

INTERAÇÃO ENTRE *Gluconacetobacter diazotrophicus* E *Arabidopsis thaliana*:
COLONIZAÇÃO, PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E REGULAÇÃO DAS
VIAS DE DEFESA

ANA LÍDIA SOARES RANGEL DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

SETEMBRO/2015

INTERAÇÃO ENTRE *Gluconacetobacter diazotrophicus* E *Arabidopsis thaliana*:
COLONIZAÇÃO, PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E REGULAÇÃO DAS
VIAS DE DEFESA

ANA LÍDIA SOARES RANGEL DE SOUZA

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

SETEMBRO/2015

INTERAÇÃO ENTRE *Gluconacetobacter diazotrophicus* E *Arabidopsis thaliana*:
COLONIZAÇÃO, PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL E REGULAÇÃO DAS
VIAS DE DEFESA

ANA LÍDIA SOARES RANGEL DE SOUZA

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

Aprovada em 18 de setembro de 2015.

Comissão examinadora:

Prof. Márcio Alves Ferreira (D.Sc. em Ciências Biológicas - Genética) - UFRJ

Prof^a. Valdirene M. Gomes (D.Sc. em Ciências - Biologia Molecular) - UENF

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc. em Produção Vegetal) - UENF

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

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

Romanos 11: 33-36

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu esposo e grande amigo **Guilherme Almeida de Souza**, pela companhia constante, dividindo comigo os momentos difíceis durante esses anos. Obrigada por sua ajuda, apoio, paciência nos momentos difíceis e por me fazer sorrir apesar das situações.

Às minhas irmãs **Priscila Soares Rangel** e **Laís Soares Rangel** por serem minhas grandes amigas e verdadeiras companheiras, sempre me convencendo de que os sacrifícios valerão a pena.

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

Ao meu amigo **Alan Trindade Branco**, por ser um grande incentivador desde as minhas primeiras experiências na vida acadêmica e científica.

Ao professor **Fábio Lopes Olivares**, pelas críticas, sugestões e auxílio nunca negados sempre que necessário.

À professora **Tânia Jacinto** por ter feito a revisão deste trabalho de tese e pelas contribuições a ele prestadas.

Aos professores **Alessandro Coutinho**, **Márcio Alves** e **Valdirene Gomes** por aceitarem prontamente meu convite para fazer parte da banca examinadora desta tese.

Às amigas **Juliana Ferreira da Silva** e **Patrícia Louzada Rangel** por estarem sempre prontas a contribuir para meu crescimento pessoal e científico. A amizade de vocês foi imprescindível ao longo desses anos.

Aos colegas de equipe, **Aline Chaves Intorne**, **Charles Roubertth Soares Panisset**, **Leandro Fernandes**, **Luciano de Souza Vespoli**, **Marcos Vinícius Viana de Oliveira**, **Mariana Ramos**, **Roberta Ribeiro Barbosa** e **Suzane Ariádina de Souza** por me ensinarem tanto através da competência científica de cada um e pela agradável convivência, tornando cada dia um grande aprendizado.

Aos professores e funcionários do **Laboratório de Biotecnologia** pela contribuição prestada.

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

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

SUMÁRIO

Índice de figuras.....	IX
Índice de tabelas.....	X
Abreviaturas e símbolos	XI
Resumo.....	XIII
Abstract	XIV
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Interações entre plantas e microrganismos.....	3
1.1 – Tipos de interações entre plantas e microrganismos.....	3
1.2 – Efeito das interações entre plantas e microrganismos.....	4
1.3 – Ferramentas para estudo das interações entre plantas e microrganismos.....	5
2. Bactérias promotoras do crescimento vegetal.....	7
2.2 – Definição e importância das bactérias endofíticas.....	8
2.3 – Classificação e distribuição das bactérias endofíticas.....	9
2.4 – Colonização endofítica.....	10
3. Mecanismos de promoção do crescimento vegetal.....	12
3.1 – Mecanismos diretos.....	13
3.2 – Mecanismos indiretos.....	17
3.3 – Aplicações das bactérias endofíticas na Fitorremediação.....	18
4. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> : características e mecanismos de colonização.....	19
4.1 – Hospedeiros.....	20
4.2 – Principais enzimas.....	22
4.3 – Mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal.....	23
4.4 – Caracterização de genes e proteínas relevantes para a interação entre <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> e plantas.....	24
5. Sistema Imune Vegetal.....	26
5.1 – Imunidade Inata	26
5.2 – Imunidade Sistêmica	29

6. Fitormônios e a regulação do Sistema Imune Vegetal.....	29
7. <i>Arabidopsis thaliana</i> : modelo para estudo do sistema imune vegetal e expressão gênica.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
OBJETIVOS.....	76
Objetivo Geral.....	76
Objetivos Específicos.....	76
APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
Capítulo I: Endophytic colonization of <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> and its effect on plant growth promotion, plant physiology and activation of plant-defens.....	79
Capítulo II: Participação das vias hormonais na promoção do crescimento e ativação do mecanismo de defesa vegetal de <i>Arabidopsis thaliana</i> durante interação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5.....	113
CONCLUSÃO GERAL.....	148
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Os sistemas biológicos no entendimento das interações planta-microrganismo.....	6
Figura 2: Tipos de PGPB e seu processo de colonização da raiz.....	7
Figura 3: Microfotografia, ao microscópio eletrônico de transmissão, da bactéria endofítica <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	20
Figura 4: Diagrama das fases envolvidas na colonização radicular por comunidades microbianas benéficas presentes no solo e suas funções.....	28
Figura 5: Diagrama contendo características morfológicas de uma planta adulta de <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
Figura 6: Distribuição geográfica dos ecótipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
Figura 7: <i>Arabidopsis thaliana</i> durante seus diferentes estádios, desde a germinação da semente até o período de florescimento.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais características de linhas mutantes contendo afetações em genes das principais vias hormonais.....	37
Tabela 2: Principais características do material vegetal transgênico afetado na via de ácido salicílico.....	39

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACC.....	<i>1-amino-cyclopropane-1-carboxylic</i>
AIA.....	<i>Indole-3-acetic acid</i>
ABA.....	<i>Abscisic Acid</i>
ARF.....	<i>Auxin-response factor</i>
AUX.....	<i>Auxin</i>
BR.....	<i>Brassinosteroids</i>
cDNA.....	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CFU.....	<i>Colony forming units</i>
CFU.mL ⁻¹	<i>Colony forming units per milliliter</i>
COL-0.....	<i>Columbia</i>
DAMP.....	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DNA.....	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ETI.....	<i>Effector-triggered immunity</i>
ET.....	<i>Ethylene</i>
FBN.....	<i>Biological nitrogen fixation</i>
GDHm.....	<i>Membrane-bound glucose dehydrogenase</i>
GR.....	<i>Glutathione reductase</i>
HR.....	<i>Hypersensitive response</i>
ISR.....	<i>Induced systemic resistance</i>
IST.....	<i>Tolerane systemic resistance</i>
JA.....	<i>Jasmonic acid</i>
LPS.....	<i>Lipopolysaccharides</i>
LRR.....	<i>Leucine-rich repeat receptor</i>
MAMP.....	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MES.....	<i>Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico</i>
MTI.....	<i>Microbe-induced immunity</i>
PAMP.....	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
Pb.....	<i>Pares de Bases</i>
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGPB.....	<i>Plant growth-promoting bacteria</i>
PGPBE.....	<i>Plant-growth-promoting bacterial endophytes</i>
PGPR.....	<i>Plant growth-promoting rhizobacteria</i>

PQQ-DGH.....	<i>Pyroquinoline quinone glucose dehydrogenase</i>
PR.....	<i>Pathogenesis-related</i>
PTI.....	<i>Pathogen-induced immunity</i>
QS.....	<i>Quorum sensing</i>
RNA.....	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAseq.....	<i>RNA sequencing</i>
ROS.....	<i>Reactive oxygen species</i>
SA.....	<i>Salicylic acid</i>
SAR.....	<i>Systemic acquired resistance</i>
SOD.....	<i>Superoxide dismutase</i>
T3SS.....	<i>Type III secretion system</i>
TAIR.....	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>

RESUMO

A utilização de fertilizantes químicos industrializados representa um agravante nos custos de produção das lavouras, além de gerar prejuízos ao meio ambiente. Uma alternativa promissora é o emprego de bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) nas culturas economicamente importantes. Bactérias endofíticas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* conseguem colonizar o interior de espécies vegetais sem causar sintomas de doença. Os efeitos e características da interação entre *G. diazotrophicus* e plantas hospedeiras na promoção do crescimento vegetal tem sido alvo de muitas pesquisas. No entanto, os mecanismos que possibilitam a bactéria colonizar os tecidos vegetais de modo endofítico ainda não foram elucidados. Neste trabalho nós avaliamos o efeito da inoculação da planta modelo *Arabidopsis thaliana* com *G. diazotrophicus* no âmbito da promoção do crescimento vegetal e ativação da resposta imune vegetal. A expressão de genes envolvidos com vias metabólicas cruciais foi analisada, bem como o efeito de mutações nestas vias em diferentes genótipos, a fim de verificar a importância das mesmas no estabelecimento da colonização. Para isto, plântulas selvagens (COL-0) foram inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 aos 7 dias de idade. Após 50 dias, foi detectado em plantas inoculadas um aumento de 22% na massa fresca da roseta foliar, além de incremento do número de folhas e área foliar total. Na região radicular houve aumento de 35% da massa fresca. A microscopia de epifluorescência mostrou que a bactéria se confina no xilema vascular e afeta positivamente a fisiologia vegetal. Nossos resultados mostraram que ocorre ativação da defesa mediada por Ácido Salicílico (SA) na fase inicial da interação. Análises transcriptômicas revelaram forte indução de genes associados à produção e percepção de homônios e aos mecanismos de resposta imune vegetal. Os dados mostraram que os genes relacionados com as vias de Ácido Abscísico (ABA) e Ácido Jasmônico (JA) são fortemente induzidos nas raízes, enquanto em folhas predominam genes da via de SA. Apesar de todos os genótipos terem sido colonizados, aqueles incapazes de acumular SA ou mutados na via de Etileno (ET) mostraram-se mais responsivos ao efeito da bactéria no âmbito da promoção do crescimento. Juntos, nossos dados demonstram que *G. diazotrophicus* é capaz de colonizar e promover o crescimento de *Arabidopsis thaliana*. Tal colonização, restrita ao sistema radicular, simultaneamente ativa mecanismos de defesa contra bactérias nas folhas, revelando a regulação diferencial de vias hormonais entre tais partes da planta.

ABSTRACT

The use of industrial fertilizers is an aggravating factor in crop production costs, and generates losses to the environment. A promising alternative is the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) in economically important crops. Endophytic bacteria such *Gluconacetobacter diazotrophicus* can colonize the interior of plant species without causing disease symptoms. The effects and characteristics of the interaction between *G. diazotrophicus* and host plants to promote plant growth has been the subject of much research. However the mechanisms that enable bacteria to colonize an endophytic mode have not yet been elucidated. In this study we evaluated the effect of inoculation of model plant *Arabidopsis thaliana*, with *G. diazotrophicus* in the plant growth promotion and activation of plant defense. The expression of genes involved in crucial metabolic pathways was analyzed, and the effect of mutations in these hormonal pathways in different genotypes in order to verify their importance in the establishment of colonization and the beneficial effects of the presence of the bacterium. For this, seedlings wild-type (COL-0) were inoculated with *G. diazotrophicus* PAL5 at 7 days-old. After 50 days, was detected in plants inoculated a 22% increase in fresh weight of leaf rosette, and increase the number of leaves and total leaf area. In the root region was 35% increase in fresh weight. The epifluorescence microscopy showed that the bacteria are confined in the vascular xylem, and positively affect plant physiology. Our results showed that there is activation of the defense mediated by salicylic acid (SA) in the initial phase of the interaction. Transcriptomic analysis showed strong induction of genes of hormonal pathways and routes of plant immune response. The data showed that genes related to abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) pathways are strongly induced in roots. In leaves predominant pathway genes of SA. Although all genotypes have been colonized, those unable to accumulate SA and mutated pathway in ethylene (ET) were very responsive to the effect of bacteria in promoting growth. Together, our data show that *G. diazotrophicus* is able to colonize and promote the growth of *A. thaliana*. Such colonization, restricted to the root system, simultaneously activates defense mechanisms against bacteria on the leaves, revealing the differential regulation of hormonal pathways between these plant parts.

INTRODUÇÃO GERAL

Um dos maiores desafios da sociedade atual é aumentar a produção agrícola a fim de gerar alimento para a população que tende a atingir a marca de 8.3 bilhões de pessoas nos próximos 10 anos (Godfray et al. 2010). A produção de cereais como arroz, trigo e milho, que respondem pela metade da ingestão de calorias dos seres humanos necessitará de um aumento de 60% para atender a esta demanda (Alexandratos e Bruinsma 2012). No campo, a promoção do crescimento e produtividade vegetal ocorre através da aplicação de fertilizantes contendo nitrogênio, fósforo e potássio, além de outros produtos químicos que atuam como reguladores do crescimento ou inibidores da ocorrência de pragas e doenças. No entanto, esta prática contribui diretamente para a degradação ambiental, causando prejuízos à biodiversidade e oferecendo riscos para a saúde dos seres humanos, além de repercutir em elevados custos financeiros (Lugtenberg et al. 2013). Torna-se, portanto, crucial encontrar formas de favorecer o crescimento vegetal, reduzindo os gastos financeiros com adubação e evitando o impacto ambiental (Tkacz e Poole 2015).

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB; Bashan e Holguin 1998) são capazes de afetar positivamente o crescimento de plantas hospedeiras e favorecer a agricultura sustentável através de diversos mecanismos independentes ou correlacionados (Bashan e de-Bashan 2005; Reddy et al. 2010). Estes microrganismos ainda conferem resistência vegetal contra estresses (Kang et al. 2010; Kim et al. 2012) e podem auxiliar na recuperação de ambientes degradados (de-Bashan et al. 2012). Em comparação com os fertilizantes químicos, inoculantes microbianos apresentam diversas vantagens como o baixo custo financeiro, reduzido risco para o meio ambiente e para a saúde de seres humanos, efetividade em baixas concentrações, rápida decomposição e possibilidade de utilização no combate a pragas (Berg 2009).

No solo, tanto o número quanto o perfil populacional dos microrganismos sofrem influências das condições ambientais, incluindo temperatura e umidade, além da presença de sais e produtos químicos (Glick et al. 2012). Dentre a vasta comunidade microbiana, as bactérias endofíticas são aquelas que conseguem colonizar os espaços intercelulares e tecidos vasculares de diferentes órgãos vegetais, sem causar dano aparente, sintoma de doença ou reações de hipersensibilidade na planta hospedeira (Turner et al. 2013). Os efeitos benéficos que estes microrganismos proporcionam para a planta incluem a fixação biológica de nitrogênio (Verma et al. 2001), indução de resistência sistêmica (Ramamoorthy 2001), produção de antibióticos (Strobel e Daisy

2003), controle biológico de pragas e patógenos (Piñon et al. 2002; Arencibia et al. 2006), produção de fitormônios, vitaminas e enzimas moduladoras do crescimento (Saravanan et al. 2007) e produção de sideróforos (Wenbo et al. 2001).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria endofítica promotora do crescimento vegetal isolada de espécies economicamente importantes como a cana-de-açúcar (Cavalcante e Doberëiner, 1988), arroz (Muthukumarasamy et al. 2005) e café (Jimenez-Salgado et al.1997). Nestas interações o principal benefício obtido pela planta é a promoção do crescimento (Sevilla et al. 2001) decorrente da disponibilização de nitrogênio pela bactéria (Cojho et al. 1993) e/ou da produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal como auxina (Fuentes-Ramirez et al. 1993) e giberelina (Bastian et al. 1998), além do controle de fitopatógenos (Arencibia et al. 2006). Apesar do conjunto de informações existentes acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento das interações entre plantas e bactérias patogênicas, pouco se sabe a respeito das vias de sinalização envolvidas na interação planta/endófito.

Estudos utilizando plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*, têm aumentado significativamente a compreensão acerca da percepção e sinalização da imunidade vegetal (Schwessinger et al. 2015). Para culturas economicamente importantes é fundamental entender os processos envolvidos nas interações entre plantas e microrganismos benéficos mediante a realização de experimentos em ambientes controlados, aproximando os resultados obtidos das condições de campo (Farrar et al. 2014). Compreender os mecanismos que determinam a composição, dinâmica e atividade da comunidade microbiana benéfica é importante para o desenvolvimento de ferramentas voltadas para a produtividade agrícola (Raaijmakers et al. 2009).

Devido ao interesse em potencializar a colonização de plantas por bactérias benéficas e ampliar o uso desta tecnologia na agricultura, o entendimento acerca dos mecanismos moleculares associados ao reconhecimento da bactéria pela planta e do conjunto gênico regulado durante a interação é essencial. Neste contexto, o presente trabalho busca estudar a colonização da planta modelo *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* e verificar seus efeitos na fisiologia, crescimento e ativação da resposta imune, além de analisar o conjunto gênico regulado e a participação das vias hormonais no âmbito da promoção do crescimento vegetal.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – Interações entre plantas e microrganismos

As plantas vivem em ambientes complexos, nos quais interagem intimamente com uma ampla gama de microrganismos (Verhage et al. 2010). Estes ocupam nichos diversos, podendo ter estilo de vida livre ou se manterem aderidos ao hospedeiro através de biofilmes, havendo ainda espécies que apresentam crescimento intercelular dependente da planta hospedeira (Kniskern et al. 2007). Para se adaptar às condições de cada nicho, os microrganismos desenvolveram estratégias especializadas que os permitem colonizar raízes, folhas, feixes vasculares, flores ou frutos (Göhre e Robatzek 2008). Além da infinidade de interações com patógenos, as interações com microrganismos benéficos são frequentes na natureza, favorecendo o crescimento das plantas ou ajudando-as a superar estresses (Pieterse et al. 2009).

1.1 – Tipos de interações entre plantas e microrganismos

Classicamente, as plantas podem se associar com microrganismos de três formas diferentes: compatíveis, incompatíveis e “*non-host*” (Göhre e Robatzek 2008). A compatibilidade da interação é determinada pela regulação do sistema de defesa vegetal (Mithöfer 2002). Interações incompatíveis caracterizam-se pelo efeito de diversas barreiras físicas pré-formadas, como parede celular, cutícula e cera, que impedem a penetração do microrganismo nos tecidos vegetais (Hückelhoven 2007). Além disso, a planta estabelece um conjunto de mecanismos de defesa como redução do pH (Felle 1998), expressão de proteínas relacionadas com a patogênese (PRs), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e fenilpropanóides, que atuam diretamente contra o microrganismo invasor (da Cunha 2006), além da liberação de outros compostos antimicrobianos (Hückelhoven 2007). No entanto, alguns microrganismos conseguem acessar o interior do hospedeiro por meio de aberturas estomáticas, hidatódios ou ferimentos e subvertem a resposta de defesa vegetal, invadindo os tecidos da planta por meio de uma interação compatível, isto é, onde há suscetibilidade do hospedeiro (Göhre e Robatzek 2008). Em uma interação do tipo “*non-host*” um patógeno normalmente virulento para um hospedeiro específico não é capaz de infectar e crescer em um hospedeiro diferente (Ham et al. 2007).

