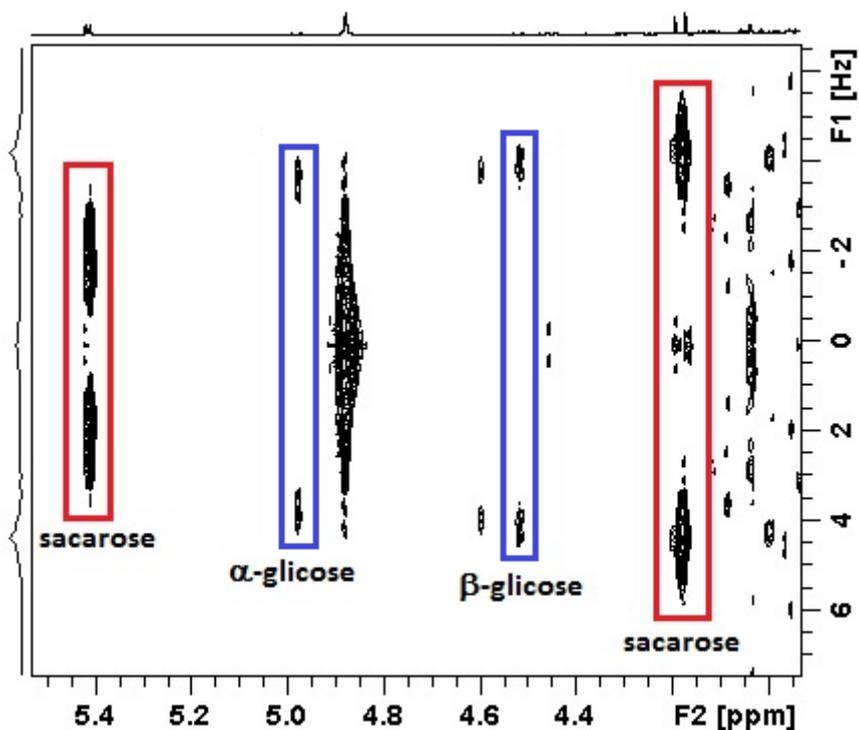
No espectro de RMN- ^1H e J-resolvido (Fig. 21) identificou-se um simpleto em δ 3,49 ppm referente a glicina.

Figura 21: Espectro J-resolvido indicando o sinal da Glicina.



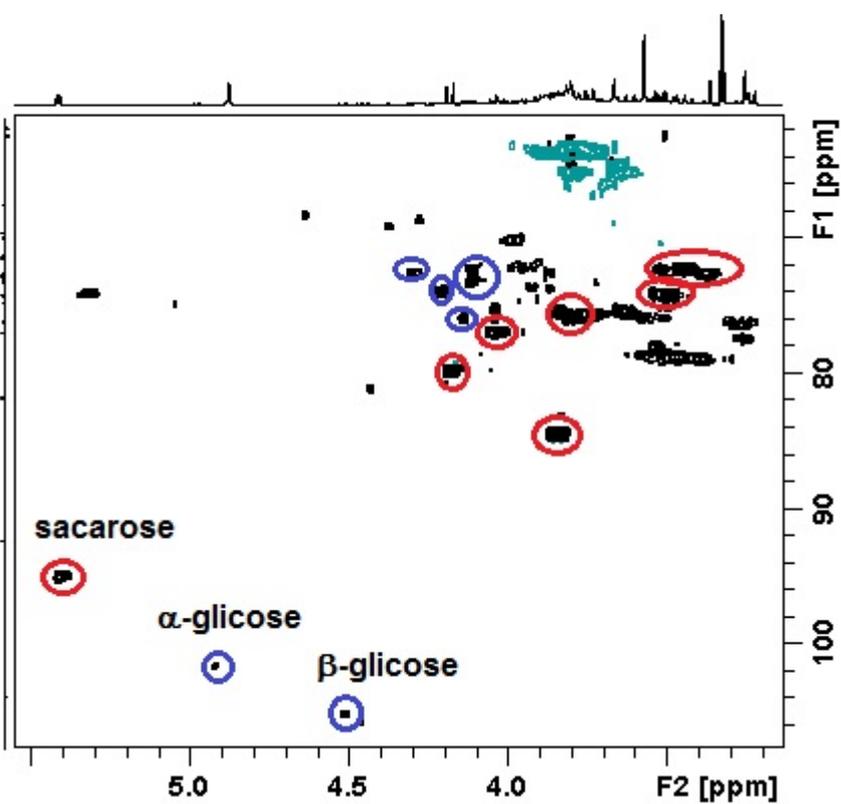
Na região dos açúcares entre 3.0 e 5.5 ppm identificaram-se os carboidratos comuns de cana-de-açúcar, tais como, sacarose; α -glicose e β -glicose. O espectro J-resolvido (figura 22) na região de 4.4 a 5.5 ppm pôde verificar os prótons anoméricos da β -glicose um duplete em δ 4.51ppm (H-1, $J = 7.7$ Hz); da α -glicose um duplete em δ 4.98 ppm (H-1, $J = 7.3$ Hz) e da sacarose um duplete em δ 5.40 ppm (H-1, $J = 4.0$ Hz)..

Figura 22: Espectro J-resolvido referente aos hidrogênios anoméricos em carboidratos comuns da cana-de-açúcar.



Esses carboidratos foram confirmados através do espectro HSQC (figura 23) mostrando as correlações entre os hidrogênios anoméricos e seus carbonos adjacentes na região de campo baixo acima de δ 90 ppm.

Figura 23: Espectro HSQC referente aos hidrogênios anoméricos em carboidratos comuns da cana-de-açúcar.



Já na região dos compostos aromáticos foi possível identificar o sinpleto em δ 6.61 ppm referente ao ácido fumárico e outro sinpleto em δ 7.04 ppm referente ao ácido gálico (Figura 24), a foi confirmado através do espectro HSQC observando-se a correlação do próton em δ 7.04 ppm com o C-4 em δ 113,77 ppm (Figura 25). Estes compostos foram também identificados em outros trabalhos envolvendo metabolômica de plantas (CHOE, 2011).

Figura 24: Espectro J-resolvido referente a identificação do ácido fumárico e ácido gálico.

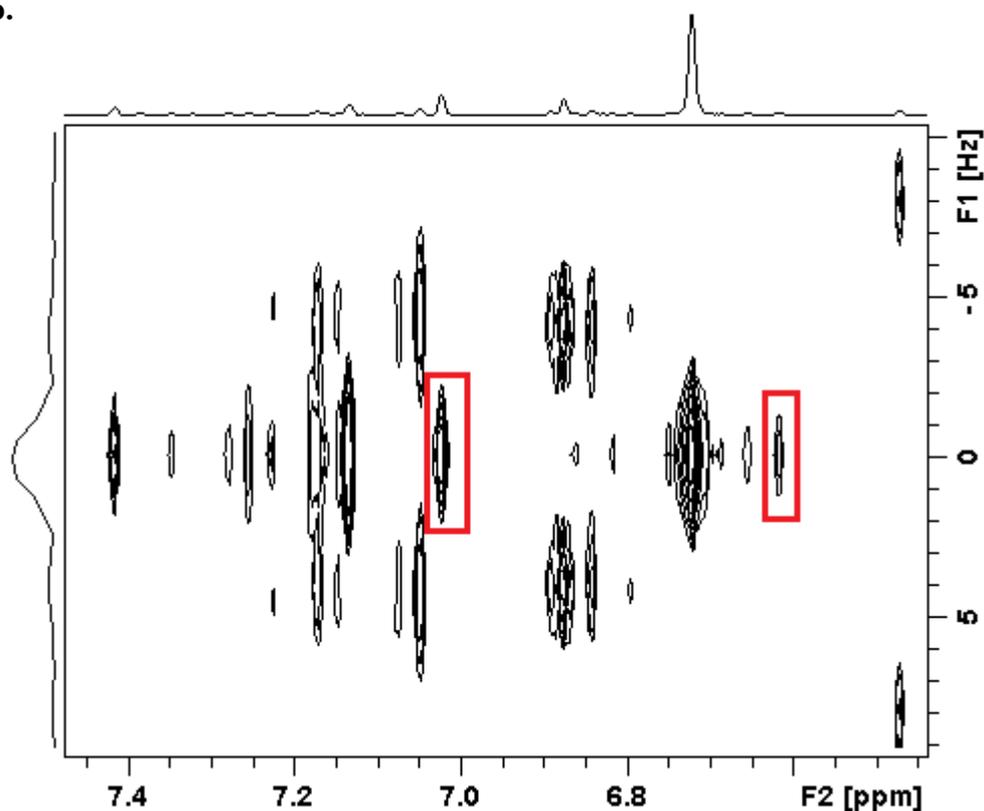
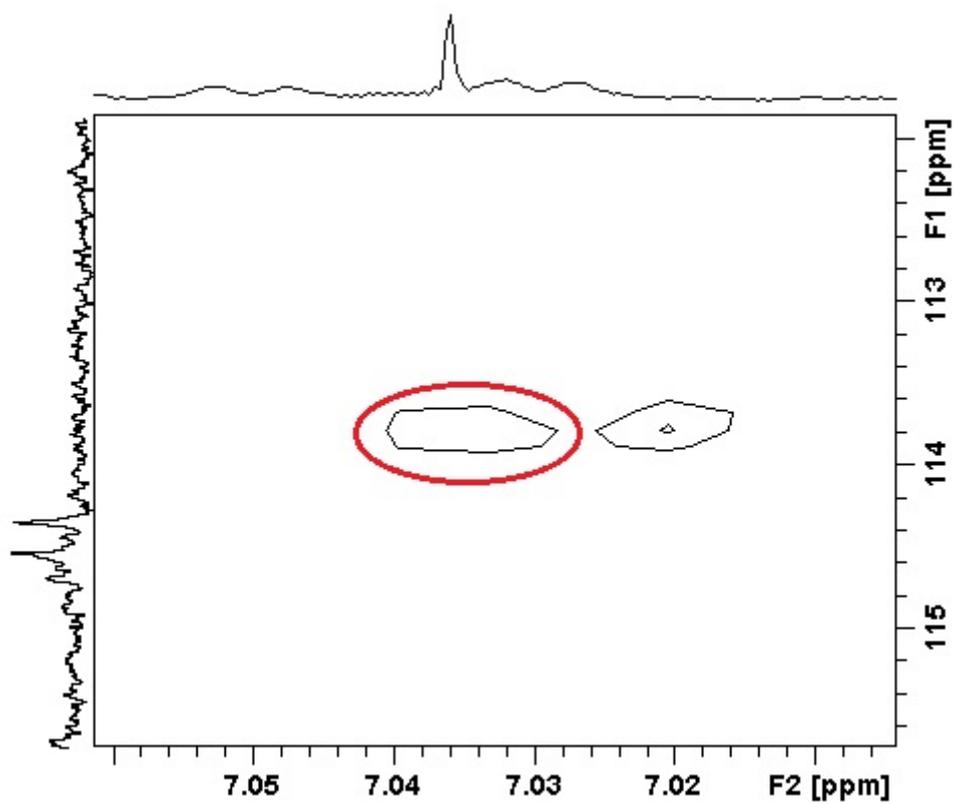


Figura 25: Espectro HSQC referente a identificação do ácido gálico.



Os resultados das análise de RMN 2D confirmaram as estruturas dos compostos acima citados como mostrado na tabela 1.

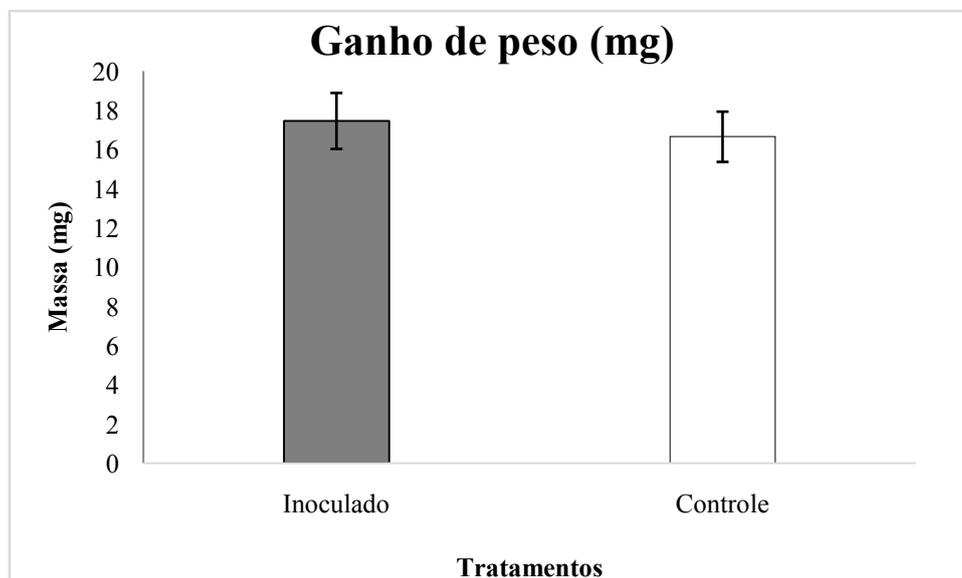
4.2 Bioensaios

Embora aparentemente indefesas frente ao ataque de pragas ou até mesmo em condições adversas, as plantas apresentam estratégias de defesa que permitem o retardamento ou até mesmo impedem a penetração de agentes fitopatogênicos, tais como, fungos, bactérias, vírus, nematoides e insetos. As plantas reagem ainda sob estresse abiótico, como por exemplo, variações de temperatura, ausência de água ou tratamento com agentes químicos. Esta defesa é composta de resposta constitutiva, a qual já está presente nas plantas, e a resposta induzida, a qual ocorre após o ataque de pragas ou doenças ou o início do estresse abiótico.

