

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE ESTABELECIMENTO ENDOFÍTICO DE ESTIRPES DE *Azospirillum* E *Herbaspirillum* EM MILHO E ARROZ

LIAMARA PERIN¹; MARINETE FLORES DA SILVA¹; JOILSON SILVA FERREIRA¹; ERINEUDO LIMA CANUTO²; ANDRE FERNANDO ALVES MEDEIROS³; FABIO LOPES OLIVARES⁴ & VERONICA MASSENA REIS⁵

1- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 23890-000. 2- Laboratório de Eco Fisiologia Aplicada; Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, 23890-000. 3- Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000. 4- Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ, 28013-600. 5- Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, 23890-000. e-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

RESUMO

Devido a grande variabilidade inter e intra-específica quanto a capacidade de estabelecimento endofítico, foram utilizados marcadores e técnicas de microscopia que permitiram a comparação entre as bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a plantas de milho e arroz. Os resultados mostraram que a técnica de imunofluorescência foi eficaz para a detecção do estabelecimento endofítico destas bactérias. Para ambas as plantas, *H. seropedicae* apresentou maior capacidade de estabelecimento endofítico radicular quando comparada com *A. brasilense*.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas endofíticas, fixação biológica de N₂

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ENDOPHYTIC ESTABLISHMENT CAPACITY OF STRAIN OF *Azospirillum* AND *Herbaspirillum* BACTERIA IN CORN AND RICE

Due to the great inter and intra-specific variability regarding to the, endophytic establishment capacity, markers and microscopy techniques were used that allowed the comparison between the diazotrophic bacteria *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* associated with plants of maize and rice. The results showed that for both plants, *H. seropedicae* presented greater capacity of radicular endophytic establishment when compared to *A. brasilense* and that the immunofluorescence technique was efficient to detect the endophytic establishment of these bacteria.

Key words: endophytic diazotrophic bacteria, biological nitrogen fixation.

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são definidos como aqueles que passam pelo menos parte de seu ciclo de vida dentro dos tecidos da planta hospedeira, sem que a planta apresente sintomas visíveis de doença. Na verdade, pesquisas realizadas na última década têm demonstrado que bactérias estabelecidas endofiticamente podem também desempenhar um papel fisiológico importante no crescimento da planta hospedeira, como por exemplo, o biocontrole de fitopatógenos (Kloepper *et al.*, 1978), a supressão da doença por indução de resistência localizada e/ou sistêmica (Duijff *et al.*, 1997), promoção do crescimento vegetal (Mirza *et al.*, 2001) ou melhoria da nutrição nitrogenada via fixação biológica de nitrogênio (Baldani *et al.*, 1983). O estabelecimento endofítico, comparado ao ambiente rizosférico, tem sido considerado um evento importante para que as bactérias

possam influenciar mais eficientemente no crescimento da planta, visto que no interior do vegetal a competição microbiana é menor, este nicho é menos sujeito a flutuações ambientais e a interface de troca de metabólitos é mais direta quando comparada com a rizosfera. É válido ressaltar também que entre as bactérias existe uma grande variabilidade inter e intra-específica na capacidade de estabelecimento endofítico e que os gens envolvidos na capacidade de infecção bacteriana e colonização endofítica não são totalmente conhecidos. A maioria dos estudos de adesão, infecção e colonização são realizados entre gramíneas utilizando estirpes do gênero diazotrófico *Azospirillum*, sendo que estirpes da espécie *A. brasilense* apresentam ou não a capacidade de estabelecimento endofítico (Baldani *et al.* 1987). Bactérias diazotróficas endofíticas em gramíneas possuem penetração passiva na planta, acessando o seu interior através de ferimentos, de sítios de emergência de raízes, coifa e estômatos nas folhas,

espalhando-se pelos tecidos radiculares via apoplasto, colonizando os espaços intercelulares das células da hipoderme, córtex radicular e parede do aerênquima (Olivares *et al.* 1996, Olivares *et al.*, 1997; James *et al.* 1994; James & Olivares, 1998). Porém estudos envolvendo o processo de infecção e colonização são ainda escassos, necessitando de programas de seleção de microrganismos endofíticos para determinada espécie de planta com ensaios sob condições de casa de vegetação e campo utilizando marcadores para a estirpe a ser testada e técnicas microscópicas para monitorar e localizar a bactéria, permitindo sua caracterização como endofítica, esclarecendo o processo de interação planta-microrganismo, pois diferentes contribuições com a inoculação de estirpes do mesmo gênero de bactérias diazotróficas endofíticas foram observadas em culturas como arroz inundado (Guimarães, 2001) e cana-de-açúcar (Canuto, 2003). O objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade de estabelecimento endofítico das bactérias diazotróficas, *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho e arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos

Sementes de arroz (*Oriza sativa*) variedade IR 42 e Milho (*Zea mays*) variedade BRS Sol da Manhã foram lavadas por 1 minuto em álcool (70%), posteriormente lavadas em tampão fosfato (100 mM pH 6,8) e pré-germinadas em papel de filtro. Após emissão da radícula, cinco plântulas foram transferidas para potes de 500 g, contendo uma mistura de areia e vermiculita na proporção (2:1) previamente autoclavadas. No momento do transplante, cada plântula foi inoculada com 0,1 mL de uma suspensão bacteriana contendo 10^8 células mL⁻¹, em quatro tratamentos que consistiram da inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67 (ácido nalidíxico 10), *Azospirillum brasilense* estirpe Sp7 (estreptomicina 10), mistura de Z67 com Sp7 e controle não inoculado.

Meio de isolamento e contagem

O isolamento e a contagem das bactérias diazotróficas foi feito de acordo com Döbereiner *et al.*, (1995). Para tal, as plantas foram cuidadosamente coletadas e lavadas em água corrente, sendo separadas em raízes e parte aérea para determinação da massa fresca. Pesou-se 1 g de raízes lavadas dos diferentes tratamentos, e procedeu-se a desinfestação superficial utilizando uma solução aquosa de Cloramina T a 10 g. L⁻¹ por 1 minuto, seguida de lavagem em tampão fosfato (100 mM em pH 6,8) e água estéril. A seguir, as raízes foram trituradas em 9 mL de solução salina (NaCl, 8,5 g. L⁻¹), e a partir desta diluição (10^{-1}), procedeu-se a diluição seriada tomando-se 1 mL da diluição original em 9 mL de solução salina. A contagem das bactérias

foi estimada utilizando o método do Número Mais Provável (NMP), consultando a tabela de McCrady para 3 repetições por diluição, usando como meio de isolamento para a estirpe Z67 o JNFb semi-sólido sem adição de nitrogênio e com ácido nalidíxico (10 mg. L⁻¹), e o meio NFb semi-sólido sem adição de nitrogênio e com estreptomicina (10 mg. L⁻¹) para a estirpe Sp7, e ambos os meios para o tratamento mistura (Z67 + Sp7) e testemunha. Considerou-se como crescimento positivo a formação de uma película aerotóxica típica na superfície do meio após 7 dias de incubação do mesmo em câmara de crescimento a 30 °C, seguida de confirmação da morfologia da célula bacteriana ao microscópio ótico em contraste de fase.

Imunolocalização das bactérias inoculadas

Para detecção e localização específica das bactérias inoculadas utilizou-se anticorpos policlonais produzidos contra as estirpes Z67 e Sp7 usando a metodologia descrita por Reis *et al.*, (2000). O método de imunolocalização utilizou fluorocromos como marcadores e microscópio epifluorescente. Para tal, segmentos de raízes (0,5 a 1,5 cm) dos diferentes tratamentos foram colhidos, corados com azul de toluidina (10 g. L⁻¹) por 5 minutos, lavados 3 vezes em tampão fosfato (100 mM pH 6,8) e colocados em microtubos do tipo “eppendorf” para realização do ensaio. Os segmentos foram incubados com 1 mL de uma solução contendo albumina bovina (BSA 30 g. L⁻¹), diluído em tampão PBS por um período de 30 minutos a 37 °C, mantidos sob leve agitação. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpo policlonal específico para cada tratamento, diluídos na proporção 1:100 em PBS e mantidos a 37 °C por 30 minutos (anticorpo primário). No caso dos tratamentos controle e mistura, optou-se por uma mistura dos anticorpos. Decorrido este período, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato (100 mM pH 6,8), incubadas com anticorpo secundário biotilado (Sigma Chemical) por 40 minutos a 37 °C, seguida de 3 lavagens em tampão fosfato. Para revelar o sinal, as amostras foram ainda incubadas em solução 1/10 de estreptavidina marcada com fluoresceína e/ou rodamina (Sigma Chemical) diluídas em PBS por 20 minutos a 37 °C e lavadas por 5 vezes em tampão fosfato (100 mM a pH 6,8). Os segmentos foram montados em lâmina e lamínula, após rápida remoção do excesso de umidade e embebedimento por 10 minutos no meio de montagem (90 % glicerol misturado a PBS 10 %, pH 8,5), sendo observados no microscópio fluorescente com o conjunto de filtros de excitação e barreira adequados ao fluorocromo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A) Milho (*Zea mays*) Coleta 1