1.2 – Efeitos das interações entre plantas e microrganismos

Quanto à natureza das associações compatíveis estas podem ser maléficas ou benéficas, trazendo efeitos neutros, deletérios ou benéficos para a planta hospedeira (Dobbelaere et al. 2003; Raaijmakers et al. 2009). Algumas vezes o efeito produzido por uma bactéria em particular pode variar de acordo com as condições do solo (Glick 2015). Os microrganismos que afetam de forma negativa o crescimento e a saúde vegetal em geral são bactérias e fungos patogênicos (fitopatógenos), oomicetos e nematoides, enquanto os microrganismos benéficos incluem as bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas, bactérias e rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB, Bashan and Holguin 1998; PGPR, Kloepper and Schroth 1978) e fungos micorrízicos. Bactérias que interagem com plantas, mas não causam efeito perceptível (embora muitas vezes se beneficiem da interação) são denominadas bactérias comensais (Glick 2015). O número e a diversidade de microrganismos nocivos ou benéficos relacionam-se com quantidade e qualidade dos nutrientes disponíveis (Somers et al. 2004). Como as células vegetais são circundadas por uma parede celular estável que não pode ser penetrada pela maioria dos microrganismos, estes se proliferam no espaço apoplástico. No entanto, algumas bactérias desenvolveram mecanismos de supressão da defesa vegetal que os permitem acessar o citoplasma e recuperar nutrientes da planta, estabelecendo uma associação maléfica ou patogênica (Göhre e Robatzek 2008). A bactéria *Pseudomonas syringae* possui um sistema de secreção (*type-three secretion system* - T3SS) que atravessa a parede celular e a membrana plasmática para injetar no citoplasma moléculas efetoras capazes de bloquear pontos específicos das vias que desencadeiam a resposta imune vegetal (Jin et al. 2003). Alguns fungos e oomicetos forçam a penetração das hifas no citoplasma vegetal pela pressão de turgor da parede celular. Subsequentemente formam-se estruturas de penetração (haustórios) que circundam a membrana plasmática da célula hospedeira (Göhre e Robatzek 2008).

O segundo caso de associação compatível caracteriza as interações benéficas que podem ser simbióticas ou endofíticas, nas quais o microrganismo é capaz de colonizar a planta hospedeira e gerar diversos efeitos benéficos para o crescimento e saúde vegetal através de diferentes mecanismos (Harrison 2005). Interações do tipo simbióticas permitem às espécies envolvidas sobrepor suas limitações fisiológicas pela utilização da capacidade uma da outra (Douglas 1994). A associação entre bactérias diazotróficas dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* e plantas

leguminosas resulta na morfogênese de um órgão derivado da raiz, o nódulo fixador de nitrogênio (Phillips e Torrey 1972), no qual a bactéria reside como endosimbionte e converte nitrogênio atmosférico em amônia, uma forma que pode ser assimilado pela planta. Esta, por sua vez, fornece compostos de carbono para a bactéria (Niebel et al. 1998; Oldroyd, 2013). Já as associações endofíticas caracterizam-se pela capacidade do microrganismo em colonizar os espaços intercelulares e tecidos vasculares de diferentes órgãos em plantas não leguminosas sem ativar resposta de defesa aparente ou persistente, sintoma de doença, danos ou reações de hipersensibilidade (Kloepper e Beauchamp 1992; Turner et al. 2013). Apesar das diferenças entre as espécies vegetais e microbianas envolvidas nas associações compatíveis benéficas, sabe-se que a região radicular é um excelente habitat para infecção e crescimento dos microrganismos, sendo, em geral, a parte da planta por onde a interação se inicia (Reinhold-Hurek e Hurek, 2011).

1.3 – Ferramentas para estudo das interações entre plantas e microrganismos

Apesar de bem caracterizadas, muitos aspectos relevantes acerca do estabelecimento das associações benéficas entre plantas e microrganismos permanecem obscuros. Entender de que forma as plantas percebem os conservados padrões moleculares presentes na estrutura dos microrganismos e respondem a eles tem sido uma busca ativa no campo da pesquisa. Já foi demonstrado que microrganismos mutualísticos são capazes de superar ou minimizar respostas de defesa da planta para garantir o sucesso da colonização (Zamioudis e Pieterse 2012; Alquéres et al. 2013). Além disso, estudos recentes têm demonstrado a importância dos compostos bacterianos de sensibilidade ambiental ou eficiente, definidos como *Quorum Sensing* (Hense et al. 2007), como moduladores no controle da expressão gênica durante o estabelecimento da interação plantas-microrganismos (Hartmann et al. 2014). O papel da membrana plasmática durante estas interações também é fundamental visto que as proteínas integrais ou periféricas regulam as interações bióticas, reconhecendo microrganismos e ativando cascatas de sinalização (Leborgne-Castel e Bouhidel 2014). Neste sentido, as redes proteicas dinâmicas envolvidas nos sistemas biológicos que caracterizam as interações entre plantas e microrganismos vêm sendo exploradas como uma nova fronteira na construção do conhecimento (Garbutt et al. 2014). Vários

elementos dos sistemas biológicos iniciam-se no nível das “-omas” e elaboram uma escala de macromoléculas e suas interações (Figura 1).

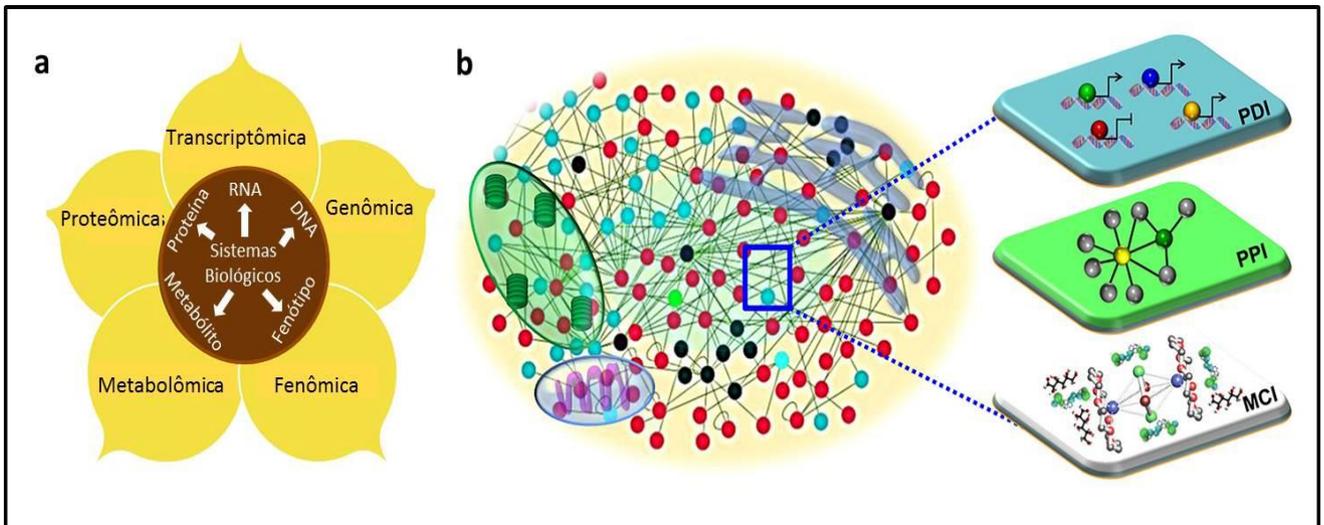


Figura 1: Os sistemas biológicos no entendimento das interações planta-microrganismo. Um diagrama representando a rede integrativa de múltiplos setores das “-ômicas”, incluindo transcriptômica, proteômica, metabolômica, genômica e fenômica (a). Visualização da célula como uma complexa plataforma de interações macromoleculares que constituem o “interactoma”. Módulos funcionais tais como o transcricional (interações proteína-DNA – PDI), translacional (interações proteína-proteína – PPI) e metabólica (interações compostos-metabólitos – MCI) são ilustrados (b). Adaptado de Garbutt et al. 2014.

Análises genômicas podem ser úteis para revelar genes importantes no estilo de vida endofítico (Fouts et al. 2008). Estudos de metagenômica de bactérias endofíticas em arroz revelaram características cruciais para a interação (Sessitsch et al. 2012). A aplicação de abordagens pós-genômicas pode reunir o potencial e a função dos genomas, aprofundando o conhecimento acerca das interações planta-endófitos. Atuando em conjunto com a genômica, ferramentas como proteômica e transcriptômica permitem a identificação de proteínas e transcritos expressos nas comunidades microbianas, aumentando o volume de informações conectadas que interagem como sistemas biológicos (Knief et al. 2011). Um modelo conceitual enfatizando as interações diretas planta-microrganismo tem dominado o trabalho em microbiomas associados a hospedeiros vegetais. No entanto, para entender estas associações, influências mais amplas sobre composição e funcionamento do microbioma devem ser incorporadas, bem como as decorrentes de interações planta-planta e microrganismo-microrganismo (Bakker et al. 2014).

2 – Bactérias promotoras do crescimento vegetal

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (*plant growth-promoting bacteria* - PGPB) são tipicamente definidas como as bactérias que favorecem o crescimento das plantas e muitas vezes são encontradas em associação com tecidos radiculares, folhas, flores ou nos tecidos internos (Glick 2015). Um grande número de PGPB vive na exosfera vegetal, podendo colonizar a rizosfera da planta (Figura 2), que constitui uma camada estreita de solo localizada na proximidade das raízes (cerca de 1.0 mm acima da superfície radicular) e por elas influenciada, recebendo a denominação de rizobactérias (Kloepper e Beauchamp 1992; Hardoim et al. 2008; Gaiero et al. 2013). Outro grupo é comumente encontrado aderido à superfície das raízes que formam o rizopiano vegetal, sendo constituído por bactérias associativas (Elmerich e Newton 2007; Gaiero et al. 2013). Há também a parte do microbioma formada por endófitos (*endo* = interior; *phyte* = planta), que como tal são capazes de penetrar no microambiente interno da planta (endosfera) e colonizar tecidos radiculares e parte aérea (Perotti 1926; Hardoim et al. 2008).

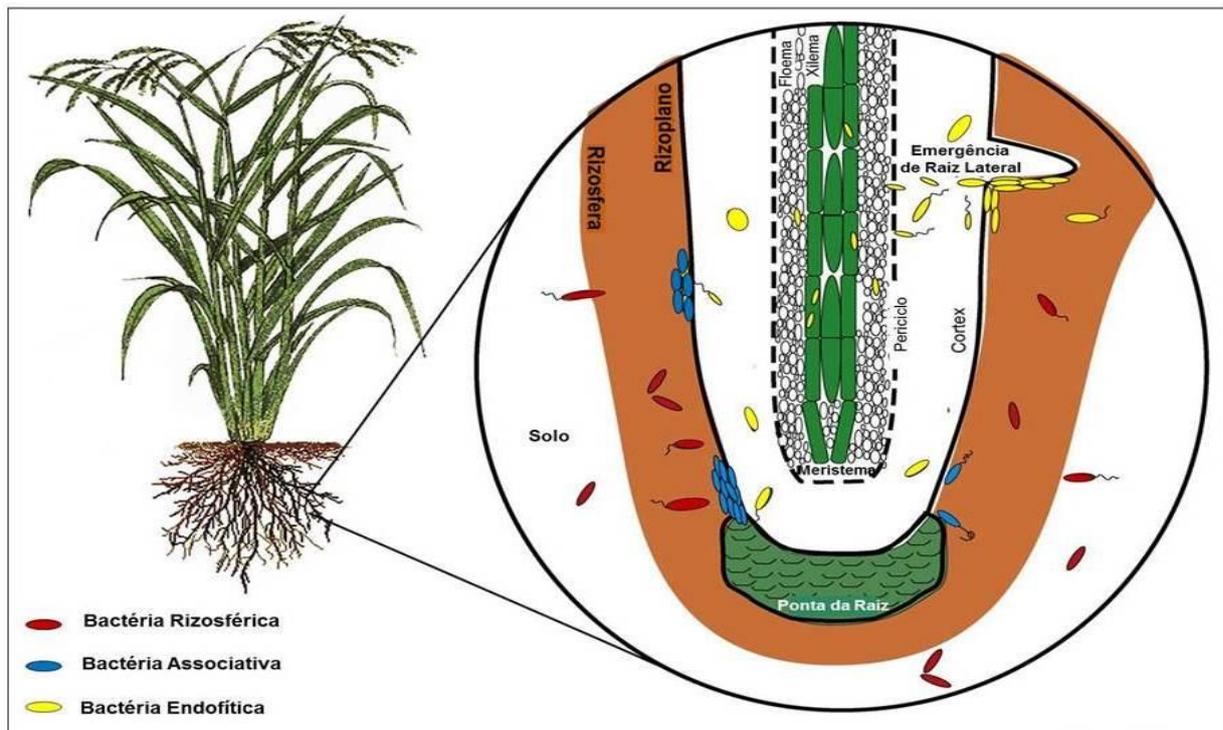


Figura 2: Tipos de PGPB e seu processo de colonização da raiz. Rizobactérias (células vermelhas) e bactérias associativas (células azuis) limitam-se ao ambiente da rizosfera e rizopiano vegetal, respectivamente. Bactérias endofíticas (células amarelas) são capazes de invadir tecidos vegetais específicos, se reproduzir e, por manipulação do metabolismo da planta, manter um equilíbrio harmonioso com a planta hospedeira, mesmo quando estão presentes em alta densidade. Adaptado de Hardoim et al. 2008.

Algumas espécies de PGPB estabelecem relações simbióticas e localizam-se tipicamente nos nódulos radiculares. Já as espécies de cianobactérias também são classificadas como PGPB, pois apesar de incapazes de se aderir às superfícies vegetais, favorecem o crescimento da flora devido à fixação de nitrogênio e carbono (Glick 2015). A rizosfera é uma região do solo fortemente influenciada pelas raízes vegetais devido à rizodeposição de exsudatos, os quais contêm uma variedade de compostos como ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento, hormônios e compostos antimicrobianos (Bertin et al. 2003). Exsudatos radiculares são fundamentais na determinação da estrutura do microbioma rizosférico (Shi et al. 2011), pois por meio destes compostos a planta se comunica com microrganismos mutualísticos, comensais, simbióticos, endofíticos e patogênicos (Bais et al. 2006).

Endófitos são vistos como uma sub-população do microbioma rizosférico (Compant et al. 2010), mas possuem características diferentes das bactérias rizosféricas, as quais mudam seu metabolismo para se adaptar ao ambiente interno do hospedeiro, caso venham a penetrar nos tecidos vegetais (Sessitsch et al. 2012; Ferrara et al. 2012).

2.2 – Definição e importância das bactérias endofíticas

Endófitos são convencionalmente definidos como bactérias ou fungos, benéficos ou comensais, que residem em tecidos vegetais internos, podendo ser isolados a partir da desinfecção de superfícies da planta (Wilson 1995; Hallmann et al. 1997; Reissinger et al. 2001; Coombs e Franco 2003). Em geral, estes microrganismos causam efeitos positivos sobre o crescimento vegetal (Reinhold-Hurek e Hurek 1998; James e Olivares 1998; Monteiro et al. 2012). Avanços moleculares requerem que esta definição seja ajustada, visto que uma abundância de endófitos não-cultiváveis foram sequenciados, mas não isolados (Hurek et al. 2002; Conn e Franco 2004; Pereira et al. 2011). Os endófitos mais predominantes e bem estudados pertencem a três grandes filos (Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes) e incluem membros de *Azoarcus* (Krause et al. 2006), *Gluconobacter* (Bertalan et al. 2009), *Bacillus* (Deng et al. 2011), *Enterobacter* (Taghavi et al. 2010), *Burkholderia* (Weilharter et al. 2011), *Herbaspirillum* (Pedrosa et al. 2011), *Pseudomonas* (Taghavi et al. 2009), *Serratia* (Taghavi et al. 2009), *Stenotrophomonas* (Ryan et al. 2009) and *Streptomyces* (Suzuki et al. 2005). Espécies destes gêneros são encontradas no solo/rizosfera que representa a principal fonte de colonizadores endofíticos (Hallmann e Berg, 2006). Outras fontes possíveis de endófitos

incluem filosfera, antosfera e sementes (Compant et al. 2010). A população bacteriana endofítica que interage com plantas hospedeiras é chamada endófitos bacterianos promotores do crescimento vegetal (PGPBE; Gaiero et al. 2013).

O potencial de PGPBE em promover a saúde vegetal subsidiou um grande número de estudos com o objetivo de avaliar sua aplicação como inoculantes para uso na agricultura (Hallmann et al. 1997; Kuklinsky-Sobral et al. 2004). O potencial dos inoculantes microbianos em reduzir a necessidade de produtos químicos como pesticidas e fertilizantes (Horrigan et al. 2002) torna-os importantes no desenvolvimento de práticas agrônômicas sustentáveis (Gaiero et al. 2013).

2.3 – Classificação e distribuição das bactérias endofíticas

De acordo com suas estratégias de sobrevivência em relação ao hospedeiro as bactérias endofíticas são classificadas como obrigatórias ou facultativas (Baldani et al. 1997). Endófitos obrigatórios são estritamente dependentes da planta hospedeira para seu crescimento, sendo transmitidos para outras plantas de forma vertical ou via vetores. Endófitos facultativos possuem um estágio em seu ciclo de vida em que sobrevivem fora da planta (Hardoim et al. 2008), mas colonizam caso haja oportunidade por meio de eficientes estratégias de infecção, assumindo a característica de endófitos oportunistas (Reinhold-Hurek e Hurek 1998). Tem sido proposto um terceiro grupo, composto pelos endófitos passivos, aqueles que não buscam de forma ativa colonizar a planta, mas o fazem em decorrência de oportunidades, como a presença de ferimentos ao longo dos pêlos radiculares (Gaiero et al. 2013). Estes microrganismos, também conhecidos como endófitos passageiros, podem penetrar nos tecidos internos vegetais por “acidente” ou acaso, na ausência de forças seletivas ou mecanismo de entrada e colonização radicular eficientes, mantendo-se do interior da planta (Hardoim et al. 2008). Esta estratégia passiva pode levar o endófito a ser menos competitivo, uma vez que falta uma maquinaria celular necessária à colonização vegetal (Verma et al 2004; Rosenblueth e Martínez-Romero 2006; Hardoim et al. 2008). O conceito de endófitos competentes foi proposto para caracterizar as bactérias que possuem a maquinaria genética requerida para colonizar a endosfera. Estes diferem dos endófitos oportunistas que são colonizadores competentes da rizosfera podendo tornar-se endófitos por entrar no tecido radicular, mas não possuem os genes que são fundamentais para seu sucesso ecológico dentro da planta. Endófitos competentes têm a capacidade de selecionar os parceiros da interação de acordo com os benefícios fornecidos (Hardoim et al. 2008).