Foi avaliado a influência das rizobactérias na interação planta-inseto, a fim de identificar um possível efeito na defesa da planta contra o ataque de insetos herbívoros. Para isso foram propostos dois distintos bioensaios utilizando lagartas de *D.saccharalis* como praga teste.

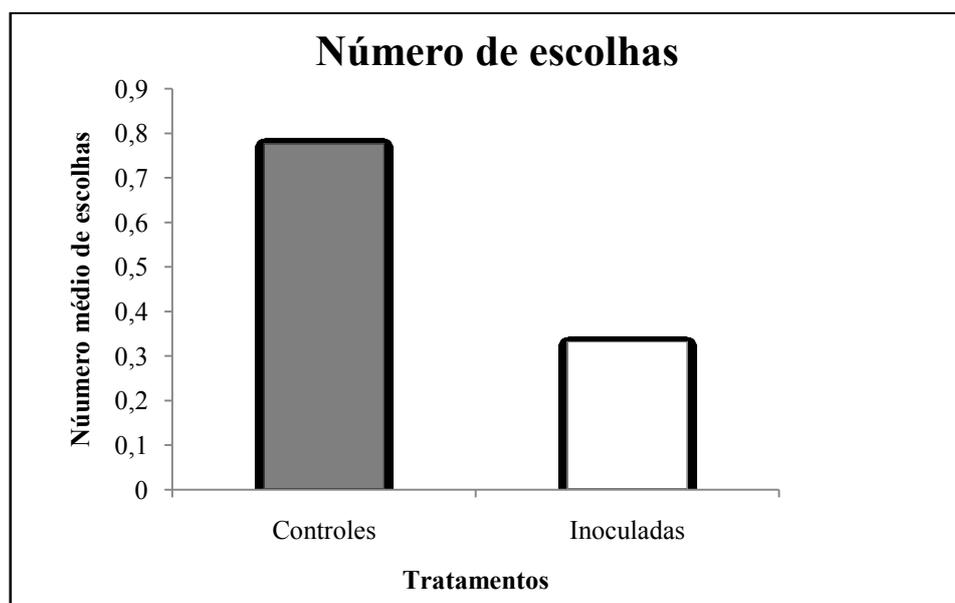
As avaliações efetuadas no bioensaio sem chance escolha mostram que não houve diferença significativa em relação ao ganho de peso das lagartas de *D. saccharalis* quando se alimentando de plantas inoculadas e não inoculadas (Figura 26).

Figura 26 – Ganho de peso das lagartas de *Diatraea saccharalis* alimentadas em cana-de-açúcar inoculada com as rizobactérias e plantas controle. Teste t ; $P=0,20042$



Com relação ao bioensaio com chance de escolha, foi observado que houve significância para o resultado da não-preferência das lagartas de *D. saccharalis* pelas plantas inoculadas. As lagartas preferiram em média as plantas do controle (Figura 27)

Figura 27 – Preferência de lagartas de *Diatraea saccharalis* por plantas de cana-de-açúcar inoculadas com microorganismos endofíticos e controle. Teste de Wilcoxon $P = 0,03260$



Uma planta ou variedade apresenta resistência do tipo não-preferência ou antixenose, quando ela é menos utilizada pelo inseto que outra em igualdade de condições para alimentação, oviposição ou abrigo. O termo não preferência exprime uma reação comportamental do inseto em relação a planta (LARA 1991; KOGAN e ORTMAN 1978).

4.3 Perfil de Compostos Orgânicos Voláteis

A análise de aerações de plantas controle e inoculadas demonstrou que o perfil de voláteis emitidos foi diferente para as plantas do controle e inoculadas (Figura 28). Para as aerações das plantas do controle e inoculadas com infestação se obteve um perfil de voláteis com diferenças qualitativas e quantitativas.

Figura 28 – Comparação entre perfis de voláteis de plantas controle e inoculadas sem infestação.

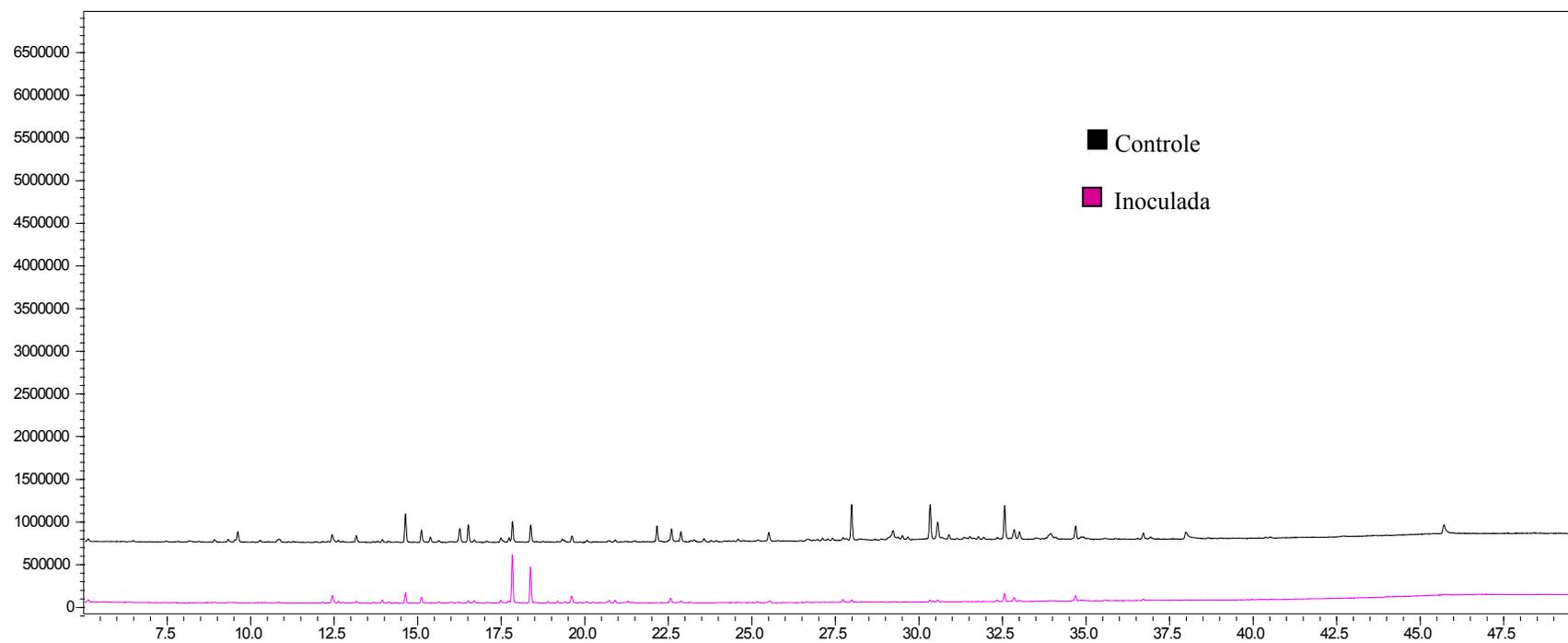
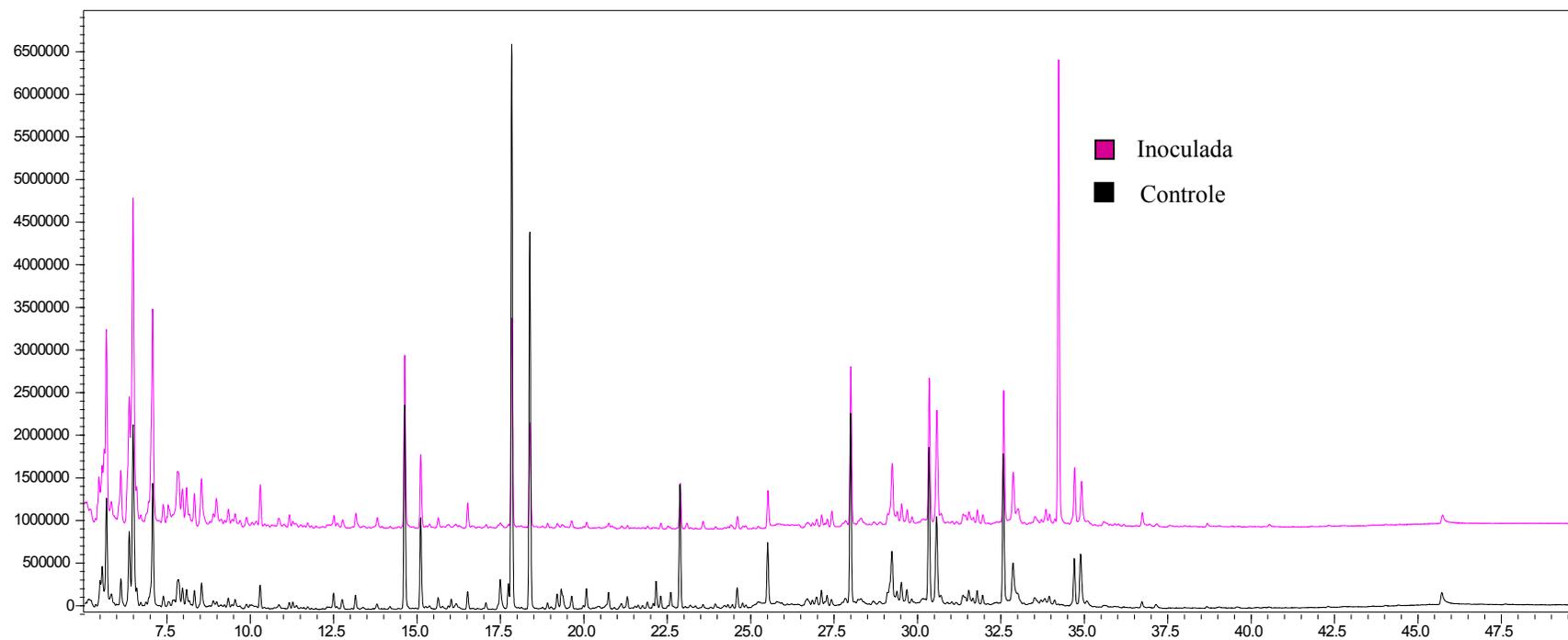


Figura 29 – Comparação entre perfis de voláteis de plantas controle e inoculadas com infestação



5 DISCUSSÃO

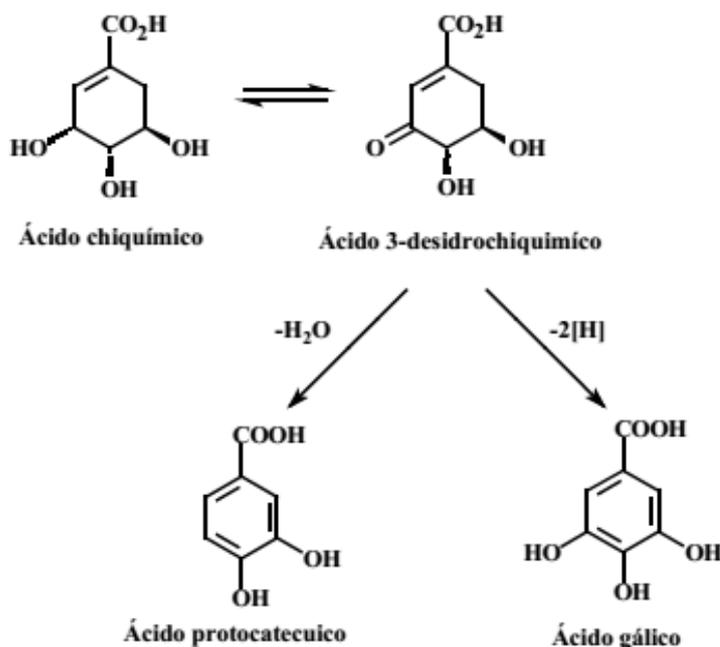
5.1 Análise metabolômica

A análise da "impressão digital" (fingerprint) por RMN-¹H de tecido foliar de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias promotoras do crescimento de plantas possibilitou a identificação de seis metabólitos que se apresentaram em maior concentração nas plantas inoculadas (Tabela 1).

5.1.1 Aromáticos

Um dos compostos que apareceu em maior concentração em plantas inoculadas foi o ácido gálico. Este é um composto fenólico derivado do ácido benzóico, biossintetizado pela via do chiquimato derivado do ácido 3-desidrochiquímico (figura 30). O ácido gálico tem sido descrito com atividade antibacteriana e antifúngica (SEO, Dong-Jun et al 2013). Sua acumulação é importante devido à sua conversão em galotaninos, que são polímeros heterogêneos que contêm as moléculas de ácido gálico ligadas de várias maneiras, uns aos outros e a açúcares. Uma das propriedades importantes dos galotaninos é que eles fornecem proteção para as plantas contra desenvolvimento de bactérias e fungos, atuando também a como um agente contra insetos (ANANTHAKRISHNAN, 1997; SINGH et al., 2002).