Foi observado (tabela1) que todas as bactérias

inoculadas promoveram aumento de massa radicular quando comparada à testemunha não inoculada aos 6 dias após a inoculação (d.a.i.), com aumentos variando entre 195 e 252%, sendo que a inoculação com Z67 foi a que promoveu maior aumento de matéria fresca de raízes. No tocante a massa fresca da parte aérea, tanto *H. seropedicae* estirpe Z67 e *A. brasilense* estirpe Sp7, isolados ou em mistura promoveram crescimento da parte aérea, com destaque maior para o inóculo misto. Em relação ao número de células bacterianas que se estabeleceram endofiticamente (tabela 1), apenas a estirpe Z67 de *H. seropedicae* colonizou o interior do tecido radicular, visto que as raízes foram desinfestadas superficialmente com cloramina T antes da contagem. Neste caso, aos 6 d.a.i., Z67 apresentou entre 10^4 e 10^5 células por g de raízes. *A. brasilense* Sp7 não se estabeleceu endofiticamente, não sendo detectado. Os valores para mistura representam a colonização por Z67, o que foi confirmado pelo isolamento em meio JNFb com ácido nalidíxico e pela morfologia celular ao microscópio ótico.

Tabela 1- Massa fresca de raízes (MFr) e da parte aérea (MFpa) e número de células bacterianas por grama de matéria fresca radicular de plantas de milho (*Zea mays*) var. Sol da Manhã aos 6 dias após inoculação média de 5 repetições.

Tratamento	MFr (mg)	MFpa (mg)	Log n° céls g ⁻¹
<i>H. seropedicae</i>	906 a	763 b	4,48
<i>A. brasilense</i> Sp7	701 c	765 b	n.d. ¹
Z67 + Sp7	771 b	904 a	4,07 ²
Controle não inoculado	359 d	437 c	n.d

Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. 1: n.d = não detectado pelo método do número mais provável (NMP); 2: Valores correspondentes a *H. seropedicae* Z67.

B) Milho (*Zea mays*) Coleta 2

Com as plântulas de milho inoculadas com diferentes bactérias e analisadas aos 14 dias após o plantio (tabela 2), observou-se que apenas a mistura das bactérias inoculadas promoveu o aumento da massa radicular quando comparada à testemunha, com menores aumentos se comparados aqueles apresentados na primeira coleta, variando entre 3 a 17 %. No parâmetro massa fresca da parte aérea a mesma tendência foi observada com incrementos entre 26 a 38 % para a mistura e a inoculação única com a estirpe Sp7, quando comparados ao controle não inoculado. O número de células bacterianas que se estabeleceram endofiticamente, aos 14 d.a.i. (tabela 2), seguiu a mesma tendência da coleta 1, onde apenas a estirpe Z67 de *H. seropedicae* foi detectada no interior do tecido radicular. Baseado nestes dados podemos concluir que a estirpe Z67 possui capacidade de estabelecer-se endofiticamente em milho var. Sol da Manhã, o que

não ocorreu para a estirpe Sp7 não sendo detectado pelo método do número mais provável. O valor obtido no tratamento mistura refere-se apenas a presença da estirpe Z 67.

Tabela 2- Peso da matéria fresca de raízes (PMFr) e da parte aérea (PMFpa) e número de células bacterianas por grama de matéria fresca radicular de plantas de milho (*Zea mays*) var. Sol da Manhã aos 14 dias após inoculação. (Valores expressos em mg como média de 5 repetições).