A distribuição endofítica nas plantas depende da combinação entre habilidade de colonização e alocação de recursos vegetais (Gaiero et al. 2013). Endófitos radiculares frequentemente colonizam e penetram a epiderme através de sítios de emergência de raízes laterais, sob zonas de pêlos radiculares, estabelecendo populações inter- e intracelulares (Hurek et al. 1994; Compant et al. 2005; Zakria et al. 2007). Após a colonização inicial, alguns endófitos podem se mover para outras áreas da endosfera, entrando nos tecidos vasculares e se espalhando sistemicamente (Compant et al. 2005; Zakria et al. 2007; Johnston-Monje e Raizada 2011).

2.4 – Colonização endofítica

Existem inúmeras maneiras pelas quais as bactérias endofíticas podem ter acesso ao interior de uma planta. Apesar de invadir tecidos vegetais, estes microrganismos não são considerados endosimbiontes visto que não residem intracelularmente nas células vegetais e a colonização não induz a formação de nenhuma estrutura vegetal diferenciada (Reinhold-Hurek e Hurek, 1998). Além disso, nas interações em que ocorre fixação biológica de nitrogênio as bactérias endofíticas possuem uma vantagem sobre as associativas e rizobactérias, uma vez que se estabelecem no interior dos tecidos vegetais, onde o nicho é menos competitivo e permite melhores condições de fixação e assimilação do nitrogênio pela planta hospedeira (Reinhold-Hurek e Hurek, 1998, 2011).

A colonização dos tecidos vegetais por bactérias endofíticas geralmente começa a partir de seu estabelecimento na rizosfera. A região preferida para aderência e subsequente entrada são a zona apical, que possui uma fina camada superficial composta por células de alongação, além dos pêlos radiculares que constituem uma zona de penetração ativa. A translocação do endófito do rizoplano para o córtex do sistema radicular pode ocorrer via mecanismos ativos ou passivos (Gregory 2006; Haroim et al. 2008). Portanto, uma penetração passiva pode ocorrer em sítios de emergência de raízes laterais ou ferimentos criados por microrganismos deletérios (Reinhold-Hurek e Hurek 1998). Para a penetração ativa a bactéria precisa produzir diversos compostos celulósicos. A secreção de lipopolissacarídeos, enzimas que degradam parede celular e outros compostos que hidrolisam as células da exoderme vegetal está envolvida no processo de penetração bacteriana na endosfera (Lodewyckx et al. 2002; Böhm et al. 2007). Muitas bactérias endofíticas produzem estes compostos

in vitro (Compant et al. 2005; Reinhold-Hurek et al. 2006) e algumas destas enzimas estão envolvidas no processo de defesa vegetal (Norman-Setterblad et al. 2000).

Uma vez que as células bacterianas atravessam a barreira exodérmica, chegam à zona cortical e permanecem no sítio de entrada ou se movem em direção aos tecidos internos da planta hospedeira a fim de ocupar os espaços intercelulares (James et al. 1994; Compant et al. 2005). Ao atravessar a endoderme, as bactérias invadem o xilema por meio da secreção de proteínas celulósicas (James et al. 2002). A partir de então é possível que a bactéria se prolifere sistemicamente e colonize caules e folhas (Hardoim et al. 2008). Os vasos do xilema podem ser utilizados como uma rota de disseminação das bactérias até as partes vegetativas, porém poucos endófitos conseguem colonizá-lo (James et al. 2001). A necessidade de transpor barreiras impostas pela planta hospedeira e os requisitos fisiológicos fundamentais ao estabelecimento em diferentes nichos da planta seleciona os microrganismos mais adaptados ao ambiente endofítico (Compant et al. 2010). Além disso, a concentração de nutrientes disponíveis nos vasos xilemáticos diminui ao longo do eixo, sendo esta uma possível explicação para o fato de que a população bacteriana endofítica diminui quando distante da raiz e apenas um pequeno número de bactérias seja capaz de colonizar as partes superiores da planta, como o apoplasto foliar e órgãos reprodutivos (Compant et al. 2010; Fűrnkranz et al. 2011).

Em condições naturais a maioria das flores e frutos não contém bactérias endofíticas ou as tem em baixíssimas densidades. Apenas cepas muito especializadas são capazes de colonizar órgãos reprodutivos vegetais (Compant et al. 2010). No entanto alguns experimentos mostram que certas bactérias podem ser translocadas para estas regiões através da colonização do xilema (Compant et al. 2008). Não se sabe se a presença de endófitos nos tecidos aéreos tem efeitos benéficos ou se apenas a colonização radicular é suficiente para beneficiar a planta hospedeira. O mecanismo exato de transmissão das bactérias a partir dos vasos xilemáticos até os órgãos reprodutivos também vem sendo estabelecido.

Bactérias diazotróficas associativas como *Azospirillum lipoferum* e *Azotobacter* sp. vivem em associação fechada com a superfície da raiz, particularmente nos pêlos radiculares e zonas de alongação. Já bactérias endofíticas como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum* spp. e algumas cepas de *Azospirillum brasilense* não sobrevivem bem no solo, mas colonizam o córtex radicular (James 2000; Rosenblueth and Martínez-Romero 2006, Reinhold-Hurek e Hurek 2011). Tais bactérias

podem ser encontradas em células do mesófilo foliar (Dong et al. 1994; James e Olivares 1998; James et al. 2001), porém as raízes normalmente apresentam maiores números de endófitos em relação aos tecidos aéreos (Rosenblueth e Martínez-Romero 2006). A colonização endofítica também ocorre nos espaços intercelulares, vasos do xilema e parênquima do xilema lignificado, bem como em células mortas como aquelas encontradas no aerênquima (James, 2000).

Diversos estudos acerca do potencial das bactérias endofíticas como inoculantes vegetais para promover o crescimento e saúde das plantas vêm sendo conduzidos (Thakore 2006). No entanto, a compreensão sobre a direção das comunidades endofíticas é limitada, o que dificulta o entendimento sobre o sucesso da promoção do crescimento vegetal em condições de campo (Gaiero et al. 2013).

3 – Mecanismos de promoção do crescimento vegetal

Após se estabelecer na planta hospedeira, as bactérias endofíticas podem influenciar positivamente o crescimento vegetal e a resistência a estresses ambientais. Os mecanismos utilizados por PGPBs para promover o crescimento vegetal são diferentes em seus modos de ação e podem ser através da aquisição de nutrientes (fixação de nitrogênio e mobilização ou aumento da captação de minerais do solo) ou por meio de moduladores do crescimento (produção de fitormônios). Além disso, estes microrganismos atuam no biocontrole e remediação (Compant et al. 2010). Tais mecanismos podem ter efeitos diretos ou indiretos sobre a saúde e o desenvolvimento vegetal. Os mecanismos cujos efeitos sobre a planta são diretos envolvem o favorecimento da captação de recursos, por meio da fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e sequestro de ferro, além da modulação dos níveis de fitormônios (Glick 2012). Já os mecanismos com efeitos indiretos relacionam-se com a habilidade de biocontrole bacteriano por meio da produção de antibióticos, sideróforos e vitaminas, competição, síntese de etileno e indução de resistência sistêmica (Glick 2012; Palacios et al. 2014). Estes mecanismos também estão relacionados com processos de fitorremediação, biofertilização (Gaiero et al. 2013) e tolerância a estresses abióticos (Farrar et al. 2014). Muitos tipos de moléculas facilitam a interação entre PGPB e plantas, a saber: hormônios vegetais (Babalola 2010), enzimas hidrolíticas (Hallmann et al. 1999), antibióticos (Haas e Keel 2003), flavonoides (Cesco et al. 2012), moléculas de sinalização (Faure et al. 2009), sideróforos (Kurek e Jaroszuk-Scisel 2003),

exopolissacarídeos (Kyungseok et al. 2008), compostos voláteis (Cohen et al. 2010), poliaminas (Cassan et al. 2009), lectinas (Alen'kina et al. 2006) e vitaminas (Dahm et al. 1993).

3.1 – Mecanismos diretos

Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal por meio da ação bacteriana mais bem estudados são aqueles que envolvem a captação de recursos essenciais à planta (Glick 2012). Após a água, o nitrogênio (N) é o principal composto limitante para a produção vegetal. Muitas plantas podem obtê-lo através de um processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). Este elemento é fundamental na nutrição das espécies vegetais, além de compor biomoléculas importantes como ácidos nucleicos e proteínas. Entretanto, este macronutriente não é encontrado em uma forma assimilável na atmosfera terrestre, visto que as plantas apenas o utilizam na forma de NH_3^- e NH_4^+ (Muthukumarasamy et al. 2002). FBN consiste na redução do di-nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), sendo esta uma reação catalisada pela ação do complexo enzimático da nitrogenase, codificado pelo gene *nif*, tendo como cofator o conjunto molibdênio-ferro (Mo-Fe) (Bruijn 2015; Stüeken et al. 2015). Em bactérias diazotróficas os genes *nif* são tipicamente encontrados em um *cluster* de aproximadamente 20-24 kb com sete operons que codificam 20 proteínas diferentes (Glick 2012). Esta reação gera benefícios econômicos importantes no âmbito da agricultura sustentável (Postgate 1998). Estima-se que a produção industrial de fertilizantes nitrogenados para aplicação na agricultura custe mais de U\$\$ 100 bilhões, devido à limitação dos recursos requeridos para o processo, além dos fortes impactos ambientais relacionados com eutrofização e contaminação de rios, lagos e oceanos (Bruijn 2015).

Fósforo (P) é considerado o terceiro composto limitante para o crescimento vegetal. Este elemento desempenha diversas funções nas plantas, participando da geração de energia, síntese de ácidos nucleicos, fotossíntese, respiração e sinalização celular (Vance et al. 2003). Apesar da alta quantidade de fósforo existente no solo, a maior parte encontra-se na forma insolúvel (Ae and Shen 2002), basicamente como um mineral orgânico, não podendo ser utilizada pelas plantas em prol do seu crescimento (Khan et al. 2007). A maioria dos solos contém fosfato em quantidade suficiente para suportar o crescimento vegetal. No entanto, as plantas absorvem fósforo apenas nas formas solúveis dos íons H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} (Igal et al. 2001). A solubilização de fosfato inorgânico é,

portanto, um mecanismo fundamental, ocorrendo como uma consequência da ação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular como os ácidos glucônico e cítrico, ambos sintetizados por bactérias promotoras do crescimento vegetal (Richardson 2001; Rodriguez et al. 2004). Tais microrganismos secretam ácidos orgânicos e fosfatases, facilitando a conversão das formas insolúveis de P para íons assimiláveis (Kim et al. 1998). Por outro lado, a mineralização de fósforo orgânico ocorre por meio da síntese de diferentes fosfatases, catalisadoras da hidrólise de ésteres fosfóricos (Rodriguez e Fraga 1999). Os processos de solubilização e mineralização de fosfato podem ocorrer por meio da mesma estirpe bacteriana (Tao et al. 2008). O fato de algumas bactérias endofíticas solubilizarem fosfatos minerais sugere que durante a fase inicial da colonização haja um aumento da disponibilidade de fosfato para a planta hospedeira (Verma et al. 2001).

Apesar do ferro (Fe) ser o quarto elemento mais abundante no planeta, em solos aeróbios não é facilmente assimilado pelas bactérias e plantas porque o íon férrico ou Fe^{+3} , forma predominante na natureza, é pouco solúvel, o que justifica a baixa quantidade de ferro disponível para assimilação pelos organismos vivos (Ma 2005). Para sobreviver ao suprimento limitado de ferro, as bactérias sintetizam sideróforos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular que se ligam a íons no estado férrico (Fe^{+3}), disponibilizando-o para redução a Fe^{+2} , forma facilmente assimilado pelas plantas (Crowley e Kraemer 2007). A produção de sideróforos bacterianos pode ser estimulada pela presença de metais pesados e ajuda a planta a reduzir a toxicidade devido ao aumento do suprimento férrico (Burd et al. 2000). O ferro é um cofator necessário em muitas reações enzimáticas, sendo um nutriente essencial para praticamente todos os microrganismos. Ao adquirir concentrações de ferro suficientes, sideróforos produzidos pelas bactérias se ligam ao Fe^{+3} com alta afinidade para solubiliza-lo, permitindo a captação eficiente (Ma et al. 2011). As raízes vegetais adquirem ferro a partir dos complexos sideróforos- Fe^{+3} , por meio de mecanismos que envolvem degradação de metais e liberação do ferro neles contido (Rajkumar et al. 2010). Tais complexos podem ser reconhecidos por várias espécies vegetais, sendo o processo considerado crucial, particularmente em solos contaminados (Sharma et al. 2003; Kativar e Goel 2004). Sideróforos bacterianos também promovem síntese de IAA devido à redução de efeitos prejudiciais dos metais pesados (Dimkpa et al. 2008). Já existem cerca de 500 tipos de sideróforos conhecidos e a estrutura química de 270 destes compostos já foi elucidada (Hider e Kong 2010). Plantas expostas a estresses ambientais decorrentes da poluição por metais pesados necessitam ainda mais da provisão de Fe e da redução do estresse, facilitada pelos sideróforos (Diels et al. 2002).

Sideróforos também atuam no biocontrole, pois impedem que alguns fitopatógenos adquiram uma quantidade adequada de ferro, reduzindo sua capacidade de proliferação (Kloepper et al. 1980).

Algumas bactérias também afetam positivamente o crescimento vegetal através da produção de vitaminas que constituem micronutrientes essenciais (Survase et al. 2006). Por serem cofatores cruciais em várias vias metabólicas e atuarem como antioxidantes, a provisão das vitaminas é necessária a todos os organismos (Asensi-Fabado e Munné-Bosch 2010). Durante as interações entre plantas e microrganismos, estes compostos podem influenciar a proliferação de PGPB ao redor do sistema radicular. Algumas vitaminas exsudadas pelas raízes vegetais não são sintetizadas pela planta, mas sim produzidas por microrganismos. PGPB também podem produzir vitaminas que atuam como cofatores de vias metabólicas, facilitam a produção de compostos essenciais para plantas e bactérias, induzem resistência contra patógenos, promovem o crescimento vegetal diretamente e participam da conversão de energia (Palacios et al. 2014). Pelo menos 11 vitaminas são produzidas por PGPB durante as interações com plantas (Burgess et al. 2009).

Hormônios vegetais também desempenham funções cruciais no desenvolvimento vegetal e na resposta às condições ambientais. Existem diferentes classes de fitormônios que compreendem auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, ácido jasmônico, ácido salicílico, brassinosteróides (Pieterse et al. 2009) e estrigolactonas, um grupo descoberto recentemente (Umehara et al. 2008; Al-Babili e Bouwmeester 2015). Tais hormônios são reguladores do crescimento e desenvolvimento vegetal, produzidos pelas plantas, os quais agem em concentrações inferiores a 1.0 μM . Dentre os processos regulados destacam-se divisão e expansão celular, diferenciação e morte celular. A integração das vias fitormoniais desempenha um papel chave no processo de coordenação e respostas celulares (Santner et al., 2009; Durbak et al. 2012). Adicionalmente, os hormônios vegetais atuam na resposta de plantas a seus ambientes, ajustando seu metabolismo aos estresses enfrentados (Glick et al. 2007). Fitormônios produzidos por microrganismos, tais como auxina, giberelina, citocinina, ácido abscísico e etileno podem modular os níveis hormonais endógenos, influenciando o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Van Loon 2007). Por isso, tais reguladores são componentes essenciais nas interações planta-microrganismo (Farrar et al. 2014). O processo de promoção direta do crescimento vegetal através da produção de fitormônios é conhecido como fitoestimulação (Bloemberg e Lugtenberg, 2001).

Ácido 3-indolacético (IAA) é o mais abundante membro da família das auxinas (Spaepen et al. 2007). Sua concentração é crítica para as respostas fisiológicas vegetais (Lambrecht et al. 2000), pois afeta a extensão, divisão e dilatação celular, além de estimular a germinação de sementes, aumentar a taxa de desenvolvimento xilemático e radicular, controlar processos de crescimento vegetativo, mediar respostas à luminosidade, gravidade e florescimento, afetando a fotossíntese, biossíntese de metabólitos e resistência a estresses (Tsavkelova et al. 2006). As bactérias que produzem IAA podem influenciar os níveis de auxina endógena da planta (Patten e Glick, 1996). Além disso, este hormônio pode estar envolvido em diferentes níveis da interação com plantas (Glick et al. 2012), sendo o principal fator responsável pelas alterações radiculares e, portanto, pelas propriedades de promoção do crescimento (Pliego et al. 2011).

Outros fitormônios produzidos por bactérias endofíticas são citocininas (Sgroy et al., 2009) e giberelinas (Malfanova et al. 2011). Citocininas são hormônios com capacidade de induzir divisão celular em plantas na presença de auxina. Iniciando a partir do caule, a razão entre a quantidade de auxina e citocinina determina o processo de diferenciação em raiz e parte aérea (Lugtenberg et al. 2013). O espectro de citocininas produzido por bactéria é similar àqueles produzidos por plantas (García de Salome et al. 2001). Já giberelinas estão envolvidas na divisão celular e alongação de células do meristema subapical. Outros processos afetados por esta classe de hormônios são germinação de sementes, crescimento do tubo polínico e florescimento. Assim como auxinas e citocininas, giberelinas podem atuar em combinação com outros hormônios (Lugtenberg et al. 2013). Entretanto, um entendimento detalhado acerca do papel destes hormônios sintetizados por bactérias e como a produção deles é regulada ainda é necessário (Glick et al. 2012).

Ácido abscísico (ABA) é outro hormônio vegetal produzido por PGPB (Cohen et al., 2008), o qual participa das respostas da planta a estresses bióticos e abióticos, além de inibir a germinação de sementes e florescimento (Lee e Luan 2012). Também está envolvido na proteção da planta contra seca, estresse salino e metais tóxicos, além de atuar no fechamento estomático (Geiger et al. 2011). O efeito da inoculação com ABA, produzido por bactérias, sobre o crescimento vegetal não é bem determinado, mas especula-se que este hormônio interfira nos níveis de citocinina (Spaepen et al. 2009).