FIGURA 30 – Biossíntese simplificada do ácido gálico. Adaptado de Mann (1987)



O ácido gálico dá origem a taninos hidrossolúveis quando condensados a glicose ou outros açúcares. São responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante. Têm reconhecidamente a função de inibir herbívoros, pois em altas concentrações, frutos, folhas, sementes ou demais tecidos jovens tornam-se não palatáveis aos fitófagos e, ainda, combinado a algumas proteínas, estes tecidos resistem fortemente à putrefação. Além disso Heil e colaboradores (2002) relataram que em plantas com elevadas concentrações de taninos ou fenólicos tem ocorrido decréscimo do uso das folhas dessas plantas para alimentação de herbívoros.

Nos resultados obtidos nesta pesquisa não foi observado diferença significativa para o ganho de peso das lagartas de *D. saccharalis* no bioensaio sem chance de escolha quando essas foram submetidas a alimentação com plantas inoculadas e plantas controle. Sendo assim, de acordo com Pineda e colaboradores (2013) esperava-se um efeito neutro ou positivo sobre a lagarta submetida a alimentação em plantas inoculadas, porém, é importante salientar que deve ter ocorrido algum efeito sobre o inseto já que o conteúdo nutricional das plantas inoculadas, caracterizado pelas alterações positivas na concentração de açúcares e aminoácidos foi aumentado, fato que apontaria para um efeito positivo sobre o inseto, já que este estaria se alimentando com plantas mais nutritivas.

Compostos fenólicos tem demonstrado poder de interferência contra o desenvolvimento de insetos como, por exemplo, de *Helicoverpa armigera* (Hubner 1805) (Lepidoptera Noctuidae). O ácido gálico tem demonstrado efeitos crônicos sobre o crescimento de *H. armigera* pela redução na eficiência de conversão alimentar, causando defecação contínua e lesões no intestino grosso. Além disso, a diminuição deste composto em plantas acarretam um aumento em taxas de predação e parasitismo. Assim sendo, a presença do ácido gálico em maior concentração nas plantas inoculadas pode ser um indicio de que as RPCPs estão influenciando nos mecanismos de defesas das plantas cana-de-açúcar. Cabe ressaltar que não foram detectados outros compostos fenólicos nas plantas inoculadas. Essa constatação pode ser justificada, em parte, pela especificidade da associação entre o genótipo vegetal e as rizobactérias, que podem beneficiar a produção deste composto a medida que outros metabólitos que poderiam ser prejudiciais as bactérias deixariam de ser produzidos (ANANTHAKRISHNAN 1997).

Pode também ocorrer a produção de outros compostos, porém em concentrações distintas, pois essa produção depende do tempo de contato estabelecido entre o microrganismo e o organismo vegetal. Panka e colaboradores (2013) ao trabalhar com fungos endofíticos em associação com plantas de *Azevém* perene demonstraram que as plantas apresentaram variações na concentração dos compostos fenólicos por eles encontrados.

Supõem-se que nessa pesquisa a produção do ácido gálico pode ter sido influenciada pelas rizobactérias. Essas RPCPs poderiam estar estimulando a ação da enzima responsável pela catálise da reação que leva a formação do ácido gálico em detrimento da ação da enzima que leva a formação de outros compostos fenólicos. Esse processo seria benéfico para planta, já que o ácido gálico é um agente antiherbivoria por insetos. Também poderíamos especular que sua produção também seria uma estratégia usada pelas bactérias, o que lhe conferiria uma vantagem adaptativa em relação às outras bactérias, pois o ácido gálico também atua como bactericida e fungicida (SEO, Dong-Jun et., a2013).

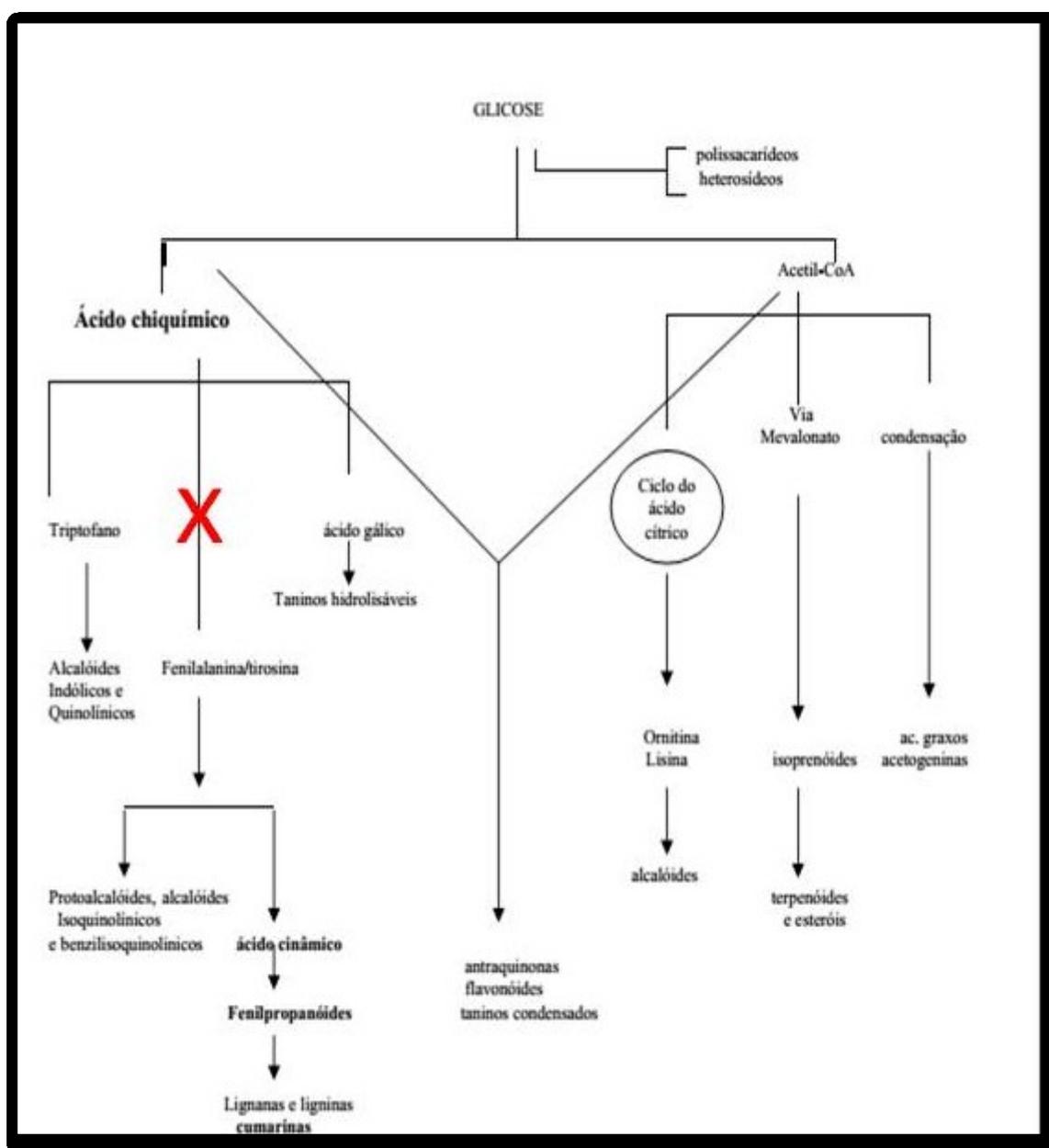
Os compostos fenólicos abrangem um extenso grupo de substâncias que possuem um anel aromático contendo pelo menos uma hidroxila. Estes compostos incluem: fenóis simples e glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, a-pirones (cumarinas e isocumarinas), ligninas, flavonóides (flavononas, antocianinas e catequinas) e quinonas. As rotas biossintéticas ocorrem por duas vias principais, a via do ácido chiquímico através de carboidratos ou pela via do acetato-polimato que inicia com a acetil co-enzima A e a malonil-coenzima A (KNAGGS, 2003).

Possivelmente a interação com as rizobactérias esteja estimulando apenas uma das enzimas em detrimento da outra, ou seja, pode estar ocorrendo um efeito antagônico entre as duas vias de produção. A alteração na concentração do ácido gálico pode ainda ser um resultado da indução da resistência sistêmica induzida na planta causada pela associação com as RPCPs. Esta indução de resistência resultaria em um estado preparado ("priming") por parte da planta, estado que poderia ser o responsável pela alteração no perfil de voláteis emitido pelas plantas inoculadas. (PINEDA et al., 2013).

Nogueira e colaboradores (2001) analisaram o papel desempenhado pela planta na interação entre a cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas endofíticas, investigando os perfis de expressão gênica. As plantas de cana colonizadas por *G.diazotrophicus* e

H. rubrisubalbicans demonstraram a presença de ESTs que codificam para proteínas envolvidas de sinalização planta-micrororganismo e identificaram a enzima chalcona sintase, a primeira enzima na biossíntese dos flavonóides, como também ESTs que codificam as primeiras três enzimas da via fenilpropanóides (PAL, C4H, 4CL). Nós propomos que estas enzimas tiveram ação suprimidas pelas bactérias para seu benefício, pois alguns dos produtos resultantes das vias que estas enzimas catalisam poderiam prejudicar o desempenho das rizobactérias.

Figura 31: Biossíntese dos compostos fenólicos. Adaptado de TAIZ e ZEIGER (2009).



SEO, Dong-Jun (2013) avaliaram as atividades antifúngica de extratos metanólicos da casca do tronco de *Terminalia nigrovenulosa* (TNB) (combretaceae) e investigado seus efeitos contra o fungo fitopatogênico *Fusarium solani*. Eles constataram que fração acetato de etila foi separada da TNB demonstrou elevada atividade antifúngica contra *F. solani*. O composto que possuía a atividade antifúngica foi identificado como ácido gálico (GA).

Poderia se especular também que a produção do ácido gálico seria uma ação praticada pelas próprias rizobactérias como uma estratégia de adaptação no estabelecimento de sua associação com as plantas. No entanto, em pesquisa nos bancos de dados (NCBI) de sequências do genoma tanto de *G. diazotrophicus* e *A. brasiliense* não foi encontrado nenhuma das possíveis enzimas responsáveis pela catalise da reação que leva a produção do ácido gálico. Deste modo, provavelmente a suposição de que o ácido gálico esteja sendo de fato produzido pela planta, como resultado da interação com as bactérias deve esta correta.

Assim deduz-se que estas bactérias podem causar efeitos sobre o metabolismo secundário de plantas como também influenciar as funções fisiológicas envolvidas no metabolismo primário e o desenvolvimento da planta. Alteração do metabolismo secundário da parte aérea da cana sugerem respostas da cultivar utilizada nesta pesquisa. As estirpes usadas tem a capacidade para colonizar o interior do córtex das raízes da cana e o interior da planta inteira, podendo afetar a fisiologia celular da planta hospedeira, desencadeando respostas sistêmicas vegetais e alterações tanto do metabolismo primário quanto do metabolismo secundário. Vários estudos relataram que, mesmo quando RPCPs endofíticas promovem o crescimento das plantas, não deixam de induzir estresse e respostas de defesa, provocando alterações nos metabólitos das plantas. Tal fato leva a propor que esteja ocorrendo um controle de populações de bactérias dentro de tecidos vegetais (DE MATOS NOGUEIRA et al., 2001, MICHE et al., 2006; ROSENBLUETH e MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Além disso, Yasuda e colaboradores (2009) mostraram que o arroz inoculado com a endófito *Azospirillum* sp. B510, mesmo gênero de uma das bactérias utilizadas neste trabalho, exibe resistência significativa contra a doença da ferrugem do arroz, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* e *X.s oryzae* pv. *Oryzae*. Curiosamente, os genes relacionados com a patogênese e acumulação de ácido salicílico não foram

induzidas, o que sugere que o efeito pode envolver um novo tipo de mecanismo de resistência das plantas, independentemente da sinalização de ácido salicílico.

Além disso, com base no fato de que o "priming" por rizobactérias afeta as respostas mediadas por ácido jasmônico (PIETERSEN et al., 1998; VAN OOSTEN et al., 2008; VAN WEES et al., 2008). Além disso, os resultados de Pineda e colaboradores (2012) apoiam esta hipótese, ao mostrar que a rizobactéria *P. fluorescens* WCS417r prepara plantas de *Arabidopsis* para uma maior expressão do gene LOX2 responsivo AJ sobre a alimentação pelo generalista *Misus Persicae* (Hemiptera: Aphididae), mas não pelo especialista em *Brevicoryne brassicae*.

5.1.2 Aminoácidos

Dentro do metabolismo dos organismos, os aminoácidos desempenham papel de extrema importância, agindo como potenciais precursores da biossíntese de peptídeos e proteínas, como também de outras moléculas como coenzimas, nucleotídeos e hormônios (TAIZ e ZEIGER, 2006).

No presente estudo foram encontrados dois aminoácidos em maior concentração nas plantas inoculadas. Estes aminoácidos por sua vez, podem ter sido produzidos pelas rizobactérias ou pela planta devido a sua influência. Em trabalho com bactérias do gênero *Beijerinckia*, Thuler e colaboradores (2003) mostraram que rizobactérias foram capazes de secretar aminoácidos em condições de laboratório, sugerindo que a secreção de aminoácidos pode ser vista como uma forma de as bactérias manterem um nível baixo de N intracelular, necessário para uma ativa fixação de N₂. Porém, estes mesmo autores sugerem que este evento pode ser particularmente vantajoso para o ambiente circundante, onde naturalmente estas substâncias contendo N podem ser diretamente assimiladas e incorporadas a proteínas de plantas e outros organismos vivos.