Tratamento	MFr (mg)	MFpa (mg)	Log n° céls g ⁻¹
<i>H. seropedicae</i>	837 b	1122 bc	3,87
<i>A. brasilense</i> Sp7	897 ab	1382 a	n.d. ¹
Z67 + Sp7	951 a	1269 ab	4,48 ²
Controle não inoculado	810 b	1001 c	n.d

Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. 1: n.d = não detectado pelo método do número mais provável (NMP); 2: Valores correspondentes a *H. seropedicae* Z67

C) Arroz (*Oriza sativa*)

Os dados contidos na tabela 3, são referentes ao acúmulo de massa fresca de raízes e da parte aérea de plantas de arroz variedade IR42 aos 12 dias após a inoculação com *H. seropedicae* estirpe Z67, *Azospirillum brasilense* estirpe Sp7, isolados ou em mistura. Para o arroz, não houve um efeito claro da inoculação, as plantas de modo geral não apresentaram bom crescimento. Com relação ao estabelecimento endofítico das bactérias inoculadas, apenas *H. seropedicae* Z67 foi hábil em colonizar o interior das raízes de plantas de arroz variedade IR42. Resultados similares àqueles obtidos para a contagem das bactérias nas plantas de milho nas duas coletas, comprovaram que para ambas espécies hospedeiras a estirpe Z67 apresentou maior capacidade de estabelecimento endofítico quando comparada à estirpe Sp7 (Tabela 3).

Tabela 3- Massa fresca de raízes (MFr) e da parte aérea (MFpa) e número de células bacterianas por grama de matéria fresca radicular de plantas de arroz (*Oriza sativa*) var. IR42 aos 12 dias após inoculação. Média de 5 repetições.

Tratamento	MFr (mg)	MFpa (mg)	Log n° céls g ⁻¹
<i>H. seropedicae</i>	31 ab	47 b	3,00
<i>A. brasilense</i> Sp7	27 ab	54 b	n.d. ¹
Z67 + Sp7	29 ab	64 a	4,0 ²
Controle não inoculado	33 a	52 b	n.d

Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. 1: n.d = não detectado pelo método do número mais provável (NMP); 2: Valores correspondentes a *H. seropedicae* Z67.

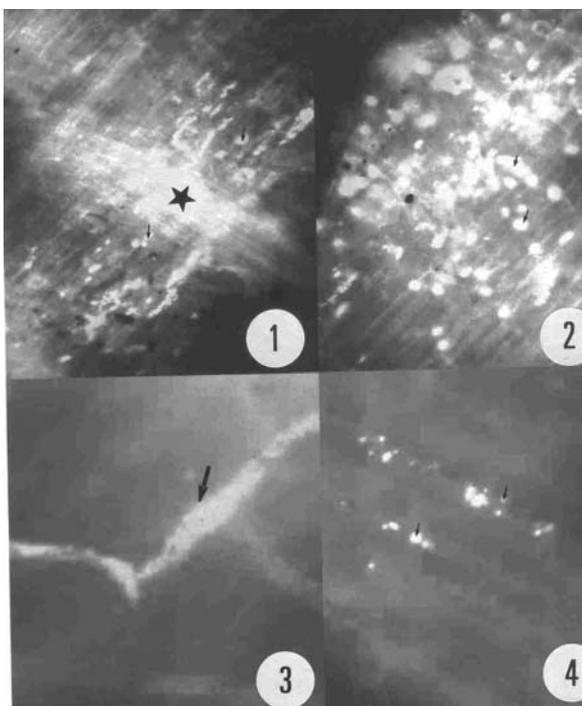
D) Imunolocalização das bactérias em raízes inoculadas

Segmentos de 0,5 a 1,5 cm de raízes de milho Sol da Manhã e arroz IR42 dos diferentes tratamentos, recém coletados e lavados em água, foram processados para a realização da técnica de imunofluorescência com o objetivo de identificar e localizar as bactérias inoculadas. Para tal, foram utilizados anticorpos policlonais específicos produzidos para *H. seropedicae* Z67 e *A. brasilense* Sp7. No caso da estirpe Sp7, foi também utilizado um anticorpo monoclonal específico para lipopolisacarídeos (LPS) da parede celular.