Etileno (ET), um hormônio gasoso que tem papel fundamental tanto no desenvolvimento da planta quanto na resposta a estresses (Dugardeyn et al. 2008), geralmente inibe a formação de raízes laterais, mas pode promover a formação de pêlos

radiculares (Dodd et al. 2010). A síntese de ET é altamente sensível aos estímulos ambientais incluindo resposta ao ataque de patógenos, estresse por temperatura, seca, excesso de metais pesados e salinidade do solo (Glick et al. 2005; Dodd et al. 2010; Zipfel 2013). Em plantas, os níveis de ET podem ser regulados pela clivagem de ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) ou inibição de sua produção. Muitas bactérias produtoras de IAA possuem a enzima ACC deaminase (Long et al. 2008), cuja atividade provê inúmeros benefícios além de ser precursora de compostos químicos necessários ao crescimento vegetal induzido por bactérias (Hardoim et al. 2008; Glick 2014).

Além dos efeitos promotores do crescimento vegetal, acredita-se que a produção de fitormônios por bactérias endofíticas desempenhe um papel importante nas interações entre plantas e bactérias no âmbito do crescimento em solos contaminados por metais (Kuklinsky-Sobral et al. 2004).

3.2 – Mecanismos indiretos

A atuação de bactérias no controle biológico que resulta no crescimento indireto da planta tem sido fonte de grande interesse devido ao potencial microbiano no biocontrole de pragas (Glick et al. 2012). Em circunstâncias ideais, o crescimento e desenvolvimento de uma planta podem ser comparados a um procedimento que segue uma sequência linear ao longo do tempo (Glick et al. 2007). Entretanto, no campo a promoção do crescimento vegetal pode ser inibida por um grande número de diferentes estresses bióticos e abióticos que incluem temperaturas extremas, excesso de luminosidade, seca, presença de metais tóxicos e contaminantes orgânicos, radiação, ferimento, predação por insetos e nematoides, salinidade e interações com vírus, fungos e bactérias. Tais estresses ambientais podem prejudicar o crescimento vegetal, porém as associações com PGPB podem trazer benefícios decorrentes de diferentes estratégias (Glick et al. 2012). Portanto, enquanto a tolerância a estresses pode ser conferida pelo genoma da planta, as interações com bactérias podem intensificá-la ou gerar proteção contra estresses ambientais, revertendo a inibição do crescimento vegetal (Farrar et al. 2014). Alterações físicas e químicas induzidas por bactérias, que resultam em uma tolerância a estresses foram denominadas “tolerância sistêmica induzida” – IST (Yang et al. 2009).

A promoção do crescimento vegetal através da proteção contra fitopatógenos é conhecida como biocontrole, processo que envolve vários mecanismos como produção

de sideróforos e antibióticos (Gaiero et al. 2013). Os efeitos do biocontrole são bem conhecidos, mas os mecanismos envolvidos neste processo mediado por bactérias endofíticas são pouco elucidados (Malfanova et al. 2011). O papel da ISR mediada por endófitos já foi confirmado por meio de observações microscópicas que revelaram as bactérias localizadas no interior da planta induzem mudanças morfológicas associadas com ISR e reduzem sintomas de doença (Melnick et al. 2008). Estas alterações induzidas pelas bactérias nos tecidos internos da planta hospedeira incluem deposição de calose, pectina, celulose e compostos fenólicos associados com formação de barreiras estruturais na região de ataque por patógenos (Benhamou et al. 2000). Outra resposta comum é a produção de proteínas peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases (Fishal et al. 2010).

Bactérias também podem produzir diversos compostos voláteis. Embora a função biológica da maioria destes voláteis não seja totalmente compreendida, supõe-se que estão envolvidos numa série de processos incluindo sinalização celular e promoção do crescimento vegetal, além de atuar como agentes inibidores (Wheatley 2002; Vesperman et al. 2007; Kai et al. 2009). Alguns voláteis só promovem o crescimento vegetal em condições de estresse (Lugtenberg et al. 2013).

3.3 – Aplicação de bacterias endofíticas em Fitorremediação

A remediação de contaminantes ambientais vem ganhando força considerável. Fitorremediação consiste no uso de plantas para remover os poluentes do meio ambiente ou torna-los inofensivos (Weyens et al. 2009). Esta tecnologia pode ser utilizada para limpar ou estabilizar contaminantes orgânicos e inorgânicos, sendo considerada promissora devido à seu baixo custo em relação aos métodos convencionais (Li et al. 2012). A remediação de solos contaminados por compostos orgânicos e metais tóxicos é possível por meio de interações efetivas entre plantas e microrganismos (Farrar et al. 2014). Os contaminantes podem ser neutralizados na planta, remediando o solo. No entanto, a recuperação do metal residual pode ser necessária para prevenir contaminações futuras. Benefícios de abordagens bem sucedidas de fitorremediação incluem melhoria da qualidade do solo, produção e manutenção da comunidade microbiana nativa, além da criação de uma paisagem mais preservada (Mendez e Maier 2008). Endófitos são muito eficientes na recuperação e aumento da biomassa no hospedeiro (Weyens et al. 2009b). Tem sido demonstrado que

estes microrganismos desempenham um papel essencial na adaptação da planta hospedeira ao ambiente poluído e que podem favorecer a remediação do solo mediante mobilização ou degradação de contaminantes, promovendo o crescimento vegetal, reduzindo a fitotoxicidade e aumentando a tolerância a metais (Zhang et al. 2011; Weyens et al. 2010; Chen et al. 2010; Germaine et al. 2009). Em comparação com microrganismos rizosféricos, os endófitos interagem de forma mais estreita com seus hospedeiros vegetais, sendo mais eficientes na fitorremediação (Weyens et al. 2009; Germaine et al. 2009; Zhang et al. 2011). A bioprospecção de microrganismos endofíticos em ambientes hostis pode ser um caminho para o desenvolvimento de culturas energéticas tolerantes ao crescimento em solos contaminados. Já foi demonstrado que o acúmulo de cádmio é maior em plantas inoculadas com endófitos (Mastretta et al. 2009). Devido ao transporte de poluentes pelo sistema vascular da planta, bactérias endofíticas presentes nesses tecidos e com informação genética requerida para degradação eficiente destes compostos orgânicos podem promover a redução da fitotoxicidade e evapotranspiração (Weyens et al. 2009b).

4 - *Gluconacetobacter diazotrophicus*: características e mecanismos de colonização

Gluconacetobacter diazotrophicus foi descoberta em plantas de cana-de-açúcar no estado de Alagoas, Brasil, inicialmente recebendo a denominação de *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante e Döbereiner 1988). Posteriormente foi classificada como uma bactéria tolerante a ácido e nomeada como *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis et al. 1989). Com base na análise do RNA ribossomal 16S a bactéria foi reclassificada e passou a ser conhecida como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Yamada et al. 1997). Quanto à classificação taxonômica, a bactéria pertence ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rhodospirillales, família Acetobacteraceae e gênero *Gluconacetobacter* (Kerstens et al. 2006). Quanto às principais características, *G. diazotrophicus* é uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio, aeróbica obrigatória, gram-negativa, não formadora de esporos e nódulos. As células apresentam tamanho que varia entre 0.7 – 2.0 µm e são dotadas de flagelos, usados para motilidade, conforme pode ser visto na Figura 3 (Cavalcante e Döbereiner 1988; Baldani et al. 1997).

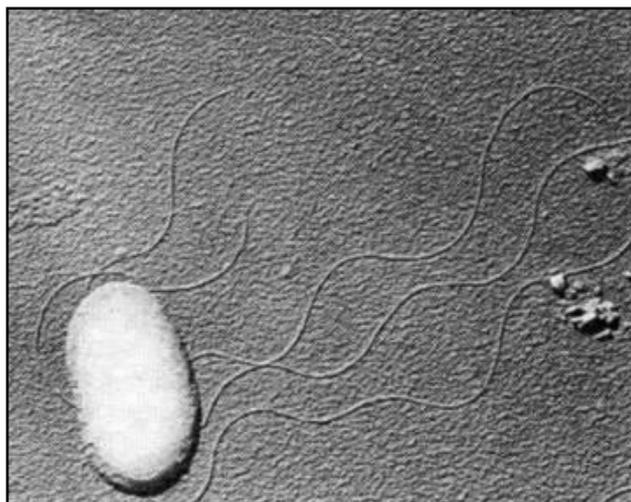


Figura 3: Microfotografia, ao microscópio eletrônico de transmissão, da bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Fonte: Rouws et al. 2006.

G. diazotrophicus é uma bactéria ácido-tolerante, capaz de crescer em níveis de pH inferiores a 3,0, porém seu pH ótimo para crescimento é 5,5 (Gillis et al. 1989). Adicionalmente, esta bactéria forma película em meio semi-sólido sem nitrogênio com 10% de sacarose (Reis et al. 1994). Quando cultivada em meio LGI-P, as colônias de *G. diazotrophicus* podem ser visualizadas na forma lisa com bordas regulares, inicialmente semi-transparentes, porém na cor laranja devido à absorção do azul de bromotimol à medida que a incubação prossegue (Cavalcante e Döbereiner 1988; Gillis et al. 1989; Fuentes-Ramírez et al. 2001; Youssef et al. 2004; Muthukumarasamy et al. 2005; Baldani et al. 2014).

Apesar de ter como hospedeiro natural a cana-de-açúcar, *G. diazotrophicus* não requer uma grande quantidade de sacarose para seu crescimento adequado (Dong et al. 1994; Reis e Döbereiner 1998), porém tolera até 30% deste açúcar (Cavalcante e Döbereiner 1988). Outras fontes de carbono utilizadas por esta bactéria incluem glicose, frutose, galactose, xilose, maltose, trealose, sorbitol, etanol e glicerol (Cavalcante e Döbereiner 1988; Gillis et al. 1989; Li e MacRae 1992; Eskin et al. 2014).

4.1 - Hospedeiros

Estudos acerca da interação entre *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar mostraram seu papel endofítico por meio de ensaios de microscopia com técnicas de marcação imunológica (James et al. 1994), revelando ainda que esta bactéria coloniza os espaços

intercelulares da raiz, interior do xilema presentes na base do caule (Döbereiner et al. 1995) e os espaços intercelulares adjacentes aos vasos xilemáticos (Fuentes-Ramírez et al. 1997). Posteriormente, foram registradas altas concentrações de *G. diazotrophicus* em raízes, caule e folhas de cana-de-açúcar (James e Olivares 1998). Estudos paralelos também mostraram esta bactéria no apoplasto intercelular (Sevilla et al. 1997), protoxilema e parênquima do xilema (James et al. 2001). Não foi observada resposta de defesa da planta hospedeira ou concentração da bactéria suficiente para bloquear os vasos xilemáticos (James et al. 1994; Sevilla et al. 1997; Fuentes-Ramírez et al. 1997). O mecanismo sugerido para entrada e permanência de *G. diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar é por meio de junções de raízes laterais do apoplasto radicular e células da ponta da raiz. Uma vez estabelecidas no xilema, as células bacterianas se movem pelo caule à medida que a planta cresce (James et al. 1994).

Além da cana-de-açúcar, *G. diazotrophicus* foi isolada de uma vasta gama de outras espécies vegetais, tais como batata-doce (Paula et al. 1991), café (Jimenez-Salgado et al. 1997), banana (Matiru e Thomson 1998), abacaxi (Tapia-Hernández et al. 2000), arroz (Muthukumarasamy 2005), cenoura, rabanete e beterraba (Madhaiyan et al. 2004). Em associação com todos estes hospedeiros a bactéria foi isolada da raiz, porém em alguns deles também foi encontrada no caule, folha e rizosfera. Adicionalmente, a maioria destes hospedeiros contêm níveis de sacarose relativamente mais elevados, o que parece ser um pré-requisito para a colonização por *G. diazotrophicus* (Riggs et al. 2001). Apesar de ser um endófito obrigatório e, portanto, incapaz de sobreviver no solo por mais de dois dias, esta bactéria pode permanecer no interior de pêlos radiculares na rizosfera da planta hospedeira (Paula et al. 1991; Jimenez-Salgado et al. 1997). Os sítios de entrada de *G. diazotrophicus* em seus hospedeiros podem ser a ponta da raiz, células da coifa e meristema, zonas de emergência de raízes laterais e pêlos radiculares (James et al. 2001; Luna et al. 2010; Rouws et al. 2010). Nas folhas, o local mais provável de entrada da bactéria são as aberturas estomáticas (James et al. 2001).

G. diazotrophicus também é capaz de sobreviver após inoculação em diversos hospedeiros não-nativos, dentre os quais destacam-se importantes culturas como milho (Riggs et al. 2001; Cocking et al. 2006; Eskin et al. 2012), tomate, feijão e *Arabidopsis* (Cocking et al. 2006), sorgo (Paula et al. 1991) e trigo (Youssef et al. 2004; Luna et al. 2010). A capacidade de introduzir esta bactéria em novos hospedeiros não apenas provê uma oportunidade para pesquisas futuras em ambientes assépticos, mas permite determinar aspectos específicos da interação como localização da bactéria no

hospedeiro, pontos de entrada, estimativa da produção hormonal e fixação de nitrogênio. Diversos métodos de inoculação têm sido empregados com sucesso para introduzir *G. diazotrophicus* em culturas não-nativas (Eskin et al. 2014).

4.2 – Principais enzimas

Apesar da presença de centenas de enzimas envolvidas no metabolismo de *G. diazotrophicus*, poucas foram tão bem estudadas como a nitrogenase, levansacarose e vias de produção e transporte de pirroloquinolina quinona (PQQ). A essencialidade destas enzimas já foi comprovada pela remoção ou mutação das mesmas, acarretando na perda de algum mecanismo específico à colonização ou promoção do crescimento pela bactéria (Eskin et al. 2014).

A enzima nitrogenase age juntamente com molibdênio por meio do sistema Mo-nitrogenase, capaz de prover grande quantidade de nitrogênio fixado para a planta hospedeira (Fisher e Newton 2005). Altas concentrações de nitrato inibem a colonização bacteriana (Vessey e Pan 2003; Medeiros et al. 2006), porém a atividade da nitrogenase não é completamente inibida pela adição de nitrato. Entretanto, no campo altas doses de fertilizantes nitrogenados inibem o crescimento de *G. diazotrophicus* (Fuentes-Ramírez et al. 1999).

Por ser incapaz de transportar sacarose, *G. diazotrophicus* secreta uma exoenzima frutossiltransferase que hidrolisa sacarose em frutooligosacarídeos. Esta enzima é a levansacarose, responsável pela atividade sacarolítica, a qual atua no metabolismo da sacarose e libera o exopolissacarídeo levano (Arrieta et al. 1996). Esta enzima é crítica para a sobrevivência de *G. diazotrophicus* (Hernandez et al. 1995). Junto à hidrólise de sacarose, a enzima levansacarose também participa na tolerância à NaCl e formação de biofilme (Velázquez-Hernández et al. 2011). Na ausência destes mecanismos podem ocorrer mudanças na morfologia da colônia, na atividade da nitrogenase e nas habilidades para se agregar às superfícies bióticas e abióticas, causando redução na capacidade de colonização (Meneses et al. 2011).

PQQ é um cofator redox presente em várias bactérias (Puehringer et al. 2008). A vitamina PQQ pode atuar indiretamente para promover o crescimento vegetal através da enzima PQQ sintase. Em *G. diazotrophicus*, a função desta enzima é atuar na formação do complexo glicose-desidrogenase (GDH), por meio da biossíntese do cofator PQQ, gerando o sistema PQQ-GDH, o qual interfere na oxidação de glicose em ácido glucônico no ambiente extracelular (Attwood et al. 1991; Galar e Boiardi 1995; Rodríguez

et al. 2000). Este é o principal ácido orgânico envolvido na solubilização de fosfato (Bashan et al. 2013). O sistema PQQ-GDH é muito importante, pois é ativado principalmente em condições de fixação de nitrogênio, produzindo grande quantidade de energia para a bactéria, já que a ação da nitrogenase demanda uma alta concentração energética (Galar e Boiardi 1995).

4.3 – Mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal

Como uma bactéria promotora do crescimento vegetal, *G. diazotrophicus* beneficia seus hospedeiros por meio de diferentes maneiras (Eskin et al. 2014). Em condições limitantes de nitrogênio a atividade da enzima nitrogenase produzida por *G. diazotrophicus* favorece o crescimento vegetal (Riggs et al. 2001). Além disso, experimentos de incorporação de $^{15}\text{N}_2$ mostraram que cepas selvagens fixam N_2 ativamente nos tecidos de cana-de-açúcar, enquanto cepas com mutações que afetam o gene *nif*⁻ não o fazem (Sevilla et al. 2001). Um fator que interfere diretamente no mecanismo de FBN é a quantidade de nitrogênio presente no solo. Além do fato de *G. diazotrophicus* apresentar pleomorfismo quando tratada com altas doses de nitrogênio na forma de NH_4^+ (Muthukumarasamy et al. 2002), a população bacteriana é maior em plantas que recebem doses menores de fertilizantes nitrogenados (Oliveira et al. 2003), enquanto altas concentrações destes produtos inibem a colonização de cana-de-açúcar (Fuentes-Ramirez e Mart 1999). Sendo assim, é evidente que tanto o controle da atividade da enzima nitrogenase quanto o conteúdo de nitrogênio no solo podem interferir na capacidade de *G. diazotrophicus* em colonizar e fixar nitrogênio (Carvalho et al. 2014). Dentre os mecanismos utilizados por *G. diazotrophicus* para promover o crescimento vegetal destaca-se a produção dos fitormônios ácido 3-indol-acético (AIA) e giberelinas A1 e A3, os quais são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Fuentes-Ramirez et al. 1993; Bastián et al. 1998; Saravanan et al. 2008). A produção de sideróforos dos tipos salicilato e catecolato por alguns isolados de *G. diazotrophicus* também já foi demonstrada (Logeshwaran et al. 2009). Esta bactéria tem ainda capacidade de solubilizar fósforo e zinco, macro e micronutrientes, respectivamente, importantes para o crescimento e desenvolvimento de muitas plantas (Saravanan et al. 2007; Intorne et al. 2009; Sarathambal et al. 2010; Crespo et al. 2011). Um dos principais agentes envolvidos na solubilização de zinco é o ácido glucônico (Intorne et al. 2009). Recentemente foi demonstrado que este ácido orgânico, derivado

da oxidação direta da glicose pelo sistema PQQ-GDH também é responsável por atividades antimicrobianas desencadeadas por *G. diazotrophicus* (Nieto-Peñalver et al. 2014). A participação desta bactéria no antagonismo de fitopatógenos foi bem caracterizada em cana-de-açúcar, hospedeiro em que *G. diazotrophicus* induz uma resposta de defesa contra *Xanthomonas albilineans* (Fontaniella et al. 2002; Arencibia et al. 2006). A bactéria impede a produção do polissacarídeo que causa doença nas folhas através da produção de uma bacteriocina, a qual causa lise das células do patógeno, inibindo efetivamente seu crescimento (Blanco et al. 2005).