O aminoácido glicina está envolvido na síntese de clorofila que é o pigmento natural mais abundante e ocorre nos cloroplastos (VON ELBE, 2000). A clorofila é um importante parâmetro para a absorção de nitrogênio, pois apresenta quatro átomos de nitrogênio no núcleo central, onde ocorre a absorção de radiação solar (TAIZ e ZEIGER, 2006). Além disso, este pigmento absorve radiação na faixa de 400 a 700 nm (exceto a faixa da cor verde), e está diretamente associado ao potencial de atividade

fotossintética e conseqüentemente o estado nutricional das plantas (ZOTARELI et al., 2002). Por seu envolvimento com a síntese da clorofila, a produção da glicina possivelmente está influenciando no acúmulo de carboidratos nas plantas inoculadas, melhorando o estado nutricional da planta. Desse modo, a maior concentração de glicina no metaboloma das plantas inoculadas pode indicar um aumento da atividade fotossintética da planta, refletindo numa produção melhorada de fotoassimilados, como os carboidratos sacarose e glicose.

As plantas inoculadas apresentaram também em maior concentração o aminoácido prolina, reconhecidamente um componente no mecanismo de tolerância ao estresse hídrico.

A produção de prolina pode ser estimulada nas plantas em presença de rizobactérias em resposta a estresses bióticos e abióticos, podendo mediar o ajuste osmótico, e proteger membranas e proteínas contra efeitos adversos do aumento da concentração de íons inorgânicos (GROVER et al., 2011). O trabalho de Barka e colaboradores (2006) mostrou que plantas tratadas com uma estirpe de *Burkholderia phytofirmans* tiveram aumento nos teores de prolina, amido e compostos fenólicos e conseqüentemente aumento de tolerância ao frio.

Prolina é um aminoácido conhecido por conferir tolerância ao estresse hídrico. A baixa disponibilidade de água afeta processos celulares como o fechamento estomático, o acúmulo e translocação de solutos e antioxidantes, redução do processo fotossintético e da respiração, menor taxa de assimilação do carbono, menor rendimento da transpiração, da difusão do vapor de água, da atividade enzimática, do metabolismo do nitrogênio, e aumento na formação de carboidratos (REDDY et al., 2004).

O acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos em resposta às condições de baixa disponibilidade de água é denominado ajustamento osmótico sendo considerado um dos mais eficazes para manutenção da turgescência celular, permitindo principalmente a manutenção da abertura estomática da fotossíntese e do baixo potencial hídrico. Como resultados do acúmulo de prolina ocorre um aumento da degradação de proteínas e inibição na síntese, levando a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres. Este aminoácido e outros solutos osmoticamente ativos são substâncias que têm alta capacidade de provocar ajustamento osmótico em células, como os íons inorgânicos, sem ter, no entanto, o efeito prejudicial destes últimos sobre

enzimas ou outras macromoléculas do citoplasma, mesmo em altas concentrações (HUR et al., 2004).

Nas plantas superiores, prolina é sintetizado quer pela via de glutamato ou a ornitina. A via do glutamato é considerada a principal, especialmente sob estresse osmótico. A biossíntese de prolina ocorre a partir do ácido glutâmico- γ -semialdeído (GSA) e Δ 1-pirrolina-5-carboxilato (PC5). A enzima PC5 sintase cataliza a conversão de glutamato a P5C que é em seguida, pela ação da P5C redutase (P5CR), reduzindo a prolina (HUR et al., 2004)

Em plantas de arroz associadas com micorrizas arbusculares e *A. brasilense* Ruiz-sanches e colaboradores (2011) demonstraram que a associação entre microrganismos é mais eficiente na promoção do crescimento e no aumento de tolerância a seca do que o uso individual dos microrganismos associados a planta.

Plantas de tabaco transgênicas com superexpressão da forma mutante do *P5CS* de *V. aconitifolia* tiveram grandes quantidades de prolina acumulada, aumentando a tolerância ao estresse salino (HONG et al., 2000) Além disso, transgênicos porta-enxerto de *Carrizo citrange* (Rutaceae) que expressam o mesmo gene dirigido por promotor constitutivo, exibiram ajuste osmótico tolerando períodos mais longos em condições severas de estresse hídrico (MOLINARI et al., 2004).

Com relação a interação de cana-de-açúcar e bactérias diazotrófica estudos mostram que essa associação pode auxiliar na utilização de forma eficiente da água na produção, podendo ser um passo a frente para trazer a agricultura a um nível mais sustentável, diminuindo as perdas em cana-de açúcar devido à seca que podem variar de 10% a 50 %, dependendo da região de cultivo e da época de plantio. (VARGAS et al., 2014; EMBRAPA, 2015).

No trabalho de Vargas e colaboradores (2014) utilizando plantas de cana-de-açúcar da variedade SP70-1143 inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 sob estresse hídrico, bibliotecas de sequências de RNA foram gerados a partir de raízes e parte aérea das plantas de cana livres de endófitos e das plantas inoculadas Os resultados demonstram que ocorreu um padrão de resposta oposto para os dois tratamentos, de modo que nas plantas não associadas ao endófito houve um aumento geral das vias que estão envolvidas com a resposta a estresse abiótico, tais como à via de estresse e metabolismo de hormônios, como ABA e etileno, como acontece normalmente em plantas. Os dados indicaram um aumento da biossíntese de ABA nas raízes sob estresse hídrico. A via de sinalização e resposta do ABA em primeira instância

pareceu ser ativada nas raízes, pois houve uma regulação aumentada dos membros da família dos fatores de transcrição ABA-intesive (ABI). Os autores sugeriram então que a sinalização e a resposta a ABA parece ser ativada tanto em raízes como na parte aérea de plantas SP70-1143 não inoculadas submetidas a 3 dias de déficit hídrico, enquanto a biossíntese do ABA parece principalmente ativada nas raízes. Em comparação fatores de transcrição putativos como DREB1A / CBF3, DREB1B / CBF1 e NCED3 foram reprimidos na parte aérea de cana de açúcar SP70-1143 inoculada com *G. diazotrophicus* quando essas foram submetidas a déficit hídrico. Tornando as plantas colonizadas com *G. diazotrophicus* mais tolerantes ao estresse hídrico. Os dados sugerem que a via independente de ABA não está ativo quando SP70-1143 é colonizada por *G.diazotrophicus* sob estresse hídrico. Além disso, o gene DREB2, que esta relacionado com a tolerância ao estresse hídrico, bem como a indução de genes a jusante relacionados ao estresse e / ou níveis mais elevados de açúcares solúveis e prolina em plantas, esta ausente em cana de açúcar. Esse fato sugere a possibilidade da prolina está sendo produzida pelas rizobactérias usadas no presente trabalho (LIU et al., 1998).

A Prolina pode ainda exercer papel energético atuando como armazenamento de nitrogênio e carbono para períodos de estresse. Estudos indicam que a prolina desempenha um importante papel durante o desenvolvimento das plantas servindo como uma fonte rápida e acessível de energia (PHANG, 1985). Além disso, segundo Hur e colaboradores (2004), a oxidação de uma molécula de prolina fornece 30 ATPs para a célula. Neste contexto, é importante saber como o acúmulo de prolina influencia outras vias de energia relacionadas, bem como no metabolismo de carbono durante e após o período de submissão a estresses abióticos (ASHRAF, 2004; KAVI KISHORE et al., 2005).

5.1.3 Carboidratos

Açúcares tais como sacarose, glicose e frutose têm uma função essencial no metabolismo da planta. Estes açúcares são importantes para o metabolismo e são substratos para a síntese de hidratos de carbono complexos, tais como amido e celulose. Além disso, os açúcares fornecem os blocos de construção para a biossíntese de aminoácidos e ácidos graxos e praticamente todos os outros compostos presentes nas plantas (SMEEKENS, 2000).

A análise metabolômica de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com as RPCPs usadas no presente trabalho, revelou que os carboidratos glicose e sacarose apresentam-se em maior concentração em relação as plantas controle. A glicose atua como substrato da enzima hexoquinase, sendo metabolizada como fonte de energia pela glicólise, pela via das pentoses-fosfato e do ciclo do ácido cítrico. Constituem também os principais esqueletos de carbono para a síntese de intermediários dessas vias, e ainda são unidades para a síntese de oligo e polissacarídeos (DE SOUZA 2010). Assim, sugerimos que a presença da glicose é resultado de um melhora do processo fotossintético conferido pela associação benéfica entre a planta e as RPCPs. Fortalecendo ainda mais essa afirmativa os resultados desta pesquisa também mostram a presença do aminoácido glicina, que além de evidenciarem a ocorrência de FBN promovida pelas RPCPs, também contribuem para a melhoria do processo de fotossíntese, contrariando exemplos já citados na literatura que mostram uma redução do processo fotossintético geral de uma planta quando ela se associa a rizobactérias. Carreaux e colaboradores (2003) trabalhando com plantas de *Arabidopsis* inoculadas pela rizobacteria *P. thivervalensis* (estirpe MLG45) mostraram que as plantas tiveram taxas de fotossíntese reprimidas, além disso, houve uma redução do crescimento de plantas colonizadas.

Na atual pesquisa não foi obtido aumento de frutose, que é oriunda da clivagem de sacarose no metaboloma das plantas inoculadas. A frutose poderia esta sendo consumida pela bactéria como fonte de carbono. Segundo Dobereiner (1992), as fontes de carbono de maior preferência pelo *Azospirillum* são os ácidos orgânicos como o malato, piruvato, succinato, glicose e frutose.

A sacarose é o principal açúcar de plantas vasculares. Como é um carboidrato não redutor, pode ser translocado e armazenado nos vacúolos celulares, não sendo metabolizado até ser necessário. É uma molécula altamente solúvel e quimicamente inerte quando em contato com proteínas, pois não forma ligações covalentes com grupos amino livres. É também a molécula que retém a maior energia livre de hidrólise conhecida para uma ligação glicosídica.

Além de fornecer substrato para síntese de material celular e de outros carboidratos de reserva, como amido e frutano, a sacarose atua como molécula sinalizadora do metabolismo e do desenvolvimento vegetal, através da modulação da expressão gênica e do turnover de proteínas (FARRAR et al., 2000).

No presente trabalho, a discriminação dos grupos (controle e inoculado) evidenciada pela análise metabolômica, pode estar relacionada com a melhoria geral do processo fotossintético, possivelmente ocasionado pela interação da planta com as rizobactérias. Essa melhoria provavelmente provocou a biossíntese de mais glicina que pode resultar em síntese de clorofila culminando em mais açúcar livre e de reserva, metabólitos energéticos e carboidratos. Esses por sua vez podem ser utilizados para a manutenção do metabolismo vegetal e de todos os processos fisiológicos da planta.

5.1.4 Ácidos orgânicos

Um dos ácidos orgânicos encontrados em maior concentração de plantas inoculadas foi o ácido láctico. O papel do ácido láctico e de seus polímeros como promotores do crescimento tem sido relatado na literatura. O primeiro relato do uso de ácido láctico como um regulador de crescimento da planta foi feito por Blumenthal e colaboradores (1924) quando demonstraram a formação de calos a partir de fatias de cenoura expostas a este ácido.

Kinnersley e colaboradores (1990) trabalhando com plantas de lentilha (*Lemna minor* L.) e de milho (*Lemaceae*) cultivadas em meios contendo o dímero de ácido láctico e seus polímeros, demonstraram que ocorreu aumento da biomassa da planta acompanhado por um aumento da acumulação de clorofila e crescimento da raiz. Esses autores argumentam ainda que a promoção da acumulação de clorofila e de biomassa pode ser devido ao aumento da capacidade de assimilar os nutrientes de plantas tratadas com ácido L-lactoilactico. Em 1993, Yoshikawa e colaboradores mostraram um aumento do crescimento das raízes de *espargos officinalis* L, quando as plantas foram tratadas com algumas rizobactéria. Eles especularam que as bactérias poderiam secretar ácidos orgânicos, tais como ácidos succínico e ácido láctico, e estes ácidos pode aumentar o crescimento das plantas.

Ensaio de campo realizados por Young (1989) mostraram que houve um aumento do rendimento em variedade de laranja e tomates tratadas com aplicações foliares do isômero L do ácido láctico. Eles demonstraram que quantidades de frutas colhidas a partir de laranjas Naval e Valência aumentaram 50% e 43%, respectivamente, enquanto frutos de tomates Tim produzidos foram 15% maiores apresentando amadurecimento 50% mais rápido.

Kinnersley e colaboradores (1990) argumentam que os polímeros de ácido L-láctico podem promover o crescimento de plantas.

Possivelmente, a polimerização intracelular pode ocorrer sob condições de acúmulo de ácido láctico em plantas (KINNERSLEY et al., 1990). Estruturalmente, polímeros de ácido láctico se assemelham a outros promotores do crescimento de plantas. Embora o mecanismo de ação dos polímeros deste ácido permaneça desconhecido, promoção da biomassa e a acumulação de clorofila por ácido poli-L-láctico podem estar relacionados com efeitos sobre a assimilação ou a utilização de nutrientes (BLUMENTHAL et al., 1924)

De acordo com Kinnersley e colaboradores (1990) o ácido láctico ocorre em todas as plantas demonstrando variações em concentração causando uma diferença visual entre controle e as plantas tratadas com polímero, de modo que as plantas expostas a ácido láctico são mais verdes análogo as plantas expostas a diferentes níveis de fertilidade.