A avaliação dos segmentos de raízes de milho e arroz inoculados com *H. seropedicae*, ao microscópio epifluorescente evidenciou principalmente a presença da bactéria aderida em monocamada e mais predominantemente em microagregados na superfície das raízes na região de alongamento/diferenciação e zona de formação de pêlos radiculares. Baixa frequência de colonização foi observada na superfície dos pêlos radiculares e na região próxima a coifa. O padrão de colonização na forma de microagregados esta bem representado nas Figuras 1 e 2, onde respectivamente foram observadas uma grande densidade de microcolônias aderidas à superfície da raiz próximo ao sítio de saída de raízes laterais e na zona de formação de pêlos. Comparada a colonização da estirpe Z67, *A. brasilense* estirpe Sp7, aderiu muito pouco a superfície das raízes de ambas as espécies testadas, colonizando, embora em baixa frequência, porém em algumas vezes com elevada densidade a superfície dos pêlos radiculares (Fig. 3) e a zona de alongamento radicular (Fig. 4). Segmentos de raízes previamente observados para colonização superficial das raízes, foram congelados em nitrogênio líquido e seccionados a mão livre sob baixa temperatura para obtenção de cortes transversais. Estes cortes foram reexaminados ao microscópio fluorescente para observação do estabelecimento endofítico. O exame destas seções transversais corrobora com os dados populacionais de contagem em meios semi-específicos indicando que apenas *H. seropedicae* estirpe Z67 foi capaz de estabelecer-se endofiticamente. No caso do milho, a bactéria foi encontrada colonizando células do parênquima cortical (Fig. 5) e no arroz, a bactéria estava aderida a parede celular de células do aerênquima em formação e da endoderme (Fig. 6). Nenhum sinal específico para a estirpe Sp7 foi observado no interior das raízes de ambas as espécies confirmando os dados de cultivo.

A maioria dos segmentos de raízes não inoculadas não exibiram sinal relativo à presença das bactérias inoculadas (Fig 7). Porém, em algumas amostras os anticorpos utilizados localizaram poucas bactérias. Estes resultados podem ser de estirpes de *Herbaspirillum* ou *Azospirillum* naturalmente associadas às plantas e que foram detectadas pelo método. Os dados da microscopia corroboram os dados de contagem de células, evidenciando mais uma vez que, apenas a estirpe Z67 foi capaz de infectar e estabelecer-se no interior dos tecidos da planta. Esta

informação é de grande valia em programas de seleção de estirpes para inoculação, cujo caráter endofítico é relevante. Cabe ressaltar também que a técnica de imunofluorescência aqui utilizada é de fácil execução e apresenta grande eficácia na avaliação de um grande número de amostras de raízes para a localização de bactérias de interesse. O primeiro passo da interação endofítica, a adesão, pode ser rapidamente avaliado por esta técnica. Em uma seguinte etapa, a avaliação do estabelecimento endofítico pode ser também realizada através da obtenção e seleção de cortes transversais adequados à observação, com a vantagem de observar-se previamente segmentos mais densamente colonizados, antes de se proceder ao corte, o que aumenta a chance de sucesso na localização das bactérias no interior das raízes.



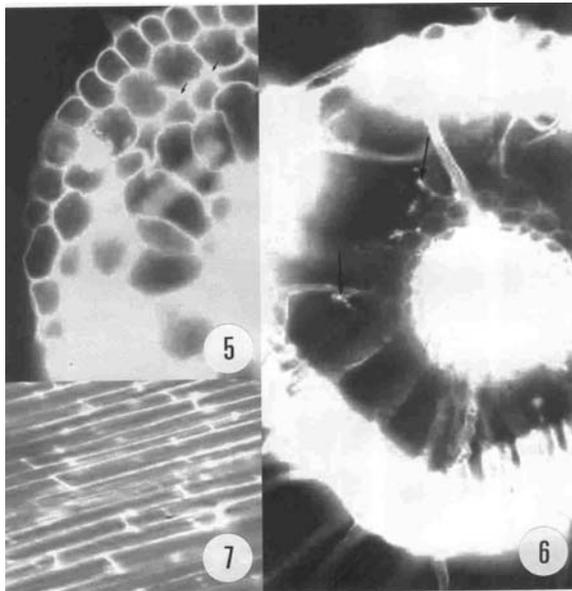
Figuras 1–4: Fotomicrografias de fluorescência de segmentos de raízes de arroz, variedade IR42, incubadas com anticorpos policlonais específicos para *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*.

Figura 1: *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67 colonizando por meio de microagregados (setas), a região da superfície das raízes de arroz, próxima a zona de emergência de raízes laterais (estrela). Aumento de 450X.

Figura 2: *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67 colonizando por meio de microcolônias (setas), a superfície das raízes de arroz, na zona de alongamento radicular. Aumento de 620X.