4.4 – Caracterização de genes e proteínas relevantes para a interação entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e plantas

A cepa PAL5 foi o terceiro microrganismo diazotrófico e nono endófito a ser sequenciado. Através do projeto RioGene houve uma expansão do conhecimento de *G. diazotrophicus* e novas perspectivas para pesquisas futuras foram abertas. O genoma de PAL5 é constituído por um cromossomo circular (3.944.163 bp) com conteúdo G-C de 66.19% e os plasmídeos pGD01 (38.818 pb) e pGD02 (16.610 pb). Em geral, o genoma contém 3.864 sequências codificantes (Bertalan et al. 2009). Dentre as proteínas hipotéticas, 583 delas já foram identificadas e utilizadas para descrever vias metabólicas da bactéria (Lery et al. 2008; Bertalan et al. 2009). Estudos de proteoma observaram diferentes níveis de expressão e identificaram funções de proteínas específicas em culturas *in vitro* na presença e ausência da planta hospedeira, nas fases exponencial e estacionária do crescimento de *G. diazotrophicus* (Leri et al. 2008; dos Santos et al. 2010). Além disso, através das análises genômicas de *G. diazotrophicus* foram descobertos diversos genes homólogos em outras bactérias (Bertalan et al. 2009).

Um importante gene de *G. diazotrophicus* que participa do processo de interação com cana-de-açúcar é o SHR5, um receptor do tipo quinase que atua na transdução de sinal envolvida no estabelecimento da associação com a planta (Vinagre et al. 2005). Uma enzima recentemente caracterizada foi a piruvato Descarboxilase, cuja estrutura e cinética foram estudadas e seu papel funcional foi desvendado (Van Zyl et al. 2014). Outra enzima purificada e caracterizada foi a GDHm, uma glicose desidrogenase ligada à membrana, cuja atividade possivelmente implica na redução da competição com outros microrganismos, além de atuar no sistema respiratório de *G. diazotrophicus*

(Sar-Páez et al. 2015). Estudos relacionados com os estágios iniciais de colonização de arroz por *G. diazotrophicus* mostraram que a bactéria regula os níveis de transcritos de genes que atuam na desintoxicação de espécies reativas de oxignio (ROS), tais como superoxido dismutase (SOD) e glutatona redutase (GR). Portanto, as enzimas da cepa PAL5 que atuam na eliminação de ROS desenvolvem um papel importante na colonização endofítica de plantas de arroz (Alqueres et al. 2013). Outro trabalho de genômica funcional envolvendo mutagnese revelou que a inserção do transposon Tn5 no promotor do gene *tonB* afeta o fenótipo relacionado a ferro e aumenta o nível extracelular de sideróforos. Portanto o complexo TonB possui um papel essencial no transporte de Fe/sideróforos, sendo essencial para a fisiologia de *G. diazotrophicus* (de Paula Soares et al. 2015).

A presença de um sistema regulatório ativo em *G. diazotrophicus*, que garante a sobrevivência e colonização desta bactéria em seus nichos específicos, também já foi demonstrada. O sistema *quorum sensing* (QS) inclui mecanismos de sinalização envolvidos no controle de vários genes relacionados com as interaoes microbianas, colonização do hospedeiro e sobrevivência em condioes de estresses (Reading e Sperandio 2006). *G. diazotrophicus* PAL5 possui um sistema QS composto pelos homólogos luxR e luxI, produzindo oito moléculas sinalizadoras da família AHL, as quais são sensíveis  concentração de glicose e sofrem alteração em seus níveis relativos na presença deste açúcar (Bertini et al. 2014).

Recentemente, análises de transcriptoma feitas através da construção de bibliotecas de RNA-seq, a partir da associação entre *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar permitiram a identificação de transcritos diferencialmente expressos em situaoes de estresse por seca. O perfil diferencial obtido a partir de plantas inoculadas e não-inoculadas sugere que há respostas moleculares e bioquímicas ao estresse causado por déficit hídrico relacionado com a ativação de marcadores responsivos e seca e das vias hormonais de ABA e ET. Este trabalho caracterizou o envolvimento de *G. diazotrophicus* na promoção da tolerância à seca em plantas de cana-de-açúcar, as quais tiveram sua sobrevivência prolongada por 40 dias na ausência de água, devido à interação com a bactéria (Vargas et al. 2014).

O comportamento diazotrófico de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, adicionado às características benéficas já discutidas e seu efeito na promoção do crescimento vegetal justificam a necessidade de estudar os mecanismos utilizados pela bactéria

durante o estabelecimento do processo de colonização da planta hospedeira, de modo a potencializar tal associação.

5 - Sistema Imune Vegetal

As raízes vegetais são comumente colonizadas por uma variedade de microrganismos (Pieterse et al. 2014). Para se defenderem, as plantas possuem uma série de barreiras antimicrobianas estruturais e pré-formadas, que previnem ou atenuam a invasão (Pieterse et al. 2009). Os estômatos são integrantes do sistema de imunidade inata e atuam como uma barreira contra a infecção bacteriana (Melotto et al. 2006). Além disso, as células vegetais possuem uma parede celular estável que é inacessível à maioria dos microrganismos, exceto vírus e bactérias benéficas. Apesar desta diversidade de defesas constitutivas, alguns microrganismos conseguem suprimir a defesa e recuperar nutrientes da planta (Göhre e Robatzek 2008). Os mecanismos pelos quais microrganismos benéficos e patogênicos ativam a resposta imunológica do hospedeiro apresentam semelhanças intrigantes e diferenças cruciais (Van Wees et al. 2008).

Bactérias benéficas são capazes de superar as respostas de defesa da planta e obter sucesso na colonização (Zamioudis e Pieterse 2012; Alquéres et al. 2013). As associações benéficas são controladas por processos regulados sistemicamente ou auto-regulados durante a resposta imune inata. A indução da resposta imune sistêmica induzida (*induced systemic resistance* - ISR) por bactérias benéficas ou adquirida (*systemic acquired resistance* - SAR) provocada por patógenos, resulta de múltiplas respostas desencadeadas pelas vias de sinalização empregadas pela planta hospedeira para atender às interações ambientais (Hartmann et al. 2014).

5.1 – Imunidade Inata

Microrganismos que crescem e colonizam as raízes endofiticamente provavelmente minimizam o estímulo do sistema imune da planta hospedeira. Nesse caso é comum haver uma variação fenotípica como um processo adaptativo em que as bactérias podem modificar reversivelmente a morfologia das colônias (Davidson e Surette 2008). No âmbito molecular, esta fase de variação é controlada por diversos mecanismos genéticos, incluindo alterações epigenéticas (Wisniewski-Dye e Vial 2008).

Cada um destes mecanismos gera subpopulações de bactérias dentro de uma população clonal que expressa diferencialmente moléculas de superfície como flagelina ou lipopolissacarídeos (LPS) (Van der Woude and Baumler 2004). A fase de variação provê para a bactéria significativas vantagens concernentes à adaptação em ambientes diferentes (Kingsley e Baumler 2000).

Bactérias benéficas são inicialmente reconhecidas pela planta como organismos estranhos. Por isso a interferência ativa do sistema imune vegetal é fundamental para o estabelecimento das associações. A percepção de moléculas próprias e não-próprias é feita por meio da ação de receptores presentes na superfície das plantas. Tais moléculas, frequentemente conservadas nas diferentes classes de microrganismos, são conhecidas como Padrões Moleculares Associados a Microrganismos (MAMPs) ou exclusivamente a patógenos (PAMPs) e induzem, na planta hospedeira, respostas de defesa específicas (Imunidade ativada por MAMPs ou PAMPs – MTI ou PTI). As plantas também respondem a sinais endógenos decorrentes de danos causados pelo ataque de microrganismos, chamados Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) (Boller e Felix 2009; Jones e Dangl 2006). Apesar de ser muito estudada em folhas, a sinalização imune inata ativada por MAMPs é pouco conhecida em raízes, onde a maioria dos microrganismos benéficos reside (Zamioudis e Pieterse 2012). Em *Arabidopsis* já foi demonstrado que as raízes respondem de forma específica ao contato com diferentes MAMPs e a MTI em raízes e folhas é muito similar (Millet et al. 2010).

As respostas imunitárias desencadeadas nas raízes a partir da percepção de MAMPs devem ser superadas pelo microrganismo para que a interação com a planta hospedeira seja estabelecida (Zamioudis e Pieterse 2012). Durante este processo, alguns microrganismos utilizam moléculas efetoras que são transportadas para o interior da célula hospedeira a fim de suprimir a MTI, resultando em uma suscetibilidade ativada por efetores ou ETS (Jones e Dangl, 2006). As plantas, por sua vez, adquiriram proteínas de resistência (R), que reconhecem esses efetores específicos, resultando em uma resposta imune secundária, seguida da ativação de uma resposta de defesa (Imunidade ativada por efetores ou ETI) (Chisholm et al. 2006). Em geral, MTI e ETI dão origem a respostas semelhantes, embora ETI seja qualitativamente mais forte e rápida, muitas vezes envolvendo uma forma de morte celular localizada chamada reação de hipersensibilidade (HR) (Dodds e Rathjen 2010). Além disso, ETI geralmente desencadeia uma resistência em tecidos distantes do sítio de infecção, a qual envolve sinais que se propagam em tecidos vegetais ainda não atingidos (Dempsey e Klessig

2012; Shah e Zeier 2013). Esta forma de resistência pode ser adquirida (SAR) ou induzida (ISR), dependendo dos mecanismos ativados pelo microrganismo. O resultado final depende do equilíbrio entre a capacidade do microrganismo em suprimir o sistema imune vegetal e a capacidade da planta em reconhecer o microrganismo invasor, ativando defesas eficazes (Pieterse et al. 2009).

A interação com bactérias benéficas presentes no solo envolve diferentes fases. Inicialmente, as raízes vegetais secretam compostos orgânicos, como os exsudados radiculares, que selecionam estirpes bacterianas para expressar caracteres relacionados à colonização. Uma vez estabelecida na epiderme radicular, bactérias epífitas formam biofilmes nos quais as comunidades microbianas se alojam numa matriz constituída por substâncias como exopolissacarídeos (EPS) (Rudrappa et al. 2008). Bactérias endófitas penetram na endoderme através de fissuras presentes na epiderme radicular ou através de pêlos radiculares (Figura 3).

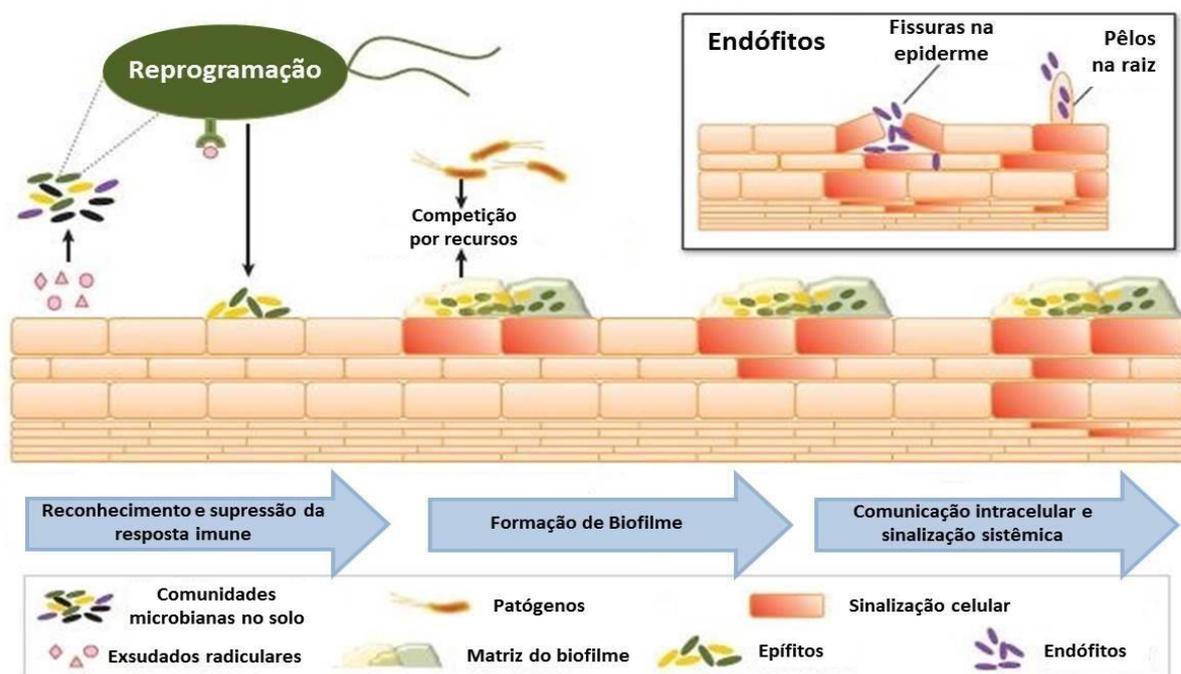


Figura 4: Diagrama das fases envolvidas na colonização radicular por comunidades microbianas benéficas presentes no solo e suas funções. Microrganismos benéficos e patogênicos competem pelos recursos disponíveis no solo. Exsudados radiculares atraem estirpes específicas. Bactérias epífitas se localizam em biofilmes formados na epiderme radicular enquanto as endófitas penetram na endoderme, suprimindo a resposta imune e promovendo comunicação intracelular seguida de sinalização sistêmica. Adaptado de Pieterse et al. 2014.

A supressão das respostas imunes locais permite que as células bacterianas se propaguem intracelularmente, se estabelecendo na raiz, onde ocorre formação de biofilme através da ação de polissacarídeos da parede celular vegetal. Já nos tecidos

internos as bactérias integram sinais que promovem a colonização e induzem efeitos como promoção do crescimento e resistência sistêmica (Pieterse et al. 2014).

5.2 – Imunidade Sistêmica

PGPB podem aumentar a imunidade da planta, eliciar a captação de nutrientes e ativar uma resposta sistêmica (Yang et al. 2009). A indução da resistência sistêmica na planta hospedeira que não depende do acúmulo de ácido salicílico e de proteínas relacionadas com patogênese (PR) é chamada Resistência Sistêmica Induzida (ISR). Esta sinalização de defesa difere das respostas desencadeadas pela Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), comumente ativada por patógenos (Pieterse et al. 1998). ISR ativada por PGPB pode ser fenotipicamente similar à SAR que ocorre quando a planta ativa seus mecanismos de defesa em resposta à infecção por um agente patogênico (Pieterse et al. 2009).

As respostas de defesa local e sistêmica ativadas por microrganismos são controladas por uma rede de sinalização na qual ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno desempenham papéis importantes (Glazebrook 2005). ISR desencadeada por microrganismos benéficos muitas vezes é regulada por vias de sinalização dependentes de ácido jasmônico e etileno, podendo estimular a defesa vegetal contra patógenos (Pozo et al. 2008). Já a SAR é caracterizada pelo aumento nos níveis de ácido salicílico (Vlot et al. 2009), seguida pela ativação de genes relacionados com patogênese, os quais codificam proteínas PR com atividade antimicrobiana (Van Loon et al. 2006). Moléculas como LPS, proteínas do flagelo, quitina, β -glucano e lipopeptídeos podem atuar como sinal para induzir resistência sistêmica (Glick et al. 2012).

É provável que MAMPs de bactérias benéficas e patogênicas sejam reconhecidos de forma similar, resultando em um aumento da capacidade defensiva da planta. Entretanto, nas interações entre plantas e microrganismos benéficos, MTI não combate as bactérias, que permanecem colonizando os tecidos vegetais. Isto sugere a existência de um alto grau de coordenação molecular entre a planta e o microrganismo (Van Wees et al. 2008).

6 – Fitormônios e a regulação do Sistema Imune Vegetal

As plantas produzem um conjunto variado de hormônios, que além de atuar no desenvolvimento vegetal e na resistência contra estresses, parecem influenciar as

interações planta-microrganismo (Grant e Jones 2009). Diversos trabalhos vêm demonstrando que auxinas (Navarro 2005; Wang et al. 2007), giberelinas (GA) (Navarro et al. 2008), ácido abscísico (ABA) (Asselbergh et al. 2008; Mauch-Mani e Mauch 2005), citocininas (CK) (Walters e Mcroberts 2006; Siemens 2006), ácido salicílico (AS) (Loake e Grant 2007), etileno (ET) (Van Loon et al. 2006), jasmonatos (JA) (Pozo et al. 2004) e brassinosteróides (BR) (Nakashita 2003; Shan et al. 2008) são capazes de modular a resistência das plantas durante o contato com microrganismos. Além destes, os hormônios peptídicos foram incluídos entre os fitormônios devido à sua participação tanto no desenvolvimento quanto na defesa vegetal (Bari e Jones 2009).

Etileno, ácido salicílico e jasmonatos são conhecidos como importantes reguladores das respostas de defesa vegetal contra estresses abióticos e microrganismos (Glazebrook 2005; Balbi e Devoto 2008). SA é uma molécula chave na ativação de respostas de defesa contra patógenos biotróficos (Canet et al. 2010), além de atuar no estabelecimento da SAR (Grant e Lamb 2006). Mutantes afetados no acúmulo desse hormônio ou insensíveis ao mesmo mostram maior suscetibilidade aos microrganismos (Bari e Jones 2009). Já os hormônios ET e JA estão associados à defesa contra patógenos necrotróficos e insetos herbívoros (Pieterse et al. 2009). No entanto, já foi demonstrado que estes hormônios também participam diretamente no controle da resistência sistêmica induzida por microrganismos benéficos (Pieterse et al. 1998; Zamioudis e Pieterse 2012; Pieterse et al. 2014).

Existem evidências de interações sinérgicas das vias SA e JA/ET, ainda que estas sejam consideradas antagônicas (Mur et al. 2013). Em *A. thaliana*, o mutante *npr1* é incapaz de suprimir a expressão de genes responsivos à JA, indicando que NPR1 possui um importante papel na interação SA-JA (Spoel et al. 2007). Sugere-se que esta rede de sinalização de defesa ativada pela planta é dependente da natureza do microrganismo e seu mecanismo de ação (Bari e Jones, 2009). Entretanto não se sabe como as plantas priorizam o tipo de via a ser ativada (Adie et al. 2007). Além disso, as plantas modulam a abundância relativa dos níveis hormonais, modificando a expressão de genes relacionados com defesa e coordenando complexas interações entre vias de sinalização de defesa a fim de ativar uma resposta imune efetiva contra o ataque de diversos microrganismos (Bari e Jones 2009).