No presente trabalho, a produção de lactato pode estar relacionada com o mecanismo de promoção do crescimento que as rizobactérias são capazes de proporcionar às plantas. Como o lactato pode ser produzido também pela planta não podemos especular que é a bactéria responsável pela sua produção, porém, alguns autores relatam que rizobactérias promotoras do crescimento de planta também são produtoras de lactato, e este por sua vez, é um dos responsáveis pela promoção do crescimento dessas plantas. Corroborando com essas proposições os resultados de Yoshikawa e colaboradores (1993) fornecem uma explicação para o crescimento das plantas promovendo efeitos de algumas rizobactérias. Eles argumentam que as bactérias podem secretar ácidos orgânicos, tais como ácidos succínico e ácido láctico, também encontrado no presente trabalho, e estes ácidos podem aumentar o crescimento da planta, sob condições em que são reduzidas as populações de patógenos.

5.1.5 Intermediários do ciclo do ácido cítrico

Nas plantas inoculadas tanto o fumarato quanto o aspartato ocorrem em menor concentração. Embora a presença de ácidos orgânicos, em todas as plantas é conhecida por suportar numerosas e diversas funções tanto dentro como fora do metabolismo celular, bem como a estrutura química e o nível de acumulação de ácidos orgânicos é extremamente variável entre espécies, estágios de desenvolvimento e tipos de tecidos (SUEETMAN et al., 2009). O fumarato ácido dicarboxílico, um intermediário do ciclo

de Krebs em todas as espécies de plantas tem sido relatado por exibir uma multiplicidade de funções em ambas as plantas (FERNIE et al., 2004).

Todas as espécies de planta produzem o intermediário do ciclo do ácido cítrico fumarato que é gerado pela oxidação do succinato e a redução simultânea de ubiquinona a ubiquinol pela enzima desidrogenase succinato (SDH). Posteriormente, esse fumarato é convertido a malato pela ação da enzima fumarase. O papel do fumarato na planta é auxiliar na manutenção do pH celular ou ainda representar uma forma de armazenamento transitório de carbono fixado de um modo análogo ao da sacarose e amido (ARAÚJO et al., 2011). Por ser uma fonte de carbono, é usado na produção de outros fotossintatos como o aspartato (ARAÚJO et al., 2011). Assim sendo, a maior concentração de fumarato nas plantas controle em relação às plantas inoculadas pode ser atribuída à sua utilização em plantas inoculadas para biossíntese dos aminoácidos, fato que explicaria parcialmente a presença dos aminoácidos glicina e prolina nestas plantas. Além disso, o aminoácido glicina tem função na biossíntese de clorofila essencial para a fotossíntese, tal fato nos leva a justificar a presença deste aminoácido naquelas plantas devido a uma melhoria geral no processo fotossintético em função de a sua interação com as rizobactérias. Desta forma, a melhoria no processo fotossintético ocasionaria uma produção mais acentuada de fotossintatos, o que demanda uma maior quantidade carbono, matéria base necessária para biossíntese destes fotossintatos, pois diversos trabalhos indicam o fumarato como um “reservatório” de carbono alternativo para fotossintatos de modo semelhante ao amido (ZELL et al., 2010; PRACHAROENWATTANA et al., 2010).

Caso o estabelecimento da interação entre a RPCPs e a cana-de-açúcar estivesse interferindo com a produção de fumarato, de modo que a sua produção estivesse sendo diminuída, alguns processos fisiológicos da planta poderiam estar sendo prejudicados. Expecula-se, por exemplo, que fumarato é necessário em quantidade considerável como substrato respiratório para evitar a senescência induzida por escuro (FAHNENSTCH et al., 2008). Contrastando com esses resultados, Nunes e colaboradores (2007) trabalhando com plantas de tomate transgênico com uma expressão e atividade da fumarase reduzida, mostaram que essas plantas exibiram prejuízo no processo da fotossíntese, o que resultou em uma taxa de crescimento reduzida.

PRACHAROENWATTANA e colaboradores (2010) especulam que o acúmulo de fumarato em folhas parece ser necessário para um rápido crescimento e

assimilação de N em concentrações mais elevadas. Condições as quais, as plantas de cana-de-açúcar inoculadas usadas em neste trabalho estão submetidas. Assim, pode-se sugerir um possível redirecionamento do fumarato nas plantas inoculadas, processo que forneceria alguma vantagem à planta auxiliando em outros dos seus processos fisiológicos, como por exemplo, na produção de e outros aminoácidos como aspartato. Se de fato ocorresse a inibição da biossíntese de fumarato nessas plantas observaríamos senescência, fato não detectado neste trabalho. Além disso, poderia-se sugerir ainda que fumarato estivesse sendo utilizado na gliconeogênese para a produção de glicose em plantas inoculadas, porém esse processo não é comum em plantas.

No ciclo de Krebs, o fumarato pode ser ainda convertido a malato e posteriormente, a oxaloacetato. O oxaloacetato por sua vez sofre transaminação originando aspartato na mitocôndria. Alternativamente, aspartato pode ser originado no citosol. O aspartato sendo precursor comum em duas distintas vias. Uma delas é originado pela ação da enzima asparagina sintase, a asparagina, que atua como transportador de nitrogênio. A segunda via dá origem a síntese de outros quatro aminoácidos: lisina, treonina, metionina e isoleucina (AZEVEDO et al., 2006). O papel do aspartato parece ir muito mais além do que apenas um simples transportador de nitrogênio. Alguns trabalhos demonstram, por exemplo, que o estabelecimento da simbiose entre *R. meliloti* em leguminosas, que envolve uma série de etapas, desde a penetração de bactérias dentro no pelo da raiz, passagem por canal de infecção tubular especializado para o córtex da raiz, onde eles quem são liberados para as células corticais. Posteriormente, passando por um número limitado de divisões celulares até se diferenciarem como bacteroides maduros, alongados fechados dentro de uma membrana peribacteroidal derivada do hospedeiro, depende do fornecimento de metabólitos substratos para as bactérias pela planta hospedeira. Em troca, as plantas recebem nitrogênio reduzido na forma de amônia.

Pouco se sabe sobre as fontes de carbono e de nitrogênio utilizados pelas bactérias durante crescimento dentro do segmento infecção ou durante os estágios iniciais da sua proliferação no interior das células hospedeiras corticais. Especula-se que um ou mais dos ácidos tricarbóxicos (TCA) intermediários do ciclo C4-dicarboxilato, como succinato, fumarato e malato, em geral, são os principais substratos no fornecimento de carbono e de energia fornecida pela planta ao bacteroide

maduro porém, pouco se sabe a respeito desses aspectos (RASTOGI e WATSON, 1991).

Rastogi e Watson (1991) trabalhando com um mutante de *R. meliloti*, que não é capaz de catabolizar aspartato, mostraram que a mutação afeta a atividade da aspartato aminotransferase (Aspat), fazendo com que o mutante desenvolva nódulos defeituosos na simbiose. Os autores então sugeriram que o aspartato pode servir como um substrato essencial para as bactérias dentro do nódulo. Além disso, eles também relatam que os mutantes de *R. meliloti* não poderiam crescer usando aspartato como uma fonte de carbono, uma vez que o sistema de transporte dicarboxilato estava ausente nesses mutantes. O fato de que os mutantes são simbioticamente defeituosos poderia ser devido à sua incapacidade para transportar aspartato, em vez de a sua incapacidade para transportar succinato, fumarato e malato.

O fato que RPCPs usadas no presente trabalho são comprovadamente fixadoras de N poderia-se especular que aspartato fosse usado por essas bactérias como fonte de nitrogênio. Porém de acordo com Rastogi e Watson (1991), para bactérias nodulantes se o N fosse obtido a partir de aspartato não haveria necessidade de assimilar nitrogênio na forma de amônia. Eles argumentam que este fato é consistente com a estudos sobre a eficiência simbiótica de mutantes de *R. meliloti* que não apresentam glutamina-sintetase e glutamato-sintase, enzimas necessárias para a utilização de amônio, nos quais atividades da glutamina sintetase foram identificados em *R. meliloti*, mas, nenhuma sendo necessária para fixação simbiótica de nitrogênio. Da mesma forma, os mutantes sem atividade de glutamato sintase foram descritos. Eles foram considerados simbioticamente eficazes, apesar de uma incapacidade de crescer com amônia como fonte de N.

Além disso, o trabalho de Matos e colaboradores (2001), que mostra o perfil de transcritos de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus*, demonstra a presença de todas as enzimas envolvidas com o metabolismo do nitrogênio incluindo aquelas envolvidas na biossíntese de aminoácidos. Aspartato aminotransferase AspAT está presente em cana-de-açúcar associada a *G. diazotróphicus*. Assim, poderíamos sugerir que de modo semelhante ao que ocorre com *R. melilote* a RPCPs usadas no presente trabalho também estejam utilizando aspartato como fonte de carbono para seu crescimento, fato este, que explicaria a redução deste metabolito na análise metabolômica das plantas de cana-de-açúcar inoculadas.

5.2 Alterações no comportamento de *Diatraea saccharalis* - Antibiose

Quando o inseto se alimenta de plantas e esta exerce um efeito adverso sobre a sua biologia, diz-se que a planta apresenta resistência do tipo antibiose. Percebe-se que uma planta que apresenta este tipo de resistência afeta direta ou indiretamente a reprodução do inseto (LARA, 1991). No presente trabalho foi avaliado a associação entre plantas de cana-de-açúcar e RPCPs foi capaz e conferir a planta resistência do tipo antibiose.

As simbioses da planta com microrganismos benéficos podem resultar em alterações importantes na fisiologia das plantas que são frequentemente relacionadas com o crescimento e desenvolvimento da planta, mas eles também têm um impacto importante na capacidade da planta para lidar com o estresse. Na verdade, a indução de tolerância/resistência a estresses pode explicar a perpetuação da simbiose planta-micróbio em condições em que não existam benefícios nutricionais para a planta (SMITH et al., 2010).

A interação entre bactérias endofíticas e plantas não-leguminosas contrasta com a interação entre endofíticos e leguminosas no sentido de que esta associação pode se desenvolver em todos os tecidos da planta, sem a formação de órgãos especializados. Assim, além de promover a supressão da doença por meio de antagonismo microbiano ou indução de resistência na planta, pode promover a solubilização de nutrientes do solo, como também a biossíntese de compostos antibióticos (VAN LOON, 2007; KANAG et al., 2014)

Em muitas gramíneas ocorrem associações simbióticas com microrganismos endofíticos. As mais estudadas em associação mutualística como endomicorrizas são espécies dos gêneros *Neotyphodium* e *Epichloe* (PANKA et al., 2013). Em relação a interação cana-de-açúcar com bactérias endofíticas uma das interações mais estudadas é a que ocorre com a bactéria *G. diazotrophicus* que é uma bactéria que coloniza plantas de cana-de-açúcar e promove o crescimento das mesmas, age na solubilização de nutrientes como fósforo, e é produtora de hormônios vegetais como o AIA (LERY et al., 2011). Em plantas de cana-de-açúcar, *G. diazotrophicus* é de considerada importância agrícola devido à sua capacidade de fornecer nitrogênio atmosférico fixado e disponibilizado para as plantas. Outras contribuições para as plantas hospedeiras incluem a produção de hormônios de promoção do crescimento de plantas como AIA, etileno, AJ, secreção de compostos que combatem agentes patogênicos

como a *X. albilineans* e solubilização de fosfato e compostos de zinco (BLANCO et al., 2005; DODD et al., 2010).

Diversos trabalhos mostram tanto a importância dos microrganismos no controle de insetos-pragas na agricultura, como também a diversidade dos mecanismos de controle exibida por esses endófitos (AZEVEDO et al., 2000). Weber (1981) relatou que ocorreu proteção fitossanitária promovida pelo fungo endófito *P. oblonga* em plantas de olmeiros (*Ulmus* sp.) (*Ulmaceae*) contra o besouro *Physocnemum brevilineum* (*Colioptera: cerambicedae*) Claydon e colaboradores (1985) confirmaram as hipóteses propostas por Weber (1981) quando mostraram que fungos endofíticos da família *Xylariaceae* foram capazes de sintetizar metabolitos secundários em plantas hospedeiras do gênero *Fagus* (*Fagaceae*) e que estas substâncias afetaram as larvas do besouro.

As plantas hospedeiras quando colonizadas por microrganismos endofíticos benéficos também tem sido descritas como mais resistentes a insetos. Jallow e colaboradores (2004) realizando trabalho em laboratório e experimentos em casa de vegetação, testaram a hipótese de que o fungo endofítico não especialista (*Acremonium strictum*) restrito ao sistema radicular da planta hospedeira era capaz de mediar a interação entre o inseto herbívoro polígrafo (*H. armigera*) e tomate que é uma de suas plantas hospedeiras. Seus resultados indicaram uma variação significativa na capacidade das plantas inoculadas em relação às plantas controle para apoiar as fases do ciclo de vida do inseto, de modo que as lagartas criadas em plantas inoculadas sofreram uma redução significativa na taxa de crescimento; seu tempo de desenvolvimento foram prolongados; as pupas foram mais propensas a morte, além do surgimento de adultos menos fecundos em comparação com larvas criadas nas plantas controle.

No presente trabalho, as taxas de crescimento de *D. saccharalis* em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com as RPCPs foram analisados, os resultados não mostraram diferença significativa em relação ao controle. Contrastando com esses resultados, os resultados apresentados por Jallow e colaboradores (2003) mostram que o peso de lagartas de *H. armigera* alimentadas com folhas de plantas de tomate sem a presença do inóculo (plantas do controle) foi significativamente maior do que o peso das larvas alimentadas com folhas da planta inoculada com o fungo endofítico *A. strictum*.