Figura 3: *Azospirillum brasilense* estirpe Sp7 colonizando densamente a superfície dos pêlos radiculares (setas). Aumento de 1200X.

Figura 4: *Azospirillum brasilense* estirpe Sp7 colonizando a superfície das raízes de arroz. Notar o baixo número de microcolônias aderidas à superfície radicular na zona de alongamento (setas) quando comparada ao tratamento inoculado com *Herbaspirillum seropedicae*. Aumento de 550X.



Figuras 5-7: Fotomicrografias de fluorescência de raízes de arroz variedade IR42 e milho variedade Sol da Manhã, incubados com anticorpos específicos para *H. seropedicae* e *A. brasilense*.

Figura 5: *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67 colonizando o interior das raízes de milho, provavelmente intercelularmente entre as células do parênquima cortical (setas). Aumento de 630X.

Figura 6: *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67 colonizando o interior das raízes de arroz, aderida na forma de microcolônias à parede celular na região do aerênquima cortical (setas). Aumento de 440X.

Figura 7 : Superfície radicular de plantas de arroz não inoculadas, evidenciando a ausência de sinal fluorescente específico oriundo da colonização de *Herbaspirillum* e *Azospirillum*. Aumento de 230X.

Nestes ensaios, utilizando como inóculo as estirpes Z67 de *Herbaspirillum seropedicae* e Sp7 de *Azospirillum brasilense*, observou-se aumento considerável de massa radicular e parte aérea em plantas de milho analisadas 6 dias após a inoculação, concordando com dados de pesquisas, onde 60 a 70 % dos experimentos demonstraram efeitos benéficos da inoculação de *Azospirillum* sobre o crescimento ou produção de algumas culturas de cereais e até leguminosas (Okon *et al.*, 1996). Esta bactéria além de diazotrófica produz substâncias promotoras de crescimento como ácido indol acético (AIA), giberelinas e citocininas (Tien *et al.*, 1979), atuando na morfologia e fisiologia das raízes das plantas com as quais se associa (Okon e Kapulnik, 1986), promovendo aumento do peso radicular, resultando numa maior superfície específica, auxiliando na melhor exploração do solo e na captação de água e nutrientes.

O melhor desenvolvimento das plantas de milho comparada às plantas de arroz, está relacionado a capacidade de fornecimento de metabólitos, já que os microrganismos diazotróficos dependem do fornecimento de metabólitos pelas plantas para expressarem sua capacidade de fixar biologicamente o

N₂ atmosférico e/ou produzir hormônios de crescimento. Estes ensaios que foram conduzidos em substrato estéril e pobre nutricionalmente, a planta, só dispôs das reservas da semente para seu desenvolvimento, portanto o tamanho da semente é proporcional a quantidade de reservas que contribuem para o suprimento nutricional das plantas. Tendo o milho uma semente maior que o arroz, portanto maior reserva, implicando num melhor desenvolvimento das plantas, que conseqüentemente suportam a população microbiana.

Baldani *et al.* (1987), inoculando diferentes estirpes de *Azospirillum* spp. em plantas de arroz em condições de campo e utilizando métodos de esterilização e contagem pelo número mais provável (NMP), verificaram que a estirpe Sp245, isolada de trigo, colonizou o interior das raízes e forneceu mais nitrogênio às plantas de trigo do que a estirpe Sp7, isolada de *Digitaria* sp., a qual foi incapaz de colonizar o interior das raízes. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho onde a estirpe Sp7 não foi encontrada no interior do vegetal através da observação ao microscópio ótico e isolamento em meio semi-seletivo JNFb com ácido nalidíxico em amostras esterilizadas superficialmente. Já a colonização endofítica da estirpe Z67 de *Herbaspirillum seropedicae*, parece ser um fenômeno comum, também detectado por Olivares *et al.* (1997), que mostraram que *Herbaspirillum* spp. era capaz de penetrar nas plântulas de cana-de-açúcar, preferencialmente via feridas provocadas pelo crescimento de raízes.

A técnica de imunofluorescência tem sido usada na identificação, quantificação e visualização de células *in situ* e em estudos de interações entre plantas e microrganismos, como bactérias fitopatogênicas em plantas (Van Overbeek *et al.*, 2002), na detecção de agentes causais de doenças em animais (Wairagkar *et al.*, 2001), na identificação de *Azospirillum* em plantas de trigo previamente inoculadas (Aßmus *et al.*, 1997) e demonstrou-se adequada neste trabalho na localização dos microrganismos alvos, sendo sensível e de rápida visualização.