Apesar de ser considerado “regulador do crescimento vegetal”, o hormônio auxina também está associado com processos de defesa (Yamada 1993; Robert-Seilaniantz et al. 2007; Navarro et al. 2008). Existe uma interação entre a regulação hormonal do

crescimento vegetal e a defesa contra patógenos (Potters et al. 2007). AUX promove a degradação de uma família de repressores transcricionais Auxina/ácido 3-indol acético (AUX/IAA), os quais se ligam aos fatores de resposta à auxina (ARFs) e inibem a transcrição de genes de resposta específica (Leyser 2006). Este hormônio, portanto, promove suscetibilidade à doença bacteriana e a regulação negativa da sinalização desta importante via faz parte da resposta imune induzida pelo hospedeiro (Bari e Jones 2009). Além disso, AUX parece regular a expressão de genes associados com a biossíntese, catabolismo e sinalização de outros hormônios (Paponov et al. 2008). No âmbito do crescimento vegetal, achados recentes levantam a hipótese de que ET modula a síntese, transporte e sinalização de AUX, interferindo, assim, no desenvolvimento da planta (Muday et al. 2012).

ABA tem sido descrito como componente importante das respostas de defesa vegetal, ainda que seu papel exato não tenha sido completamente elucidado (Bari e Jones 2009). Uma interação antagônica ocorre entre a SAR e a resposta vegetal a estresses abióticos, mediada por ABA (Yasuda et al. 2008). Entretanto, ABA ativa o fechamento estomático atuando como barreira contra a infecção bacteriana e desempenhando papel de regulador positivo da defesa (Melotto et al. 2006). Além disso, ABA parece regular as respostas de defesa através da deposição de calose, produção de ROS e indução da expressão de genes de defesa, contudo os mecanismos pelos quais tais processos ocorrem não são conhecidos (Bari e Jones 2009).

Apesar de giberelina ser um hormônio vegetal originalmente produzido por fungos, as bactérias são capazes também de produzi-lo como metabólitos secundários que atuam no estabelecimento da interação planta/hospedeiro (Macmillan 2001). Em *A. thaliana*, proteínas DELLA são reguladores negativos da sinalização via GA, controlando o sistema imune vegetal por modular respostas de defesa dependentes de SA e JA. Tais proteínas integram vias de resposta envolvendo JA/ET e SA (Navarro et al. 2008) e parecem regular os níveis de ROS após estresses (Achard et al. 2008).

O papel das citocininas na defesa vegetal é pouco compreendido, porém há indicações de que tais hormônios estão relacionados com a regulação deste processo. Tem sido sugerido que este fitormônio é um fator chave no desenvolvimento de doenças radiculares, ainda que os mecanismos envolvidos no processo não sejam claros (Siemens et al. 2006). Além disso, a ativação constitutiva de proteína de resistência (R) mostra defeitos morfológicos através do acúmulo de citocininas indicando o envolvimento desta via nas respostas mediadas por proteínas R (Igari et al. 2008).

No âmbito da defesa vegetal, há trabalhos que sugerem a existência de uma relação entre brassinosteróides e outros hormônios, visto que componentes importantes da via de BR estão envolvidos na modulação de resposta imune em plantas. BRs também têm sido mostrados afetando a biossíntese de outros hormônios, além de interferir na expressão de genes envolvidos na defesa do hospedeiro (Shan et al. 2008).

Os peptídios hormonais compreendem uma nova classe de hormônios e estão envolvidos na regulação de vários aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo respostas de defesa contra microrganismos (Farrokhi et al. 2008). Tais moléculas, compostas por 18-23 aminoácidos, são processadas a partir de precursores polipeptídicos. Neste grupo destaca-se a sistemina, a qual é sintetizada a partir da prosistemina e estocada no citoplasma (Narvaez-Vasquez e Ryan 2004). A sistemina atua perto ou longe do sítio de ferimento, visto que induz e amplifica o sinal móvel derivado de JA, ativando a resposta sistêmica (Schilmiller e Howe 2005).

O envolvimento dos reguladores do crescimento vegetal na imunidade de plantas sugere que controle do crescimento e defesa estão interconectados por uma complexa rede de comunicação entre as vias hormonais de sinalização (Pieterse et al. 2009). Após o contato inicial entre planta e microrganismo, o balanço fitormonal varia entre as espécies vegetais e depende dos mecanismos desencadeados pelo microrganismo. A “tradução do sinal” resulta na ativação de um conjunto específico de genes relacionado com a defesa, que determina a natureza e a efetividade da resposta imune (de Vos et al. 2005). Nesse contexto, *A. thaliana* tem sido um excelente modelo vegetal utilizado para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre plantas e microrganismos (Pieterse et al. 2009).

7 – *Arabidopsis thaliana*: modelo para estudo das interações entre plantas e microrganismos

Várias espécies vegetais têm sido reconhecidas como modelo para estudos em Biologia Vegetal tais como trigo, tomate, arroz, ervilha e cevada. No entanto, um consenso acerca de uma espécie que possa ser utilizada para estudo de processos comuns a todas as plantas foi estabelecido (Mitchell-Olds 2001). Nesse contexto, *Arabidopsis thaliana* tem sido utilizada como sistema modelo para esclarecimento de aspectos fundamentais concernentes à genética, biologia molecular e desenvolvimento vegetal, fornecendo informações sobre ação hormonal e vias de sinalização em resposta

a condições ambientais (Somerville e Koornneef 2002; Koornneef e Meinke 2010).

A. thaliana é uma planta herbácea de pequeno porte, membro da família *Brassicaceae*, a qual inclui espécies mais conhecidas como a couve e a mostarda (Meinke et al. 1998). Suas principais características morfológicas são sementes pequenas (cerca de 0,5 mm de comprimento e 0,32 mm de largura) e ligeiramente ovais, folhas verdes e ligeiramente roxas, mais abundantes na base da planta em forma de roseta, caule que pode atingir 25 cm de altura e apresenta ramificações, raiz aprumada e sem crescimento secundário. As flores apresentam formato em corimbo, contendo sépalas verdes, pétalas brancas, estames e carpelos. Cada fruto, com tamanho entre 5 e 20 mm de comprimento, contém entre 20 e 30 sementes (Figura 5) (Clarck 2001).

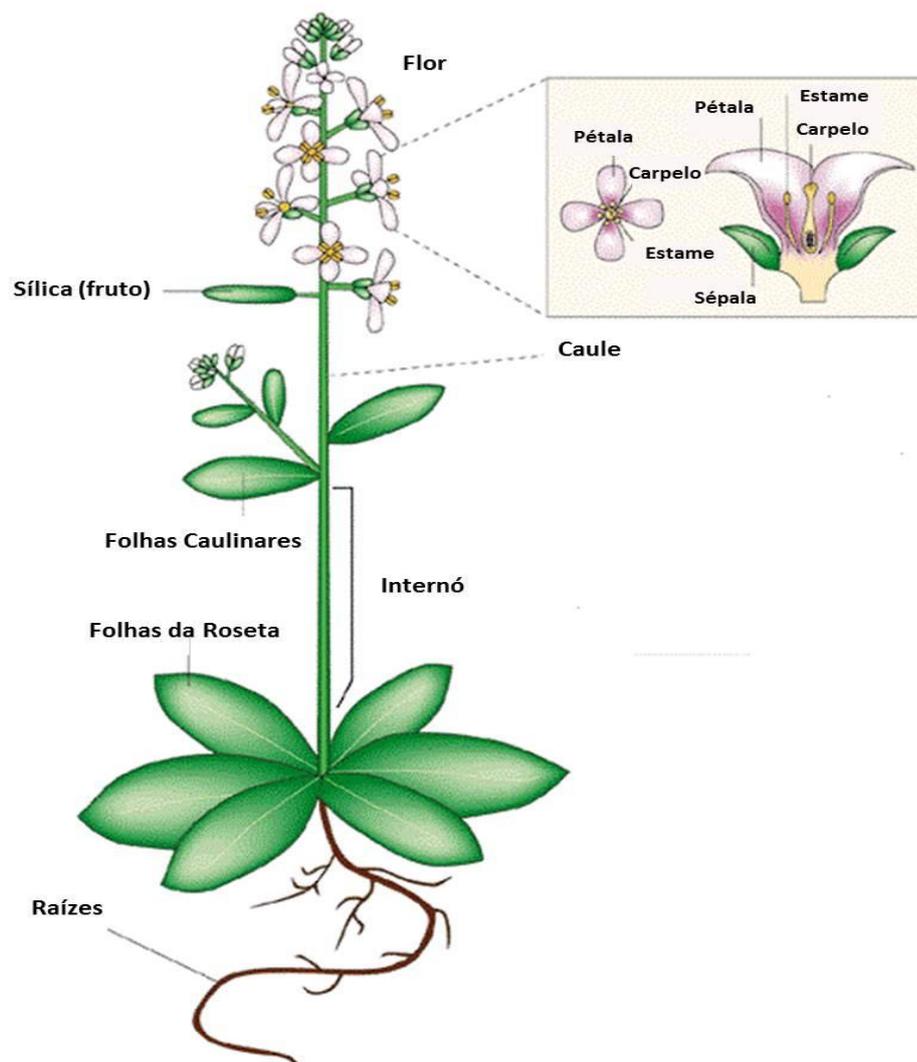


Figura 5: Diagrama contendo características morfológicas de uma planta adulta de *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de Clarck, J. 2001.

A. thaliana foi descoberta no século XVI na Alemanha, ao fim da Idade Média, período em que os estudos de Botânica e Taxonomia Vegetal passaram a ter uma importância maior. Sua distribuição natural ocorre na Europa, Ásia e América do Norte (Figura 6) (Meinke et al. 1998). Atualmente, são conhecidos mais de 750 ecótipos em todo o mundo, cuja heterogeneidade genética varia conforme o habitat natural e as condições ambientais (Koornneef e Meinke 2010). O sequenciamento do DNA genômico do ecótipo COL-0 foi concluído em 2000 pelo grupo “*The Arabidopsis Genome Initiative*”, sendo *A. thaliana* a primeira planta e o terceiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado (Initiative 2000). As sequências completas foram depositadas em um banco de dados (*The Arabidopsis Information Resource – TAIR – www.arabidopsis.org*), permitindo o acesso da comunidade científica a diversas informações como estrutura, expressão e produtos gênicos, mapa do genoma, marcadores genéticos, germoplasma e publicações sobre a pesquisa na área (Huala et al. 2001). Desde então, este material vem sendo amplamente empregado para estudos genéticos e moleculares (Nishimura e Dangl 2010). Os diferentes acessos de *A. thaliana* recolhidos ao redor do mundo e catalogados no TAIR são variáveis em forma, desenvolvimento e fisiologia, permitindo o entendimento de mecanismos envolvidos em condições de estresse ambiental (Mandyam et al. 2013).

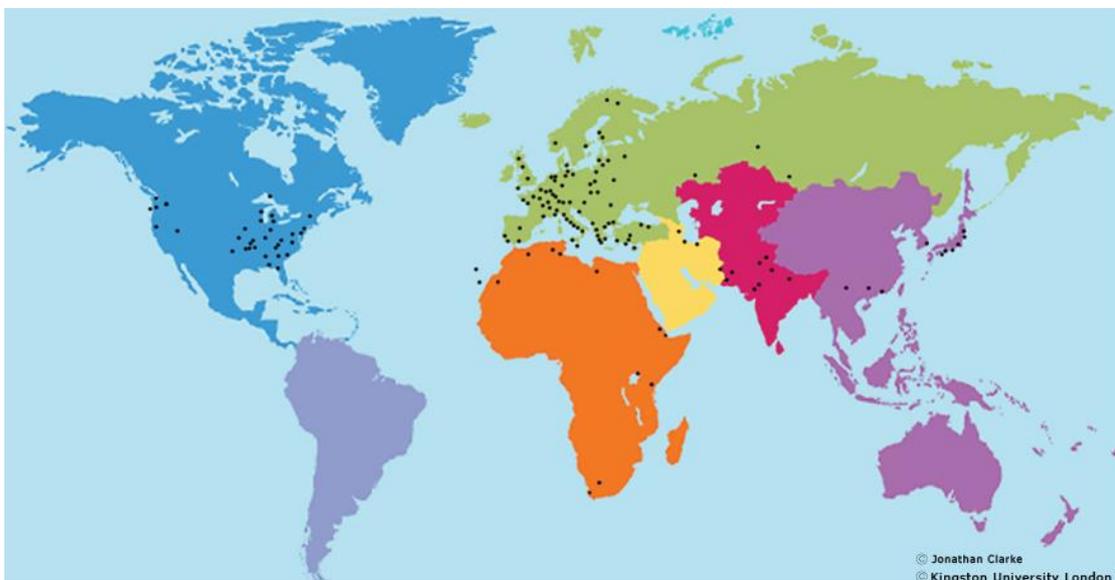


Figura 6: Distribuição geográfica dos ecótipos de *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de Clarck, J. 1993. Disponível em http://arabidopsis.org/images/geo_distribution.png.

A. thaliana apresenta diversas vantagens que a tornam um interessante modelo experimental: pequeno tamanho, ciclo de vida curto (5-6 semanas em condições ideais de crescimento), habilidade para crescer em condições controladas (em solo ou meio definido), alta fecundidade (produção de até 10.000 sementes por planta) e facilidade para geração de linhas mutantes e transgênicas (Figura 7). Seu genoma tem cerca de 120 Mb e está organizado em cinco cromossomos, contendo aproximadamente 22.000 genes (Page e Grossniklaus 2002).



Figura 7: *Arabidopsis thaliana* durante seus diferentes estádios, desde a germinação da semente até o período de florescimento. À esquerda, plantas com idades variando entre 2 e 6 semanas. À direita, o desenvolvimento de flores e exemplo de sementes da espécie. As barras brancas representam 1.0 cm, exceto para flores e sementes: 1.0 mm (Inra 2010). Disponível em <http://www.ijpb.versailles.inra.fr/en/arabido/arabido.htm>.

Ao longo dos anos *A. thaliana* também tem sido utilizada como modelo para estudos em diversas áreas da Biologia Vegetal como investigação da base genética da formação de madeira ou xilema secundário (Zhang et al. 2011), vias envolvidas no controle do desenvolvimento vegetal (Desbrosses et al. 2009), efeito da emissão de

voláteis no biocontrole (Hung et al. 2013), regulação da biossíntese de ácidos graxos (Troncoso-Ponce et al. 2015), dentre outros aspectos. Além disso, esta espécie vegetal também vem sendo empregada para estudo das interações entre plantas e bactérias endofíticas, devido à possibilidade do uso de mutantes (Iniguez et al. 2005).

A maior parte das pesquisas realizadas com o objetivo de esclarecer os mecanismos envolvidos na interação entre moléculas associadas a microrganismos e seus receptores presentes na superfície celular têm utilizado *A. thaliana* como modelo para estudo da resposta imune vegetal (Ryan et al. 2007). A adoção desta planta modelo permitiu um estudo detalhado dos mecanismos moleculares envolvidos na simbiose de *P. indica*, além da caracterização do mecanismo de colonização (Camehl et al. 2010; Lee et al. 2011; Nongbri et al. 2012). Apesar da ausência de simbiose radicular em *A. thaliana*, os genes envolvidos neste processo parecem ser conservados (Hayward et al. 2012).

No âmbito das interações entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal, *A. thaliana* é também considerada um sistema modelo para estudos de colonização por tais microrganismos (O'Callaghan et al. 2001). Isto se deve à facilidade de observação e estudo do sistema radicular em meios de cultivo vegetal e à possibilidade de se utilizar promotores importantes fundidos ao gene repórter GUS, para analisar a expressão de genes de interesse em decorrência de algum tratamento (Costacurta et al. 1994). A disponibilidade de linhagens mutantes de *A. thaliana* garante a possibilidade de se testar hipóteses acerca do papel particular de genes envolvidos na colonização por bactérias promotoras do crescimento vegetal (O'Callaghan et al. 2001). As tabelas 1 e 2 trazem informações importantes acerca de algumas linhas mutantes e de um dos transgênicos de *A. thaliana*, envolvidos nas principais vias hormonais relacionadas com produção e metabolismo de ABA, AUX, ET, SA e JA, as quais vêm sendo largamente empregadas no estudo acerca das interações entre esta planta modelo e bactérias benéficas. O uso destas ferramentas tem permitido elucidar a ecologia de diferentes endófitos e entender sua importância na captação de nutrientes, ativação da defesa e resposta a patógenos e estresses (Mandyam e Jumpponen 2014).

A interação entre *A. thaliana* e *G. diazotrophicus* foi descrita em 2006 por Cocking e colaboradores, mediante a localização da bactéria nas raízes de plântulas crescidas *in vitro*. Entretanto, não foi relatada a influência desta bactéria na promoção do crescimento vegetal, nas vias hormonais e sinalização de defesa.