Azevedo (2000) argumenta que a presença de endófitos, mesmo aqueles que pertencem a grupos em que alguns membros são conhecidos por controlar insetos, nem sempre resulta em um controle efetivo de pragas. Os resultados apresentados por Faeth e Hammon (1996, 1997a e 1997b) em trabalho com plantas de carvalho (*Quercus* sp.) (fagaceae) infectado ou não infectadas com o fungo *Asteromella* sp. demonstraram que não houve diferença significativa no tamanho e no período de sobrevivência de larvas de insetos. Além disso, a pequena quantidade de alcaloides acumulado nas plantas hospedeiras pode explicar a falta de diferenças no peso, sobrevivência das larvas e a emergência dos adultos quando os insetos foram alimentados com plantas infectadas ou não pelo fungo. Bactérias promotoras de crescimento de plantas estão atualmente recebendo muita atenção, uma vez que pesquisas recentes sugerem que as bactérias podem atuar como agentes de biocontrole, desempenhando um papel fundamental nas respostas de defesa da planta, como proteção de plantas a microrganismos causadores de doenças e de insetos pragas. O potencial dessas comunidades benéficas tem ganhando importância dentro do contexto da agricultura sustentável. No entanto, ainda muito se sabe sobre os mecanismos envolvidos na melhoria de defesa da planta induzida por RPCPs. (BROCK et al., 2013).

As simbioses da planta com microrganismos benéficos podem resultar em alterações importantes em sua fisiologia que são frequentemente relacionadas com o crescimento e desenvolvimento da planta, que também têm um impacto importante na capacidade da planta para lidar com o estresse. Na verdade, a indução de tolerância/resistência a estresses pode explicar a perpetuação da simbiose planta-micróbio em condições em que não existem benefícios nutricionais para a planta (SMITH et al., 2009). Nas últimas décadas tem havido cada vez mais evidências que demonstram que plantas podem ser preparadas para a ativação mais eficiente das respostas de defesa celular após a infecção por RPCPs, resultando num aumento da resistência a várias tensões biótica ou abiótica (CONRATH et al., 2006).

As plantas, durante a evolução, desenvolveram várias estratégias de defesa contra a herbivoria de insetos. Sendo estas respostas de defesa constitutivas, que estão presentes na planta independente do dano do herbívoro e respostas de defesa induzidas que são produzidas por um ataque herbívoro. Se essas respostas servem para proteger a planta (ferindo ou não o inseto), são denominadas defesas constitutivas; se elas tem efeito negativo sobre o inseto em ataque (defendendo ou não a planta); são

denominadas resistência induzida (TAIZ e ZEIGER, 2009; GUREVITCH et al., 2009).

A resistência sistêmica induzida pode ser resultado da interação de uma planta e o ambiente, como também da atividade benéfica de RPCPs em reduzir a susceptibilidade das plantas a infestações por patógenos e insetos, a qual ocorre não só através do antagonismo microbiano, mas também por um mecanismo de reforço da capacidade de defesa das plantas, chamado RSI. Uma das características da RSI é o seu espectro de ação e eficiência de combate que engloba todos os tipos de patógenos, incluindo bactérias, fungos, vírus e, por vezes, nematóides e insetos. Em contraste com a resistência sistêmica adquirida (RSA), que resulta do aumento de resistência após infecção patogênica, as respostas da ISR são dependentes de JA e ET.

Como consequência dos diferentes tipos de defesa, como RSA (desencadeada por patógenos necrosantes) e RSI (desencadeados por RPCPs), um fenômeno chamado "priming" pode proteger as plantas contra estresses bióticos e abióticos, aumentando a defesa, incluindo expressão dos genes relacionadas a patogênese (PR) e deposição de compostos fenólicos. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares relacionados ao priming (VAN LOON, 2007; GUREVITCH et al., 2009; DURRANT et al., 2004).

O priming pode ser ativado de várias formas, tais como, por infecção por agentes patogênicos necrosantes, colonização de raízes de plantas por microrganismos benéficos (por exemplo, rizobactérias e fungos micorrízicos), herbivoria de insetos, ou específicos, por compostos naturais ou sintéticos, tais como o ácido salicílico e β -aminobutírico (AS e BTH) (CONRATH et al., 2006; FROST et al., 2008). Por exemplo, rizobactérias mediadoras de ISR estão associadas à preparação para uma maior expressão gênica sensível a AJ e ET. Assim, os efeitos mediados por rizobactérias em plantas sobre os insetos herbívoros podem variar dependendo de vários fatores, como o grau de especialização da planta hospedeira e seu tipo de alimentação (PINEDA et al., 2010). Zehnder e colaboradores (2001) demonstraram que a RSI desencadeada por cepas de rizobactérias resultou não só na resistência contra a murcha bacteriana causada pelo patógeno *Erwinia tracheiphila*, mas também em alimentação reduzida pelos besouros do pepino *Diabrotica undecimpunctata* (Coleóptera: chrysomelidae) e que são vetores do patógeno *E. tracheiphila*. Os resultados demonstraram que RSI mediada por RPCPs contra a murcha bacteriana como também contra o besouro do pepino foi associado com concentrações reduzidas

de cucurbitacina, um metabólito secundário vegetal e poderoso estimulante da alimentação do besouro.

O trabalho de Gadhave e Gange (2015) objetivou avaliar o desempenho do pulgão especialista da couve *B. brassicae* frente a alimentação com plantas de couve tratadas com diferentes RPCPs. Avaliações foram efetuadas para identificar os efeitos de tratamentos individuais e misturas das RPCP *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* sobre o crescimento e características importantes do ciclo de vida e suas dinâmicas populacionais. Os resultados mostraram que a taxas de crescimento de *B. brassicae*, quando alimentados com plantas do controle, foram mais elevadas em comparação com aqueles alimentados em plantas tratadas RPCPs, onde os adultos mostraram-se relativamente menos fecundos e com períodos pré-reprodutivos significativamente mais longos. Os autores argumentam que as diferenças observadas nas características de *B. brassicae* podem ser atribuídas a alterações bioquímicas que as rizobactérias podem ter desencadeado nas plantas.

Além disso, estudos anteriores sugerem que rizobactérias podem manipular a qualidade da planta como material de alimentação, através de alterações constitutivas e induzidas (BROCK et al., 2013; KANG et al., 2014). Os autores argumentam ainda que *Bacillus* spp. também podem ter provocado resistência sistêmica nas plantas tratadas, através de uma interação de vias de sinalização de ácido jasmônico e salicílico, que provavelmente afetaram o crescimento global e a infestação do pulgão. Outro ponto importante é o fato dos efeitos negativos do *Bacillus* sobre os períodos pré-reprodutivo e de fecundidade foram estendidas para ninfa e adultos de *B. brassicae*. Os efeitos foram relativamente mais lentos no início e aumentaram gradualmente ao longo do período experimental de 71 dias. Os autores discutem que essas observações ocorreram possivelmente como resultado de alterações na composição do aminoácidos da planta, tal como sugerido por Karley e colaboradores (2002).

Karley e colaboradores (2002) discutem que a diferença no conteúdo de aminoácidos entre as plantas jovens e velhas é responsável pela diferença de desempenho dos pulgões, e que o aminoácido dominante na seiva do floema do tubérculo das plantas é glutamina e diminui drasticamente à medida que as plantas se desenvolvem, permitindo que glutamato e aspartato passem a predominar. Níveis relativamente altos de glutamato têm sido implicados na redução da qualidade nutricional da seiva do floema para pulgões. O estresse metabólico resultante da

desaminação do glutamato (válido também para asparagina e aspartato, que são respectivamente desaminados e transaminados para formar glutamato); poderia aumentar a carga dos ácidos oriundos do ciclo de Krebs, o que causaria alterações para a homeostase do pH nos tecidos de afídeos. Assim, esse mecanismo contribuiria para a diferença de desempenho entre pulgões submetidos a dietas com plantas jovens e velhas (KARLEY et al., 2002).

No presente trabalho não observou-se diferença significativa no ganho de peso de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com plantas controle ou plantas inoculadas. Além disso, o conteúdo de aspartato verificado pela metabolômica foi maior nas plantas controle, o que nos leva a propor que esse aminoácido não desempenha função específica no ganho de peso das lagartas. Além disso, talvez possa ser observado alguma resposta negativa no ganho de peso das lagartas se utilizadas plantas em outras fases fenológicas, de modo semelhante aos resultados constatados por Gadhve e Gange (2015) que fizeram observações ao longo de um período experimental de 71 dias, visto que as plantas utilizadas em nosso trabalho tinham apenas em torno de 30 dias.

Van oosten e colaboradores (2008) ao avaliar a eficácia da RSI e RSA em *Arabidopsis thaliana* contra os insetos *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) e *S. exigua* argumentaram que seus resultados seguiram um padrão geral anteriormente proposto para efeitos de associações micorrízicas com base no comportamento de alimentação e grau de especialização do inseto herbívoro. Em seus resultados, eles mostraram que a colonização, por rizobactérias em *A. thaliana* induziu RSI e RSA e reduziu significativamente o crescimento e desenvolvimento do herbívoro generalista *S. exigua*, no entanto essa associação não afetou o crescimento do herbívoro especialista *P. rapae*. Esta defesa reforçada contra *S. exigua* poderia estar associada com a expressão aumentada de genes relacionados com a defesa PDF1.2 responsivos a ET e AJ além de proteínas HEL.

Em experimentos realizados em túnel de vento, verificou-se que RSI e RSA não afetaram a atração do inimigo natural que está relacionado à defesa indireta. Assim, efeito priming foi associado com uma maior defesa direta contra *S. exigua*, porém, não resultou em um aumento da atratividade a vespas parasitas, sugerindo que a resposta de defesa não afeta a biossíntese de voláteis. Supõe-se que as diferenças na produção de voláteis podem ter sido demasiadamente pequenas para serem detectadas (VAN OOSTEN et al., 2008)

RPCP como *P. fluorescens* podem induzir resistência sistêmica RSI em *A. thaliana* contra vários patógenos microbianos e insetos mastigadores. Sabendo disso Pineda e colaboradores (2012) avaliaram os mecanismos moleculares da RSI de plantas tratadas com *P. fluorescens* sobre o desempenho de duas espécies de afídeos, o generalista *M. persicae* e o especialista *B. brassicae*. Seus resultados indicaram que plantas tratadas tiveram um efeito positivo sobre o desempenho (peso e taxa de crescimento intrínseco) do generalista *M. persicae*, ao passo que nenhum efeito foi visto no especialista *B. brassicae*. Estes resultados contrastam com os resultados de Van oosten e colaboradores (2008), nos quais rizobactérias induziram resistência sistêmica contra o inseto generalista *S. exigua* enquanto que o especialista *P. rapae* não foi afetado. Assim, de modo semelhante a esses resultados, na atual pesquisa para o bioensaio sem chance de escolha pode ter ocorrido devido ao fato das plantas tratadas com RPCPs terem efeito neutro sobre o desempenho do herbívoro especialista *D. saccharalis*. Tal fato está de acordo com estudos que indicam que associações micorrízicas geralmente têm um efeito positivo ou neutro sobre o desenvolvimento de insetos sugadores (por exemplo, pulgões) e mastigadores especializados (por exemplo, lagartas) e um efeito negativo sobre mastigadores generalistas.

Assim, outras avaliações em fases de desenvolvimento mais avançada do inseto como também outras espécies de insetos com hábitos alimentares distintos, poderiam demonstrar resultados diferentes daqueles obtidos no presente trabalho.

5.3 Alterações no comportamento de *Diatraea saccharalis* - Antixenose

O bioensaio com chance de escolha foi planejado de modo que as lagartas tivessem a possibilidade de escolha entre as plantas controle ou inoculadas. Como resultado, houve diferença significativa na média das escolhas, de modo que as lagartas preferiram as plantas do controle. Esses resultados podem ser justificados com base em alguma alteração nos perfis de compostos orgânicos voláteis emitidos pelas plantas inoculadas. Panka e colaboradores (2013) relataram que em plantas de azevém perene, três derivados rota do ácido chiquímico (acetato de benzila, indol, e salicilato de metila), tiveram emissão tanto em plantas do controle quanto em plantas inoculadas, porém a concentração foi maior para todos os voláteis emitidos pelas plantas inoculadas.

Plantas sob ataque de herbívoros emitem misturas complexas de compostos orgânicos voláteis que atraem inimigos naturais dos herbívoros. Esta é uma das

principais formas de defesa indireta da planta. A via de sinalização do AJ é a via de sinalização mais importante envolvida na emissão destes compostos. Portanto, espera-se que os microrganismos benéficos podem afetar a taxa de composição ou de emissão de COVs. Um exemplo de uma alteração na emissão de voláteis por uma planta induzida por microrganismos ocorreu quando plantas de *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae) foram avaliadas em associação com micorrizas. As plantas inoculadas emitiram quantidades inferiores de sesquiterpenos do que as plantas não-micorrizadas (FONTANA et al., 2009). O presente trabalho mostra alterações qualitativas e quantitativas no perfil de voláteis, no entanto não foram efetuadas análises quantitativas dos compostos individualmente.

É descrito na literatura o papel de COVs liberados por RPCPs, que não estão em contato físico direto com a planta hospedeira, na promoção do crescimento de plantas como também da resistência sistêmica induzida contra o ataque de agentes patogênicos (ZHANG et al., 2007).

Compostos orgânicos voláteis (COVs) são metabólitos secundários de plantas que podem ser emitidos sob a influência de fatores bióticos e abióticos. Panka e colaboradores (2013), em seus resultados com plantas de azevem perene inoculadas com fungo endofítico *N. lolii*, verificaram que a presença do fungo endofítico aumentou a concentração dos COVs emitidos pelas plantas inoculadas. Verificaram também que não houve variação qualitativa entre os dois tratamentos.