Nos resultados encontrados através da técnica de imunofluorescência nos ensaios com milho, tanto aos 6 como aos 14 dias após a inoculação e arroz, indicam que apenas a estirpe Z67 de *Herbaspirillum seropedicae* demonstrou capacidade de estabelecimento endofítico, concordando com Schloter *et al.*, (1994) que utilizaram a mesma técnica e anticorpos monoclonais contra as estirpes Sp254 e Sp7 em trigo e Aßmus *et al.* (1995), que utilizaram sondas oligonucleotídicas específicas e marcadas com fluorocromos, acoplados com microscopia confocal e que chegaram a conclusão que a estirpe heteróloga Sp7 foi encontrada somente colonizando a superfície das raízes. Já a estirpe Z67 foi encontrada por Baldani (1996) colonizando os espaços intercelulares das raízes de arroz através das técnicas de microscopia ótica e eletrônica de transmissão.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao programa PRONEX II projeto número 76971051.00 pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A&B MUS, B.; HUTZLER, P. KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE, J. R. AND HARTMANN, A. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, p. 1019-1031, 1995.
- A&B MUS, B.; SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HUTZLER, P.; HARTMANN, A. Improved *In situ* tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbial Ecology*, New York, v. 33, n. 32-40, 1997.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 29, p. 284-299, 1983.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 4, p. 37-40, 1987.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legumes plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 4, p. 57-60, 1987.
- CANUTO, E. L. *Seleção de bactérias diazotróficas endofíticas para uso como insumo biológico em plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes*. 2003. 57p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; Brasília, D. F.: EMBRAPA-SPI, 60 p., 1995.
- DUIJFF, B.; GIANINIZZI-PEARSON, V. & LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopoly saccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytology*, Oxford, v. 135, p. 325-334, 1997.
- GUIMARÃES, S. L. *Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em 3 cultivares de arroz inundado*. 2001. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Infection and colonization of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 45, p. 757-766, 1994.
- JAMES, E. K. & OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Review in Plant Science*, Boca Raton, v. 17, p. 77-119, 1998.
- KLOPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th International conference on plant pathogenic bacteria*. Angers-France: *Station the Pathologie Vegetal et Phytobacteriologie*, v. 2, p. 8879-882, 1978.
- MIRZA, M. S.; AHMAD, N.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND P.; MALIK, K. A Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 237, p. 47-54., 2001.
- OKON, Y.; BURDMAN, S.; KIGEL, J.; ITZIGSOHN, R. Physiological properties of *Azospirillum brasilense* and its growth promoting effects in the rhizosphere. In: *International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Biological Nitrogen Fixation*, Program and Abstracts. Angra do Reis, p. 55-56, 1996.
- OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 90, p. 3-16, 1986.
- OLIVARES, F. L.; REIS Jr., F. B. dos; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Infection of sugarcane roots by

- the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. *International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Biological Nitrogen Fixation*, Programme and Abstracts. Angra do Reis, p. 65-66, 1996.
- OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. & DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp., *New Phytology*, Oxford, v. 135, p. 723-737, 1997.
- REIS, JR., SILVA, L. G. DA, REIS, V. M., DÖBEREINER, J., Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 5, p. 985-994, 2000.
- SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HEIZMANN, U.; DOBEREINER J. AND HARTMANN, A. Immunological studies of the wheat root colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: Hegazi, N. A; Fayez, M.; Monib, M., (ed.), *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*, Cairo, American University of Cairo Press, 1994, p. 291-297.
- TIEN, T. M.; GASKIN, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 37, p. 1016-1024, 1979.
- VAN OVERBEEK, L. S.; CASSIDY, M.; KOZDROJ, J.; TREVORS, J. T.; VAN ELSAS, J. D. A polyphasic approach for studying the interaction between *Ralstonia solanacearum* and potential control agents in the tomato Rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 48, p. 69-86, 2002.
- WAIRAGKAR, N. S.; SHAIKH, N. J.; RATHO, R. K.; GROSH, D.; MAHAJAN, R. C.; SINGHI, S.; GADKARI, D. A. Isolation of measles virus from cerebrospinal fluid of children with acute encephalopathy without rash. *Indian pediatrics*, New Delhi, v. 38, p. 589-595, 2001.