MUTANTES	DESCRIÇÃO	CARACTERÍSTICAS	CONSTRUÇÃO	BACKGROUND
<i>ein 2</i> <i>Ethylene</i> <i>Insensitive 2</i>	Afetado na transdução de sinal do etileno. Atua downstream da CTR1. Regula positivamente ORE 1 e negativamente regula mir164A,B,C envolvido com a senescência foliar.	Insensível ao etileno. Aumenta a tolerância a bactérias patogênicas.	Diepoxibutano.	COL-0
<i>ein 2-1</i> <i>Ethylene</i> <i>Insensitive 2-1</i>	Afetado na transdução de sinal do etileno. Atua downstream da CTR1. Regula positivamente ORE 1 e negativamente regula mir164A,B,C envolvido com a senescência foliar.	Insensível ao etileno. Resistente a citocinina em ambiente escuro. Apresenta redução do crescimento bacteriano	Etil metano sulfonato. Substituição de C por T no nucleotídeo 3448, gerando um stop códon.	COL-0
<i>ein 2-5</i> <i>Ethylene</i> <i>Insensitive 2-5</i>	Afetado na transdução de sinal do etileno. Atua downstream da CTR1. Regula positivamente ORE 1 e negativamente regula mir164A,B,C envolvido com a senescência foliar.	Insensível a etileno. Sensível a estresse osmótico.	Raio X. Deleção no nucleotídeo 2731 causando um frameshift.	COL-0
<i>ein 3-1</i> <i>Ethylene</i> <i>Insensitive 3-1</i>	Mutação afeta atividade de um fator de transcrição nuclear que inicia a cascata transcrional de resposta a etileno. Este fator atua downstream da histidina quinase receptora de etileno ETR1 e da Raf-quinase CTR1.	Parcialmente sensível ao etileno.	Etil metano sulfonato. Substituição de G por A no nucleotídeo 598	COL-0
<i>etr1-3</i> <i>Ethylene</i> <i>Response 1-3</i>	Mutação afeta a ligação de etileno ao receptor membranal localizado na membrana plasmática.	Aumenta o número de raízes laterais. Reduz o transporte de auxina. Afeta o metabolismo de ABA, auxina, citocinina e giberelina.	Etil metano sulfonato.	COL-0
<i>sid 2-2</i> <i>Salicylic Acid</i> <i>Induction</i> <i>Deficient 2-2</i>	Mutação afeta a atividade da isocoristamato sintase, da via de síntese de ácido salicílico.	Fechamento estomático e resposta a lipopolissacarídeo afetadas na presença de patógenos.	Deleção/ rearranjo no éxon 9.	COL-0

<p>aux 1-7 Auxin Resistant 01/07/2012</p>	<p>Mutação interfere na transcrição de um transportador de influxo de auxina.</p>	<p>Resistente a auxina. Atua nas raízes laterais ou células da epiderme influenciando a posição e iniciação das raízes.</p>	<p>Etil metano sulfonato. Uma substituição de nucleotídeo (G por A no exon 9) conduz a uma mutação <i>missense Gly459Asp</i></p>	<p>COL-0</p>
<p>jar 1-1 Jasmonate Resistant 1</p>	<p>Mutação reduz sensibilidade ao metil jasmonato em na inibição do crescimento radicular. Também produz níveis mais baixos de jasmonyl-isoleucina (Ile-JA) em resposta a ferimentos que plantas do tipo selvagem.</p>	<p>Insensível à MeJA. Baixo nível de transcrição é detectado após ferimento, mas, com valores muito menores do que a transcrição do tipo selvagem. Isto sugere que a enzima JAR1 funcional não é produzida nesse mutante</p>	<p>Substituição no éxon 63.</p>	<p>COL-0</p>
<p>npr1 Nonexpresser of PR genes 1</p>	<p>Mutação causa uma significativa redução induzida por flg22 sobre o crescimento bacteriano, indicando que o gene muito provavelmente não é requerido para a resistência bacteriana flg22 induzida (ZIPFEL et al., 2004).</p>	<p>Altamente suscetível à infecções de patógenos. Baixa expressão dos genes relacionados à patogênese (PR); incapaz de desenvolver resistência sistêmica adquirida (SAR).</p>	<p>Mutação recessiva no sítio H334Y.</p>	<p>COL-0</p>
<p>abi4 ABA hypersensitive 4</p>	<p>Mutação do gene gera aumento do conteúdo de ABA em resposta ao baixo nível de água e adição exógena de hormônio (VERSLUES et al., 2006). Adicionalmente, há sensibilidade à 25 mM de trealose como no tipo selvagem (inibição do crescimento de raiz) (RAMON et al., 2006).</p>	<p>Aumento do nível de ABA durante o desenvolvimento endógeno de sementes; taxa de transpiração das folhas que leva a sintomas de murchamento especialmente sob baixa umidade relativa do ar e estresse hídrico; dormência das sementes reduzida; baixa elevação de cálcio citoplasmático induzida por ABA em células-guarda.</p>	<p>Mutação dominante no domínio PP2C.</p>	<p>COL-0</p>

Tabela 1: Principais características de linhas mutantes contendo afetações em genes das principais vias hormonais. Adaptado de *Arabidopsis* hormone e mutant database (TAIR, www.arabidopsis.org) 2011.

TRANSGÊNICO	DESCRIÇÃO	CARACTERÍSTICAS	CONSTRUÇÃO	BACKGROUND
<u>NahG</u>	Afeta o acúmulo de ácido salicílico, devido a presença da enzima salicilato hidroxilase que degrada o respectivo ácido.	Aumento do crescimento vegetal e do conteúdo de nitrogênio e antioxidantes nas sementes. Resistência sistêmica adquirida relacionada a genes PR não desenvolvida.	Clonagem em <i>A. thaliana</i> de um gene que codifica a enzima salicilato hidroxilase originada de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	COL-0

Tabela 2: Principais características do material vegetal transgênico afetado na via de ácido salicílico (Abreu e Munné-Bosch, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard P, Renou JP, Berthome R, Harberd NP, Genschik P (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* 18: 656–660
- Abreu ME, Munné-Bosch S (2009). Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 60(4): 1261-1271
- Adie BA, Perez-Perez J (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1665–1681
- Ae N, Shen RF (2002) Root cell-wall properties are proposed to contribute to phosphorus (P) mobilization by groundnut and pigeon pea. *Plant Soil* 245: 95– 103
- Al-Babili S, Bouwmeester HJ (2015). Strigolactones, a novel carotenoid derived plant hormone. *Annu Rev Plant Biol* 66: 161-186
- Alen'kina SA, Payusova OA, Nikitina VE (2006) Effect of *Azospirillum* lectins on the activities of wheat-root hydrolytic enzymes. *Plant Soil* 283:147–151
- Alexandratos N, Bruinsma J (2012) World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. *ESA Work*: 3
- Alquères S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A (2013) The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol Plant Microbe Interact* 26(8): 937-945

- Arencibia AD, Vinagre F, Estevez Y, Bernal A, Perez J, Cavalcanti J, Santana I, Hemerly AS (2006) *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicitate a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. *Plant Signal Behav* 1(5): 265-273
- Arrieta J, Hernández L, Coego A, Suárez V, Balmori E, Menéndez C, Petit-Glatron M-F, Chambert R, Selman-Housein G (1996) Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* 142: 1077–1085
- Asensi-Fabado MA, Munné-Bosch S (2010) Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends Plant Sci* 15: 582–592
- Asselbergh B, de Vleeschauwer D, Höfte M (2008) Global switches and fine-tuning ABA modulates plant pathogen defense. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 709–719
- Attwood MM, Van Dijken JP, Pronk JT (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J Ferment Bioeng* 72(2): 101–105
- Babalola OO (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–1570
- Bais HP, Weir TF, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 233–266
- Bakker MG, Schlatter DC, Otto-Hanson L, Kinkel LL (2014). Diffuse symbioses: roles of plant–plant, plant–microbe and microbe–microbe interactions in structuring the soil microbiome. *Mol Ecol* 23(6): 1571-1583
- Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29: 911–922

- Baldani JI, Reis VM, Videira SS, Boddey LH, Baldani VLD (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* 384(1-2): 413-431
- Bari R, Jones JDG (2009) Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Mol Biol* 69: 473–488
- Bashan Y, de-Bashan LE (2005) Plant growth-promotion. *Encyclopedia Soils Environ* 1: 103–115
- Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30:1225–1228
- Bashan Y, Kamnev AA, de-Bashan LE (2013) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol Fert Soils* 49:465–479
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24: 7-11
- Benhamou N, Kloepper JW, Tuzun S (1998) Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta* 204: 153-168.
- Berg G, Hallmann J (2006) Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. *Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag, Berlin: 53-69

- Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A, França L, Magalhães V, Alquéres S, Cardoso A, Almeida W, Loureiro MM, Nogueira E, Cidade D, Oliveira D, Simão T, Macedo J, Valadão A, Dreschsel M, Freitas F, Vidal M, Guedes H, Rodrigues E, Meneses C, Brioso P, Pozzer L, Figueiredo D, Montano H, Junior J, de Souza Filho GA, Flores VMQ, Ferreira BS, Branco AT, Gonzalez P, Guillobel H, Lemos M, Seibel L, Macedo J, Ferreira MA, Sachetto-Martins G, Coelho A, Santos E, Amaral G, Neves A, Pacheco AB, Carvalho D, Lery L, Bisch P, Rössle SC, Ürményi T, Pereira AR, Silva R, Rondinelli E, von Krüger W, Martins O, Baldani JI, Ferreira PCG (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. BMC Genomics 10: 450.
- Bertin C, Yang XH, Weston LA (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant Soil 256: 67-83
- Bertini EV, Peñalver CGN, Leguina AC, Irazusta VP, de Figueroa LI (2014). *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 possesses an active quorum sensing regulatory system. Antonie Van Leeuwenhoek 106(3): 497-506
- Blanco Y, Blanch M, Piñón D, Legaz ME, Vicente C (2005) Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. J Biosci Bioeng 99(4) 366–371
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr Opin Plant Biol 4: 343-350
- Böhm M, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2007) Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Mol Plant-Microbe Interact 20: 526-533

- Buell CR, Last RL (2010) Twenty-first century plant biology: impacts of the *Arabidopsis* genome on plant biology and agriculture. *Plant Physiol* 154: 497-500
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR (2000) Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Can J Microbiol* 46: 237–245
- Burgess CM, Smid EJ, van Sinderen D (2009) Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. *Int J Food Microbiol* 133:1–7
- Camehl I, Sherameti I, Venus Y, Bethke G, Varma A, Lee J, Oelmüller R (2010) Ethylene signalling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and non-beneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 185: 1062-1073
- Canet JV, Dobón A, Ibañez F, Perales L, Tornero P (2010) Resistance and biomass in *Arabidopsis*: a new model for salicylic acid perception. *Plant Biotech J* 8: 126–141
- Carvalho TLG, Balsemão-Pires E, Saraiva RM, Ferreira PCG, Hemerly AS (2014) Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J Exp Bot*: eru319
- Cassan F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruiz O (2009) Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur J Soil Biol* 45:12–19
- Cavalcante VA, Dobereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*: 108(1): 23–31
- Cesco S, Mimmo T, Tonon G, Tomasi R, Pinton R, Terzano R, Neumann G, Weisskopf L, Renella G, Landi L, Nannipieri P (2012) Plant borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bioactivities related to plant nutrition. A review. *Biol Fertil Soils* 48: 123–149

- Chen L, Luo S, Xiao X, Guo H, Chen J, Wan Y, Li B, Xu T, Xi Q, Rao C, Liu C, Zeng G (2010) Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Appl Soil Ecol* 46:383–389
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–814
- Clark SE (2001) Cell signalling at the shoot meristem. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2(4): 276–284
- Cocking EC, Stone PJ, Davey MR (2006) Intracellular colonization of roots of *Arabidopsis* and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42(1): 74–82
- Cohen AC, Bottini R, Piccoli PN (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regul* 54: 97-103
- Cohen MF, Lamattina L, Yamasaki H (2010) Nitric oxide signaling by plant-associated bacteria. *Nitric Oxide Plant Physiol*: 161–172
- Cojho EH, Reis VM, Schenberg ACG, Döbereiner J (1993) Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol Lett* 106(3): 341-346
- Compant S, Clement C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42: 669-678

- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Ait Barka E (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71: 1685-1693
- Conn VM, Franco CM (2004) Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl Environ Microbiol* 70: 1787 – 1794
- Coombs JT, Franco CMM (2003) Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol* 69 : 5603 – 5608
- Crespo JM, Boiardi JL, Luna MF (2011) Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agri Sci* 2: 16–22
- Crowley DE, Kraemer SM (2007) Function of siderophores in the plant rhizosphere. In *The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil–Plant Interface*: 73–109
- da Cunha L, Mcfall AJ, Mackey D (2006) Innate immunity in plants: a continuum of layered defenses. *Microb Infect* 8: 1372-1381
- Dahm H, Rózycki H, Strzelczyk E, Li CY (1993) Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures. *Zbl Mikrobiol* 148:195–203
- de-Bashan LE, Hernandez JP, Bashan Y (2012) The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation - a comprehensive evaluation. *Appl Soil Ecol* 61:171–189
- de Bruijn FJ (2015) Biological nitrogen fixation. In *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing: 215-224

- de Oliveira ALM, Canuto EL, Reis VM, Baldani JI (2003) Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Braz J Microbiol* 34: 59–61
- de Paula Soares C, Rodrigues EP, de Paula Ferreira J, Araújo JLS, Rouws LFM, Baldani JI, Vidal MS (2015) Tn5 insertion in the *tonB* gene promoter affects iron-related phenotypes and increases extracellular siderophore levels in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* 197(2): 223-233
- de Vos M (2005) Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 923–937
- Dempsey DA, Klessig DF (2012) SOS: too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci* 17: 538–45
- Deng Y, Zhu Y, Wang P, Zhu L, Zheng J, Li R, Ruan L, Peng D, Sun M (2011) Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J Bacteriol* 193: 2070-2071
- Desbrosses G, Contesto C, Varoquaux F, Galland M, Touraine B (2009) PGPR-*Arabidopsis* interactions is a useful system to study signaling pathways involved in plant developmental control. *Plant Signal Behav* 4(4): 319-321
- Diels LN, Van der Lelie, Bastiaens L (2002) New developments in treatment of heavy metal contaminated soils. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 1 (1): 75–82
- Dimkpa CO, Svatos A, Dabrowska P, Schmidt A, Boland W, Kothe E (2008) Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere* 74:19–25

- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22: 107–149
- Döbereiner J, Baldani VL, Reis VM (1995) Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In *Azospirillum VI and related microorganisms*. Springer Berlin Heidelberg: 3-14
- Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Ann Appl Biol* 157: 361-379
- Dong Z, Canny MJ, McCully ME, Roboredo MR, Cabadilla CF, Ortega E, Rodes R (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). *Plant Physiol* 105: 1139–1147
- dos Santos MF, Muniz de Pádua VL, de Matos Nogueira E, Hemerly AS, Domont GB (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* 73(5): 917–931
- Douglas A (1994) *Symbiotic Interactions*. Oxford University Press.
- Dugardeyn J, van der Straeten D (2008) Ethylene: fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Sci* 175: 59-70
- Durbak A, Yao H, McSteen P (2012) Hormone signaling in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 15: 92–96
- Elmerich C, Newton WE (2007) Historical perspective: from bacterization to endophytes. In: Elmerich C, Newton W, eds. *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Dordrecht: Springer: 1–20.
- Eskin N (2012) Colonization of *Zea mays* by the nitrogen fixing bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

- Farrar K, Bryant D, Cope-Selby N (2014) Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotech J* 12(9): 1193-1206
- Farrokhi N, Whitelegge JP, Brusslan JA (2008) Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotech* 6: 105–134
- Faure D, Vereecke D, Leveau JHJ (2009) Molecular communication in the rhizosphere. *Plant Soil* 321: 279–303
- Felle H (1998) The apoplastic pH of the *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. *J Exp Bot* 49: 987–95
- Feng K, Lu HM, Sheng HJ, Wang XL, Mao J (2004) Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils. *Pedosphere* 14(1): 85–92
- Ferrara FID, Oliveira ZM, Gonzales HHS, Floh EIS, Barbosa HR (2012) Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil* 353: 409-417
- Fishal EM, Meon S, Yun WM (2010) Induction of tolerance to fusarium wilt and defense-related mechanisms in the plantlets of susceptible Berangan Banana preinoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burkholderia* sp. (UPMB3). *Agricul Sci China* 9: 1140-1149
- Fisher K, Newton WE (2005) Nitrogenase proteins from *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane-colonizing bacterium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1750(2) 154–165
- Fontaniella B, Rodríguez CW, Piñón D, Vicente C, Legaz M-E (2002) Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. *J Chromatogr* 770(1-2): 275–281

- Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, Durkin AS, Huot H, Shrivastava S, Kothari S, Dodson RJ, Mohamoud Y, Khouri H, Roesch LFW, Krogfelt KA, Struve C, Triplett EW, Methé BA (2008) Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. PLoS Biol 4: e1000141
- Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J, Sepúlveda J, Martínez-Romero E (1999) Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiology Ecology 29(2) 117–128.
- Fuentes-Ramírez LE, Jimenez-Salgado T, Abarca-OCampo IR, Caballero-Mellado J (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. Plant Soil 154: 145-150
- Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales, A. Tapia-Hernández, Jiménez-Salgado T, Wang ET, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J (2001) Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. Int J Syst Evol Microbiol 51(4): 1305–1314
- Fuentez-Ramirez LE, Cabellaro-Mellado J, Sepulveda-Sanchez J, Martinez-Romero E (1997) Location of *Acetobacter diazotrophicus* in inoculated sugarcane by GUS detection. In 11th International Congress on Nitrogen Fixation: 18
- Fürnkranz M, Lukesch B, Müller H, Huss H, Grube M, Berg G (2012) Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. Microb Ecol 63(2) 418-428
- Gaiero JR, McCall CA., Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE (2013) Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. Am J Bot 100(9) 1738-1750

- Galar ML, Boiardi JL (1995) Evidence for a membrane bound pyrroloquinoline quinine-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43(4) 713–716
- Germaine KJ, Keogh E, Ryan D, Dowling D (2009) Bacterial endophyte-mediated naphthalene phytoprotection and phytoremediation. *FEMS Microbiol Lett* 296:226–234
- Gillis MK, Kersters B, Hoste, Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, Teixeira KRS, Dobereiner J, de Ley J (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J Syst Bacteriol* 39(3) 361–364
- Giongo A, Tyler HL, Zipperer UN, Triplett EW (2010) Two genome sequences of the same bacterial strain, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5, suggest a new standard in genome sequence submission. *Stand Genomic Sci* 2(3): 309–317
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205–22
- Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119 (3): 329–339
- Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett.* 251: 1-7
- Glick BR (2015) Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. In *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer International Publishing: 1-28
- Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* 169: 30–39

- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327: 812-818
- Göhre V, Robatzek S (2008) Breaking the Barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 46: 189 – 215
- Grant MR, Jones JDG (2009) Hormone (Dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 234: 750-752
- Gregory PJ (2006) *Plant Roots: growth, activity and interaction with soils*. Blackwell Publishing, Oxford: 318
- Geiger D, et al. (2011) Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Sci Signal* 4:ra32
- Haas D, Keel C (2003) Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol* 41:117–153
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43: 895 – 914
- Hallmann J, Rodríguez-Kábana R, Kloepper JW (1999) Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biol Biochem* 31:551–560
- Ham JH, Kim MG, Lee SY, Mackey D (2007) Layered basal defenses underlie nonhost resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant J* 51: 604–16

- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Elsas JDV (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16: 463–471
- Harrison MJ (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 59: 19-42
- Hartmann A, Rothballer M, Hense BA, Schröder P (2014) Bacterial quorum sensing compounds are important modulators of microbe-plant interactions. *Front Plant Sci*: 5
- Hayward A, Vignesh G, Delay C, Samian MR, Manoli S, Stiller J, McKenzie M, Edwards D, Batley J (2012) Second-generation sequencing for gene discovery in Brassicaceae. *Plant Biotech J* 10: 750-759
- Hense BA, Kuttler C, Müller J, Rothballer M, Hartmann A, Kreft JU (2007) Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol* 5: 230–239
- Hernandez L, Arrieta J, Menendez C, Vazquez R, Coego A, Suarez V, Selman G, Petit-Glatron M-F, Chambertt R (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J* 309(1): 113–118
- Hider RC, Kong X (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27(5): 637–657
- Horrigan L, Lawrence R, Walker P (2002) How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environ Health Perspec* 110: 445– 456
- Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller LA, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral BW, Beavis W, Meinke DW, Town CD, Somerville C, Rhee SY (2001) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-