Ryu e colaboradores (2003) demonstraram a promoção do crescimento em *A. thaliana* promovida por *B. subtilis* estirpe GB03 e *B. amyloliquefaciens* estirpe IN937a. Entre os COVs liberados a partir da estirpe GB03, 2,3-butanediol foi encontrado como um componente importante e provocou RSI contra *E. carotovora* subsp. *Carotovora*.

Lee e colaboradores (2012) avaliaram se COVs específicos de RPCPs *P. polymyxa* estirpe E681 poderia promover o crescimento e induzir resistência em *A. thaliana* contra *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326. Os resultados demonstraram que a RSI induzida por compostos orgânicos voláteis liberados a partir da estirpe E68 é mediada pelos genes de defesa PR1, chib e VSP2 indutores do priming. Além disso, a partir de uma mistura de 30 COVs, o tridecano foi encontrado como indutor de RSI contra *P. syringae* pv. *maculicola*. Eles argumentaram que o tridecano tem um efeito negativo sobre a promoção de crescimento o que indica que outros COVs de bactérias podem desempenhar um papel no crescimento de

plantas. Avaliando quais as vias estavam envolvidas na indução de ISR por qRT-PCR, o tridecano induziu um mecanismo de defesa da planta através da ativação das vias de sinalização de AS e AJ.

Sheoran e colaboradores (2015) trabalhando com *P. putida* BP25 (PpBP25R) isolada como um endófito em raízes saudáveis de pimenta preta cultivar Panniyur-5 relataram que os voláteis libertados durante o crescimento da PpBP25R foram capazes de combater agentes patogênicos, tais como *Pythium*, *Myriophyllum*, *Phytophthora capsici*, *Gibberella moniliformis*, *R. solani*, *Athelia rolfsii* e *C. gloeosporioides*.

Gadhve e Gange (2015) avaliaram a influência de uma mistura de RPCPs no desempenho do pulgão da couve *B. brassicae*. O número médio de folhas infestadas aumentou rapidamente nas plantas não inoculadas enquanto que em plantas inoculadas a infestação foi gradual. Além disso, a porcentagem de folhas infestadas em 71 dias após a semeadura foi significativamente reduzida em todas as plantas tratadas, no entanto atribuíram esses resultados apenas a alterações na composição de aminoácidos. No presente trabalho, foi analisado a influência de uma mistura de RPCPs na preferência de lagartas de *D. saccharalis*. Verificando que as lagartas preferiram as plantas do controle supondo-se assim uma possível influência dos voláteis emitidos pelas plantas inoculadas para este comportamento.

Sabe-se que alguns herbívoros podem ser atraídos e outros repelidos pelos voláteis induzidos após a herbivoria, porém poucos são os relatos envolvendo a interação inseto planta mediada por rizobactéria promotoras do crescimento de plantas. O entendimento desse tipo de interação é importante no sentido de que milhões de litros de inseticida são gastos todos os anos no combate ao ataque de insetos na cana-de-açúcar. Alguns trabalhos tem demonstrado que a interação inseto planta é influenciada pela ação de RPCPs e neles é relatado que a emissão de compostos orgânicos voláteis é uma defesa de planta do tipo indireta, ao passo que a produção de compostos tóxicos contra herbívoros é uma defesa do tipo direta. Ambas as defesas direta e indireta estão sob o controle de uma rede complexa de vias de transdução de sinal que são reguladas por diferentes fitohormônios, dos quais o ácido jasmônico (AJ) é o regulador mais importante. AJ tem sido classicamente considerado o regulador chave de defesas contra mastigadores de folha, mas não há evidência crescente de seu papel crucial na defesa direta e indireta contra insetos sugadores. Curiosamente, resistência sistêmica induzida que é mediada por rizobactérias promotoras do crescimento também é regulada pela via AJ de transdução de sinal caracterizando uma

forma de priming para uma maior e melhor defesa em vez de ativação direta de defesa (PINEDA et al., 2012).

Pineda e colaboradores, (2012) realizaram o estudo que fornece evidência de que bactérias da rizosfera não patogênicas podem afetar as interações de uma planta de modo a causar modificações na mistura de voláteis induzida por herbívoros influenciando a atração de insetos predadores\parasitóides acima do solo. Nesse trabalho os autores verificaram que parasitoides *Diaeretiell rapae* (Hymenoptera) tinham uma preferência menor por voláteis de plantas de *A. thaliana* infestadas de pulgões *M. persicae* que tinham sido previamente colonizados por rizobactérias. A identidade dos voláteis era a mesma nas plantas dos dois tratamentos, porém, as proporções mostraram-se diferentes.

No presente trabalho, o perfil dos voláteis emitidos por plantas inoculadas e infestadas diferiu do perfil de voláteis emitido pelas plantas controle infestadas qualitativa e quantitativamente. Sugerimos que essa diferença pode ser responsável pela preferência das lagartas de *D. saccharalis* pelas plantas controle.

Foi proposto que o efeito priming em plantas, mediado por microrganismos benéficos é uma consequência da modulação do sistema de defesa da planta associado com o estabelecimento da simbiose que implica em mudanças na sinalização relacionadas com a defesa (PIETERSE et al., 2012). O estudo de Nogueira e colaboradores (2001) sugerem que a associação entre RPCPs (*G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans*) e cana-de-açúcar no intuito de controlar a colonização e o supercrescimento do endófito, a planta pode ter evoluído no reconhecimento de bactérias e levando assim, a respostas de defesa contra os endófitos. Esses autores verificaram a expressão diferencial de ESTs relacionadas com a sinalização de resposta de defesa da planta causados pelas RPCPs. Dentre os ESTs identificados estavam aqueles que codificam a lipoxigenase LOX (envolvidas na biossíntese de AJ). Como o hormônio vegetal AJ é um regulador chave da defesa vegetal contra insetos herbívoros, a indução de RSI por RPCPS deve afetar interações planta-inseto.

No presente trabalho, possivelmente as RPCPs estejam influenciando as respostas de defesa da planta contra o inseto, já que as lagartas preferiram em média as plantas do controle em relação as inoculadas. Impondo-se que a defesa indireta parece está sendo influenciada pelas RPCPs, porém, de acordo com o padrão proposto para associações micorrízicas, o efeito é dependente do modo de alimentação e nível de especificidade do inseto herbívoro (POZO e AZCON-AGUILAR, 2007). Desse modo,

provavelmente respostas distintas daquelas obtidas no presente trabalho, poderiam ser obtidas se fossem usadas espécies de insetos com hábitos alimentares diferentes daquelas dos insetos aqui usadas, ou ainda se fossem feitas avaliações em plantas em estágio vegetativo mais avançado como também em variedades de plantas diferentes da usado neste trabalho. O resultado de uma possível influência de rizobactérias dessas espécies sobre a interação envolvendo cana-de-açúcar x inseto parece ser o primeiro relato na literatura.

Neste trabalho foi utilizado lagartas de *D. sacharalis*, um inseto especialista ou generalista, pois ataca outras culturas. Desse modo, os resultados do bioensaio com chance de escolha, podem ser reflexos de mecanismo que se beneficia do priming promovido pelas RPCPs, porém de modo contrastante com os resultados de Van Oosten e colaboradores (2008), pois aqui a produção de voláteis foi beneficiada e não as defesas diretas, já que no bioensaio com chance de escolha as lagartas preferiram as plantas do controle, apontando para uma influência nas defesas indiretas mediadas por voláteis.

6 Conclusões

- as rizobactérias influenciam tanto o metabolismo primário quanto o metabolismo secundário das plantas inoculadas;
- as plantas inoculadas apresentaram maior concentração dos metabólitos glicina, prolina, lactato, ácido gálico, sacarose e glicose;
- ocorreu aumento na concentração dos metabólitos fumarato e aspartato nas plantas controle;
- as rizobactérias alteram o perfil de voláteis emitido pelas plantas inoculadas e inoculadas sob infestação;
- não há diferenças significativas no ganho de peso de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas com inoculadas e controle;
- as lagartas de *D. saccharalis* preferem em média as plantas controle.

REFERÊNCIAS

- ALLWOOD et al. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. **Physiologia Plantarum**. v. 132, p 117–135. 2008.
- ASHBOLT, N. J., AND INKERMAN, P. F. Acetic acid bacterial biota of the pink sugarcane mealy bug, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. **Appl. Environ. Microbiol.** v 56, p. 707-712. 1990.
- ARENCIBIA et al. Gluconacetobacter diazotrophicus Elicits a Sugarcane Defense Response Against a Pathogenic Bacteria Xanthomonas albilineans. **Plant Signaling & Behavior** v.1 c. 5. p. 265-273 2006
- AHEMAD e KIBRET. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: **Current perspective. J. King Saud Univ. Sci.**, v. 26, p. 1-20, 2014.
- ARAÚJO et al. Antisense Inhibition of the Iron-Sulphur Subunit of Succinate Dehydrogenase Enhances Photosynthesis and Growth in Tomato via an Organic Acid–Mediated Effect on Stomatal Aperture. **The Plant Cell**. v. 23, p. 600–627 2011.
- AZEVEDO, M.S., TEIXEIRA, KIRCHHOF, G., HARTMANN, A. & BALDANI, J.I. Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. **Pedobiologia**. v. 49, p.565-576, 2005.
- AZEVEDO (2000) Azevedo JL, Maccheroni W Jr, Pereira JO, Araújo WL. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electron J Biotechnol**. v.3(1), p.40–65, 2000
- BRENDEMEIER & MUNDSTOCK, Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. **Ciência Rural, Santa Maria**. v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.
- BALDANI, J. I., AZEVEDO, M. S., REIS, V. M., TEIXEIRA, K. R., OLIVARES, F. L., GOI, S. R., BALDANI, V. L. D. & DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. S.; Lopes, A. S.; Guilherme, L. R. G.; Faquin, V.; Furtini Neto, A. E.; Carvalho, J. G., (Ed.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. **Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS**. p. 621-666. 1999.
- BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Genus III. *Herbaspirillum* . **In Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology – The Protobacteria**, 2.ed. v. 2, part C, p. 629-636, 2005.
- BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L., & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp.nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington. v.36, p.86-93, 1986.

BALDANI, J.I., KRIEG, N.R., BALDANI, V.L.D., HARTMANN, A. & DOBEREINER, J. Genus II. *Azospirillum*. In: D. J. Brenner; N. R. Krieg; J. T. Staley; G. M. Garrity. (Org.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York **Springer**. Newark, , v. 2 - C, ed 2, p. 7-26, 2005.. 2005

BALDANI, J.I., REIS, V.M., BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology** v. 29, p.417-423, 2002.

BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. Canadian, **Journal of Microbiology**, v. 29, p.924-929, 1983.

BHATTACHARYYA P. N.; JHA D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol.** v.28, p.1327–1350, 2012.

BALDANI J. et al. Emended description of *Therbaspirillum*: inclusion of [pseudomonas] *rubruisu baltican*. a mild plant pathogen as subgenus *comb-nov*. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species **3. f.J.S.B.** v. 3 46, p. 802 810, 1996.

BALDANI et al., RECENT Advances in bnf with non-legume plants. **SoitBidt.Biochem.** v. 29, n. 516, p. 911-922, 1997. .

BLANCO et al., Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a Sugarcane Endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (Pathogen) Studied in Alginate-Immobilized Sugarcane Stalk Tissues. *Journal of bioscience and bioengineering.* v. 99, n. 4, p. 366–371. 2005.

BALDANE & BALDANE. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences.** v. 77(3), p 549-579. 2005.

BOLTON. Primary Metabolism and Plant Defense—**Fuel for the Fire e-Xtra.** v. 22, n. 5, 2009, p. 487–497 2009.

BROCK, et al. Impact of the PGPB *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 on growth, glucosinolate profile, and immune responses of *Arabidopsis thaliana*. *Microbial Ecology.* v. **65**, p, 1–10. 2013.)

CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. *Mol. PlantMicrobe Interact.* v.19, p. 1062–1071 2006.

CHOE, Choi, H.W., Hwang, B.K., 2011. Systemic acquired resistance of pepper to microbial pathogen. *J. Phytopathol.* v. 159, p. 393–400, 2011.

CAVALCANTE & DÖBEREINER. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **PlantSoil**, v. 108, p. 23–31, 1988

- CABALLERO-MELLADO, J., MARTINEZ-AGUILAR, L., PAREDES-VALDEZ, G., & ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., in N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 54, p. 1165-1172, 2004.
- CARVALHO et al., Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. **Tropical Plant Biol.** v. 4, p. 31-41 2011.
- COMPANTE et al. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and environmental microbiology.** p. 4951-4959, 2005.
- DUNN & ELLIS, Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry.** v. 24, n. 4, 2005.
- DALTON et al. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. **FEMS Microbiology Ecology.** v. 49, p. 469-479 2004.
- DEKHIL, S.B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E. & SLY, L.I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum lagomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology.** v. 20, p. 72-77, 1997.
- DUTTA, D. & GACHHUI, R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. Nov., isolated from *Kombucha tea*. **Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 57, p. 353-357, 2007.
- DÖBEREINER, J.; PAULA, M.A. de, MONTEIRO, E.M.S. A pesquisa em microbiologia do solo no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia, Rio de Janeiro.** v. 50, p. 841-854, 1990.
- DÖBEREINER, J; REIS, V.M. & LAZARINI, A.C. New N₂ fixing bacteria in association with cereals and sugarcane. In: Bothe, H.; de bruijn, F.J. Newton, W.E. eds. Nitrogen Fixation: hundred years after. **Stuttgart: Gustav Fischer.** p. 717-722, 1988.
- DÖBEREINE et al., DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis, Rehovot,** v.13, p.1-13, 1992 1992;
- DONG et al: A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Plant Physiol.** v. 105, p. 1139-1147 1994.
- DOOD I. C. et al. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Ann Appl Biol** v. 157, p. 361-379, 2010.

- DÖBEREINER J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Bid. Biochem.** v. 29, No. 36, p. 771-774. 1997.
- DODI et al. Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. **Journal of Experimental Botany.** v. 55. ed. 4007. p. 2353-2362. 2004.
- DOUGLAS et al. The nutritional quality of phloem sap utilised by natural aphid populations. **Ecol. Entomol.** v. 18, p. 31-38, 1993..
- W.E. Durrant and X. Dong. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 42, p. 185–209, 2004.
- ERB et al. Planchamp C D'Alessandro M., Turlings T.C.J. & Ton J. Signal signature of aboveground-induced resistance upon belowground herbivory in maize. **The Plant Journal** v. 59, p.292–302, 2009.
- FUENTES-RAMÍREZ, L.E., BUSTILIOS-CRISTALES, R., TAPIA-HERNANDEZ, A., JIMENEZ-SALGADO, T., WANG, E. T., MARTINEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. Nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp.nov. associated with coffee plants. **Int. J. Systemaic and Evolutionary Mictobiology.** v. 51, p.1305-1314, 2001.
- GLICK BR, TODOROVIC B, CZARNY J, CHENG Z, DUAN J Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Crit Rev Plant Sci.** v. 26, p. 227–242, (2007)
- GADHAVE e GANGE. Plant-associated *Bacillus* spp. alter life-history traits of the specialist insect *Brevicoryne brassicae* L. **Agricultural and Forest Entomology** , 2015.
- GILLIS, M., TRAN VAN, T., BARDIN, R., GOOR, M., HERBAR, P., WILLEMS, A SEGERS, P., KERSTERS, K., HEULIN, T., & FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to na emended description of the genus and preposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. Nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,
- GOUGH e CULLIMORE. Lipo-chitooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions. **The American Phytopathological Society** v. 24, n. 8, p. 867–878, 2011.
- GAMALERO E. et al. Interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences for the growth of cucumber under salt stress conditions. **J Appl Microbiol.** v. 108, p.236–245 2009.
- G. RAMOS et al. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using ¹⁵N-isotopetechniques. **Journal of Biotechnology.** v. 91 p.105–115. 2001.

- HAAS , DE´FAGO Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nat Rev Microbiol.** v. 3, p.307–319 2005
- JAMES & OLIVARES. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.** v. 17, p. 77–119, 1997.
- JAMES E K. Nitrogen fixation endofitic and associative symbioses. **Fields Crops Research.** v. 65. p.197-209 2000.
- JALLOW et al. Indirect interaction between an unspecialized endophytic fungus and a polyphagous moth. **Basic Appl. Ecol.** v.5, 2003.
- JETIYANON & KOEPPER Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological Control.** v. 24, p. 285–291, 2002.
- KANAG et al. Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contents to Promote Mustard Plant Growth. **Indian J Microbiol.** v. 54(4): p. 427–433, 2014.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M. & HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp., nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fiber plants. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 51, p.157-168, 2001.
- KRISHNAM et al. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany.** v. 56, No. 410, p. 255–265, 2005.
- VAN LOON LC. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **Eur J Plant Pathol.** v. 119, p.243–254, 2007.
- LIN et al Plant Growth-Promoting Nitrogen-Fixing Enterobacteria Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China. **Microbes Environments.** v.. 27, n. 4, p.391–398, 2012.
- LEE S. et al.. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology.** v.186, p. 5384–5391. 2004.
- LERY et al. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. **Proteomics** v.8, p.1631–1644, 2011.
- LEVEAU e LINDOW Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290 **Applied and environmental microbiology**, p. 2365–2371, 2005.

- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Na. Acad. Brasileira Ciências**. v. 55, p. 417-430, 1983.
- MEHNAZ, S., WESELOWSKI, B. & LAZAROVITS, G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 2805-2809, 2007a.
- MEHNAZ, S., WESELOWSKI, B. & LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 620-624, 2007b.
- MEHNAZ, S., WESELOWSKI, B. & LAZAROVITS, G. Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 29, p. 496-501, 2006.
- MIFLIN & LEA. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*. v. 15. c., 6 p. 873-885, 1976.
- MUTHUKURAMASAMY R et al.. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**. v.28, p.277–286. 2005.
- MINERDI et al. *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 76, p. 342–351 2011.
- NOGUEIRA, E.M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.P.; VARGAS, C.; DE PÁDUA, V.L.M.; DA SILVA, F.R.; DOS SANTOS, R.V.; BALDANI J.I.; FERREIRA, P.C.G. & 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.
- NUNES e colaboradores (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**. v. 50, p. 1093–1106, 2007)
- OLIVEIRA et al. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **PI Soil**. v. 242, p. 205–215, 2002
- OLDROYD et al., The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. **Annu. Rev. Genet.** v. 1. p. 45:119–44. 2011.
- PHANG, J.M. The regulator function of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. **Cur. Top Cell regul.**, v. 25, p.92-132, 1985.
- PRACHAROENWATTANA et al. Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. **Plant J.** v.1; ed. 62(5), p. 785-95 2010.

- PANKA. Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/*Neotyphodium lolii* association as a response to infection by *Fusarium poae*. **Journal of Plant Physiology**. v. 170 p. 1010–1019, 2013.
- PRIMAVESI, A. Manejo ecológico do solo. **São Paulo: Nobel**, 2002
- PEDRAZA, Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 125, p. 25–35, 2008
- PEDRAZA et al. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v. 233, p. 15–21, 2004.
- PIETERSE, C.M.J., VAN DER DOES, D., ZAMIOUDIS, C., LEON-REYES, A. & VAN WEES, S.C.M. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489–521. 2012.
- PINEDA, A., ZHENG, S.-J., VAN LOON, J.J.A., PIETERSE, C.M.J. & DICKE, M. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soilborne microbes. **Trends in Plant Science**. V.15, p. 507–514, 2010.
- PINEDA, A., SOLER, R., WELDEGERGIS, B.T., SHIMWELA, M.M., VAN LOON, J.J.A. & DICKE, M. Non-pathogenic rhizobacteria interfere with the attraction of parasitoids to aphid-induced plant volatiles via jasmonic acid signaling. **Plant, Cell & Environment**. v. 36, p. 393–404, 2012a.
- PINEDA, A., ZHENG, S.-J., VAN LOON, J.J.A. & DICKE, M. Rhizobacteria modify plant–aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility. **Plant Biology**, v.14 (Suppl. 1), p. 83–90, 2012b
- PINEDA et al., Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. **Trends in Plant Science**. v. 15, p. 507–514. 2010.
- PINEDA et al. Non-pathogenic rhizobacteria interfere with the attraction of parasitoids to aphid-induced plant volatiles via jasmonic acid signaling. **Plant, Cell & Environment**, v. 36, p. 393–404. 2012a.
- PINEDA et al. Rhizobacteria modify plant–aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility. **Plant Biology**, v. 14 (Suppl. 1), p. 83–90. 2012b.
- PINEDA et al., Beneficial microbes in a changing environment: are they always helping plants to deal with insects? **Functional Ecology**. v. 27, p. 574–586, 2013.
- PAULA, M. A.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. & DÖBEREINER, J. Esporos de fungo MVA *Glomus clarum* como veículo de infecção de *Acetobacter diazotrophics*. Anais da **Academia Brasileira de Ciências**. v. 62, p. 318-319, 1990.
- PAULA M.A et al., Paula. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum*

spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**. v. 11, p. 111–115, 1991.

PANKA G. F. L. et al. Ventilatory and muscular assessment in healthy subjects during an activity of daily living with unsupported arm elevation. **Rev. bras. fisioter**, v.14, n.4 ISSN, p.1413-3555, 2010.

POZO, M.J. & AZCON-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhizainduced resistance. **Curr. Opin. Plant Biol.** 10, 393–398, 2007.

PINEDA et al.,. Helping plants to deal with insects:the role of beneficial soil-borne microbes **Trends in Plant Science**. v. 15, p.507–514, 2010.

PEDRAZA. R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology** v.125 p.25–35 2008.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; TAO WANG, E. & TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 1263-1271, 2006.

PEDROSA, F. O. e GENOPAR CONSORTIUM. First insights into *Azospirillum* genome. In: 15th International Congress on Nitrogen Fixation and 12th Conference of the African Association on Biological Nitrogen fixation. **Cape Peninsula University of Technology & Sister Institutions in Cape Town, Cape Town**, January 21-26th, p5., 2007.

PERIN et al.. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.39, n.8, p.763-770, 2006.

PIÑÓN et al. *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.

REMANS e colaboradores Remans, R., Beebe, S., Blair, M., Manrique, G., Tovar, E., Rao, I., Croonenborghs, A., Torres-Gutierrez, R., El-Howeity, M., Michiels, J., Vanderleyden, J., 2008. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Soil**. v. 302, p. 149–161, 2008.

RODRIGUES, E.P.; RODRIGUES, L.S.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S. & REIS, V.M. *Azospirillum amazonense* inoculation: Effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**. v. 302, p. 249-261, 2008.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S. & DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov. a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 37, p. 43-51, 1987.

REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENÓRIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A. & CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **Int. J. System. And Evoluc. Microbiol.** v.54, p. 2155-2162, 2004.

RYU et al. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. **Proc Natl Acad U S A**; v. 100 p4927–32. 2003.

REIS JR F.; SILVA M.F.; TEIXEIRA K.R. S.; URQUIAGA S. & REIS V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados à *Brachiaria* spp. em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitorromônio pela bactéria. **Rev Bras Ci Solo.** v. 28, p. 103-113, 2004.

SEVILLA et al. 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. **The American Phytopathological Society.** v. 14, n. 3, p. 358–366, 2001.

SAIKIA, S. P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma? **Current Science.** v. 92, n. 3, 2007.

SOO SON et al. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. **Applied Soil Ecology.** v.73, p. 1–8, 2014.

STEPHAN MP et al. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiol Lett.** v.77 p. 67–72., 1991.

SALOMONE, G.; DÖBEREINER, J. Maize genotypes effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology Fertilizer Soils, Oxford.** v.21, p.193-196, 1996.

SARAF M. et al. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. **Microbiological Research.** v. 169 p. 18–29. 2014.

STEPHAN , M.P et al., Stephan.,. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters.** v. 77, p. 67–72 1991.

TEXEIRA, K.R.S; STEPHAN, M. P. & DÖBEREINER, J. Physiological studies of *Saccharobacter nitrocaptans*, a new acid tolerant N_2 -fixing bacterium. **In: Poster presented at the International Symposium on Nitrogen Fixation with non-legumes. Rio de Janeiro, abstract.** p.149, 1987.

TAPIA-HERNANDEZ, A.; BUSTILIOS-CRISTALES, M. R.; JIMENEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J. & FUENTES-RAMÍREZ, L.E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial ecology.** v. 39, p. 49-55, 2000.

TIKHONOVICH & PROVOROV. From plant–microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the interspecies genetic integration. **Ann Appl Biol.** v.154, p. 341–350 2009.

VANDENKOORNHUYSE, P; MAHE, S; INESON, P; STADDON, P; OSTLE, N; CLIQUET, JB; FRANCEZ, AJ; FITTER, AH; YOUNG, JPW.. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into Rna. proceedings of the national academy of sciences of the united states of america. v. 104. ed. 43, p. 16970-16975, 2007.

VAN LOON L C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **Eur J Plant Pathol.** v. 119, p. 243–254, 2007

VAN LOON L.C. et al. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 44, p. 135–162 2006.

VAN DER ENT et al., Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry.** v. 70, p. 1581–1588. 2009.

VAN OOSTEN et al. Differential Effectiveness of Microbially Induced Resistance Against Herbivorous Insects in Arabidopsis **The American Phytopathological Society.** v. 21, n. 7, p. 919–930. 2008.

SMITH, S.E., FACELLI, E., POPE, S. & SMITH, F.A. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. **Plant and Soil,** v. 326, p. 3–20. 2009.

WHIPPS.M.J. Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere. v. 52, p. 487-511, 2001.

WEBER et. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM MUDAS DE BANANEIRA. **Pesq. agropec. bras., Brasília,** v.35, ed.11, p.2277-2285. 2000

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 56 p. 889-893, 2006.

XIE, C-H. & YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.** v. 55, p. 1233-1237, 2005a.

XIE, C-H. & YOKOTA, A. Reclassification of *Alcaligenes latus* strain IAM12599 and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas australica* sp.nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. **Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.** v. 55, p. 2419-2425, 2005b.

XIE. & YOKOTA.. *Dyella japonica* gen. nov., sp. nov., a γ proteobacterium isolated from soil. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 55, p. 753– 756, 2005c.

XIONG e ZHU. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, September, v. 133, p. 29–36, 2003.

ZHANG et al. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* v. 226, p. 839–851, 2007..

ZEHNDER eet al. Application of rhizobacteria for induced resistance *European Journal of Plant Pathology*. v. 107: p 39–50, 2001

ZHAO et al Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology* v. 101, p.292–297, 2010.