- based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res* 29(1): 102-105
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Rev Phytopathol* 45: 101–27
- Hung R, Lee S, Bennett JW (2013) *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol* 6(1): 19-26
- Hurek T, Reinhold-Hurek B, Montagu MV, Kellenberger E (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* strain BH72 in grasses. *J Bacteriol* 176: 1913–1923
- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B, Piché Y (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 233–242
- Igari K, Endo S, Hibara Ki, Aida M, Sakakibara H, Kawasaki T, Tasaka M (2008) Constitutive activation of a CC-NB-LRR protein alters morphogenesis through the cytokinin pathway in *Arabidopsis*. *Plant J* 55: 14–27
- Igual JM, Valverde A, Cervantes E, Velaquez E (2001) Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie* 21: 561-568
- Iniguez AL, Dong Y, Triplett EW (2004) Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 1078-1085
- Iniguez AL, Dong Y, Carter HD, Ahmer BMM, Stone JM, Triplett EW (2005) Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact* 18: 169-178

- Initiative AG (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 796
- Intorne AC, de Oliveira MVV, Lima ML, da Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* 191(5): 477–483
- James EK, Olivares FL, de Oliveira AL, dos Reis FB, da Silva LG, Reis VM (2001) Further observations on the interaction between sugarcane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52: 747–760
- James EK, Olivares FL (1998) Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci* 17: 77–119
- James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Res* 65: 197–209
- James EK, Reis VM, Olivares FL, Baldani JI, Döbereiner J (1994) Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* 45: 757–766
- Jimenez-Salgado T, Fuentes-Ramirez LE, Tapia-Hernandez A, Mascarua-Esparza MA, Martinez-Romero E, Caballero-Mellado J (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63(9): 3676–3683
- Jin Q, Thilmony R, Zwiesler-Vollick J, He SY (2003) Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Microbes Infect* 5: 301–10

- Johnston-Monje D, Raizada MN (2011) Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. PLoS One 6: e20396
- Jones JDG, Dangl J (2006) The plant immune system. Nature 444: 323-329
- Kang BG, Kim WT, Yun HS, Chang SC (2010) Use of plant growth promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. Plant Biotechnol Rep 4: 179–183
- Katiyar, V. and Goel, R. (2004) Siderophore-mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. Plant Growth Regul 42: 239–244
- Kerstens KP, Lisdiyanti P, Komagata K, Swings J (2006) The family Acetobacteraceae: the genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia. Prokaryotes 5: 163–200
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2007) Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - a review. Agron Sustain Dev 27(1): 29–43
- Kim YC, Glick BR, Bashan Y, Ryu CM (2012) Enhancement of plant drought tolerance by microbes. Plant Resp Drought Stress. Springer Berlin Heidelberg: 383–413
- Kim KY, Jordan D, McDonald GA, (1998) Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular–arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. Biol Fert Soils 26: 79–87
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature 286(5776): 885–886

- Kloepper JW, Beauchamp CJ (1992) A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can J Microbiol* 38: 1219-1232
- Knief C, Delmotte N, Chaffron S, Stark M, Innerebner G, Wassmann R, Von Mering C, Vorholt JA (2011) Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J*: 1378-1390
- Kniskern JM, Traw MB, Bergelson J (2007) Salicylic acid and jasmonic acid signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 20: 1512–22
- Koornneef M, Meinke D (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J* 61(6): 909-921
- Krause A, Bischoff B, Miché L, Battistoni F, Reinhold-Hurek B (2011) Exploring the function of alcohol dehydrogenases during the endophytic life of *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Mol Plant-Microbe Interact* 24: 1325-1332
- Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 6: 1244–1251
- Kurek E, Jaroszuk-Scisel J (2003) Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biol Control* 26:48–56
- Kurosawa E (1926) Experimental studies on the nature of the substance secreted by the “bakanae” fungus. *Nat Hist Soc Formosa* 16: 213–227
- Kyungseok P, Kloepper JW, Ryu C-M (2008) Rhizobacterial exopolysaccharide elicit induced resistance on cucumber. *J Microbial Biotech* 18:1095–1100

- Leborgne-Castel N, Bouhidel K (2014) Plasma membrane protein trafficking in plant–microbe interactions: a plant cell point of view. *Front Plant Sci* 5(735): 1-13
- Lee YC, Johnson JM, Chien CT, Sun C, Cai DG, Lou BG, Oelmuller R, Yeh KW (2011) Growth promotion of *Chinese cabbage* and *Arabidopsis* by *Piriformospora indica* is not stimulated by mycelium-synthesized auxin. *Mol Plant-Microbe Interact* 24: 421-431
- Lee SC, Luan S (2012) ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ* 35(1): 53-60
- Lery LM, Hemerly AS, Nogueira EM, Von Kreuger WM, Bisch PM (2011) Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol Plant-Microbe Interact* 24: 562–576
- Leyser O (2006) Dynamic integration of auxin transport and signaling. *Curr Biol* 16: 424–433
- Li HY, Wei DQ, Shen M, Zhou ZP (2012) Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Divers* 54(1): 11-18
- Li R, MacRae IC (1992). Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. *Soil Biol Biochem* 24(5): 413-419
- Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defense - the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10: 466–472
- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay, M, Van der Lelie D (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci* 21: 583-606

- Logeshwaran P, Thangaraju M, Rajasundari K (2009) Hydroxamate siderophores of endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane roots. *Aust J Basic Appl Sci* 3: 3564-3567
- Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT (2008) Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One* 3: e2702
- Lugtenberg BJ, Malfanova N, Kamilova F, Berg G (2013) Plant growth promotion by microbes. *Mol Microb Ecol Rhizo* 2: 561-573
- Luna MF, Galar ML, Aprea J, Molinari ML, Boiardi JL (2010) Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnol Lett* 32(8): 1071–1076
- Ma JF (2005) Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Crit Rev Plant Sci* 24(4): 267–281
- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H (2011) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotech Adv* 29(2): 248-258
- Macmillan J (2001) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *Plant Growth Regulation* 20: 387–442
- Madhaiyan M, Saravanan VS, Jovi DBSS, Lee H, Thenmozhi R, Hari K, Sa T (2004) Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiol Res* 159(3): 233–243
- Malfanova N, Kamilova F, Validov S, Shcherbakov A, Chebotar V, Tikhonovich I, Lugtenberg B (2011) Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microb Biotech* 4: 523-532

- Mandyam KG, Roe J, Jumpponen A (2013) *Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. *Fungal Biol* 117(4): 250-260
- Mandyam K, Jumpponen A (2014) Unraveling the dark septate endophyte functions: insights from the *Arabidopsis* model. *Advances in Endophytic Research*. Springer, India: 115-141
- Mastretta C, Taghavi S, Van Der Lelie D, Mengoni A, Galardi F, Gonnelli C, Barac T, Boulet J, Weyens N, Vangronsveld J (2009) Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int J Phytorem* 11: 251–267
- Matiru V, Thomson J (1998) Can *Acetobacter diazotrophicus* be used as a growth promoter for coffee, tea, and banana plants? in *Proceedings of the 8th Congress of the African Association of Biological Nitrogen Fixation*: 129–130
- Mauch-Mani B, Mauch F (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8: 409–414
- Medeiros AFA, Polidoro JC, Reis VM (2006) Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum spp.*). *Plant Soil* 279(1-2): 141–152
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682
- Melnick R, Zidack N, Bailey B, Maximova S, Gultinan M, Backman P (2008) Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biol Control* 46: 46-56

- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126(5): 969-980
- Mendez MO, Maier RM (2008) Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Rev Environ Sci Biotechnol* 7: 47–59
- Meneses CHSG, Rouws LFM, Simões-Araújo JL, Vidal MS, Baldani JI. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol Plant-Microbe Interact* 24(12): 1448–1458
- Mitchell-Olds T (2001) *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16(12): 693-700.
- Mithöfer A (2002) Suppression of plant defence in rhizobia–legume symbiosis. *Trends in Plant Science* 7: 1-10
- Monteiro RA, Balsanelli E, Wasseem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schmidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankievicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM (2012) *Herbaspirillum*–plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil* 356: 175–196
- Muday GK, Rahman A, Binder BM (2012) Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends Plant Sci* 17(4): 181–195
- Muthukumarasamy R, Cleenwerck I, Revathi G, Vadivelu M, Janssens D, Hoste B, Gum KU, Park K, Son CY, Sa T, Caballero-Mellado J (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst Appl Microbiol* 28(3): 277–286
- Muthukumarasamy R, Revathi G, Loganathan P (2002) Effect of inorganic N on the population, in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant Soil* 243: 91–102

- Mur LA, Prats E, Pierre S, Hall MA, Hebelstrup KH (2013) Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Front Plant Sci* 4(215): 1-7
- Nakashita H (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* 33: 887–898
- Narvaez-Vasquez J, Ryan CA (2004) The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* 218: 360–369
- Navarro LA (2005) Plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436–439
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, Harberd NP, Jones JD (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* 18: 650–655
- Niebel FC, Lescure N, Cullimore JV, Gamas P (1998) The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11(6): 504-513
- Nieto-Peñalver CG, Savino MJ, Bertini EV, Sánchez LA, de Figueroa LI (2014) Gluconic acid produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 possesses antimicrobial properties. *Res Microbiol* 165(7): 549-558
- Nongbri P, Johnson JM, Sherameti I, Glawischnig E, Halkier B, Oelmüller R (2012) Indole-3-acetaldoxime-derived compounds restrict root colonization in the beneficial interaction between *Arabidopsis* roots and the endophyte *Piriformospora indica*. *Mol Plant-Microbe Interact* 25:1186-1197

- Norman-Setterblad C, Vidal S, Palva ET (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13: 430-438
- O'Callaghan KJ, Dixon RA, Cocking EC (2001) *Arabidopsis thaliana*: a model for studies of colonization by non-pathogenic and plant-growth-promoting rhizobacteria. *Aust J Plant Physiol* 28: 975–982
- Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Rev Microbiol* 11: 252–263
- Page DR, Grossniklaus U (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Rev Genet* 3(2): 124-136
- Palacios OA, Bashan Y, de-Bashan LE (2014) Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria - an overview. *Biol Fert Soils* 50(3): 415-432
- Paponov I, Paponov M, Teale W, Menges M, Chkrabortee S, Murray J, Palme K (2008) Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 1(2): 321–337
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68: 3795
- Paula MA, Reis VM, Döbereiner J (1991) Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol Fert Soils* 11(2): 111–115
- Pedrosa FO, Monteiro RA, Wassem R, Cruz LM, Ayub RA, Colauto NB, Fernandez MA, Fungaro MHP, Grisard EC, Hungria M, Madeira HMF, Nodari RO, Osaku CA, Petzl-Erler ML, Terenzi H, Vieira LGE, Steffens MBR, Weiss VA, Pereira LFP,

Almeida MIM, Alves LR, Marin A, Araujo LM, Balsanelli E, Baura VA, Chubatsu LS, Faoro H, Favetti A, Friedermann G, Glienke C, Karp S, Kava-Cordeiro V, Raittz RT, Ramos HJO, Ribeiro EMSF, Rigo LU, Rocha SN, Schwab S, Silva AG, Souza EM, Tadra-Sfeir MZ, Torres RA, Dabul ANG, Soares MAM, Gasques LS, Gimenes CCT, Valle JS, Ciferri RR, Correa LC, Murace NK, Pamphile JA, Patussi EV, Prioli AJ, Prioli SMA, Rocha CLMSC, Arantes OMN, Furlaneto MC, Godoy LP, Oliveira CEC, Satori D, Vilas-Boas LA, Watanabe MAE, Dambros BP, Guerra MP, Mathioni SM, Santos KL, Steindel M, Vernal J, Barcellos FG, Campo RJ, Chueire LMO, Nicolás MF, Pereira-Ferrari L, da Conceição Silva JL, Gioppo NMR, Margarido VP, Menck-Soares MA, Pinto FGS, Simão RCG, Takahashi EK, Yates MG, Souza EM (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. PLoS Genet 7: e1002064

Pereira P, Ibáñez F, Rosenblueth M, Etcheverry M, Martínez-Romero E (2011) Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture independent methods. ISRN Ecol 2011: 1-10

Perotti R (1926) On the limits of biological enquiry in soil science. Proc Int Soc Soil Sci 2: 146-161

Phillips DA, Torrey JG (1972) Studies on cytokinin production by *Rhizobium*. Plant Physiol 49: 11–15

Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. Annu Rev Phytopathol 52: 347-375

Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van Der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature 5(5): 308-316

Pieterse CMJ (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. Plant Cell 10: 1571–1580

- Piñón D, Casas M, Blanch M, Fontaniella B, Blanco Y, Vicente C, Solas, MT, Legaz ME (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. Res Microbiol 153(6): 345-351
- Pliego C, Kamilova F, Lugtenberg B (2011) Plant growth-promoting bacteria: fundamentals and exploitation. In Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems. Springer Berlin Heidelberg: 295-343
- Potters G (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? Trends Plant Sci 12: 98–105
- Pozo MJ, Van Der Ent S, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2008) Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. New Phytopathol 180: 511–523
- Pozo MJ, Van Loon IC, Pieterse CMJ (2004) Jasmonates—signals in plant-microbe interactions. J Plant Growth Regul 23: 211–222
- Puehringer S, Metlitzky M, Schwarzenbacher R (2008) The pyrroquinoline quinine biosynthesis pathway revisited: a structural approach. BMC Biochem 9(1): 8
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moënne-Loccoz Y (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant Soil 321: 341-361
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends Biotechnol 28(3): 142-149

- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R. (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot* 20(1): 1-11
- Reading NC, Sperandio V (2006) Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett*: 254(1) 1-11
- Reinhold-Hurek B Hurek T (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol* 6: 139–144
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* 14: 435–443
- Reinhold-Hurek B, Maes T, Gemmer S, Van Montagu M, Hurek T (2006) An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol Plant-Microbe Interact* 19: 181-188
- Reis VM, Döbereiner J (1998) Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* 171(1): 13-18
- Reissinger, A, Vilich V, Sikora RA (2001) Detection of fungi in planta: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol Res* 105: 563-566
- Richardson AE (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Funct Plant Biol* 28(9): 897–906
- Riggs PJ, Chelius MK, Iniguez AL, Kaeppler SM, Triplett EW (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust J Plant Physiol* 28(9): 829–836

- Robert-Seilaniantz A (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* 10: 372–379
- Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17(4-5): 319–339
- Rodríguez H, Gonzalez T, Selman G (2000) Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J Biotechnol* 84:155–161
- Rodríguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91(11): 552–555
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19: 827–837
- Rouws LFM, Meneses CHSG, Guedes HV, Vidal MS, Baldani JI, Schwab S (2010) Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. *Lett Appl Microbiol* 51(3): 325–330
- Rouws LFM, Hemerly A, Baldani J (2006) Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 pela técnica de eletroporação. Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, Van Der Lelie D, Dow JM (2009) The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7: 514-525
- Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chem Biol* 5: 301-307

- Sará-Páez M, Contreras-Zentella M, Gómez-Manzo S, González-Valdez AA, Gasca-Licea R, Mendoza-Hernández G, Escamilla JE, Reyes-Vivas H (2015) Purification and characterization of the membrane-bound quinoprotein glucose dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Protein J* 34(1): 48-59
- Sarathambal C, Thangaraju M, Paulraj C, Gomathy M (2010) Assessing the Zinc solubilization ability of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in maize rhizosphere using labelled 65Zn compounds. *Indian J Microbiol* 50: S103–S109
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa TM (2007) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microb Ecol* 55: 130-140
- Saravanan VS, Kalaiarasan P, Madhaiyan M, Thangaraju M (2007) Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Lett Appl Microbiol* 44(3): 235–241
- Schillmiller AL, Howe GA (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* 8: 369–377
- Schwessinger B, Bart R, Krasileva KV, Coaker G (2015) Focus issue on plant immunity: from model systems to crop species. *Front Plant Sci* 6(195): 1-3
- Sessitsch A, Hardoim P, Doring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, Van Overbeek L, Brar D, Van Elsas JD, Reinhold-Hurek B (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Mol Plant-Microbe Interact* 25: 28-36

- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains. *Mol Plant-Microbe Interact* 14(3): 358–366
- Sevilla M, Lee S, Brockschneider D, de Oliveira A, Baldani JI, Kennedy C (1997) Studies on *Acetobacter diazotrophicus*: analysis of *nif* and related genes and contributions to sugarcane nutrition. In 11th International Congress on Nitrogen Fixation. Abstract L130.
- Sgroy V, Cassán F, Masciarelli O, Del Papa MF, Lagares A, Luna V (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotech* 85: 371–81
- Shah J, Zeier J (2013) Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Front Plant Sci* 4:30
- Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nurnberger T, Martin GB, Sheen J (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* 4: 17–27
- Sharma A, Johri BN, Sharma AK, Glick BR (2003) Plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp., strain GFP(3) influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biol Biochem* 35(7): 887–894
- Shi SJ, Richardson AE, O’Callaghan M, DeAngelis KM, Jones EE, Stewart A, Firestone MK, Condon LM (2011) Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 77: 600-610

- Siemens J, Keller I, Sarx J (2006) Transcriptome analysis of Arabidopsis clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Mol Plant-Microbe Interact* 19: 480–494
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30: 205–240
- Somerville C, Koornneef M (2002) A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nature Rev Genet* 3(11): 883-889
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31(4): 425–448
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defences against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18842–18847
- Stüeken EE, Buick R, Guy BM, Koehler MC (2015) Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. *Nature* 520: 666-669
- Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(4): 491-502.
- Survase SA, Bajaj IB, Singhal RS (2006) Biotechnological production of vitamins. *Food Technol Biotech* 44: 381–396
- Suzuki T, Shimizu M, Meguro A, Hasegawa S, Nishimura T, Kunoh H (2005) Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. *Actinomycetologica* 19: 7–12
- Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, Van Der Lelie D (2009) Genome survey and characterization of

- endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl Environ Microbiol* 75: 748-757
- Taghavi S, Van Der Lelie D, Hoffman A, Zhang Y-B, Walla MD, Vangronsveld J, Newman L, Monchy S (2010) Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet* 6(5): e1000943
- Tao GC, Tian SJ, Cai MY, Xie GH (2008) Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils for the Returned Overseas Chinese Scholars, the Ministry of Education of the P.R. China. *Pedosphere* 18(4): 515–523
- Tapia-Hernández A., Bustillos-Cristales MR, Jiménez-Salgado T, Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramírez LE (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb Ecol* 39(1): 49–55
- Tkacz A, Poole P (2015) Role of root microbiota in plant productivity. *J Exp Bot* 66(8): 2167-2175.
- Troncoso-Ponce, MA, Nikovics K, Marchive C, Lepiniec L, Baud S (2015) New insights on the organization and regulation of the fatty acid biosynthetic network in the model higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochimie* 1-6
- Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AI (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol* 42(2): 117–126
- Turner TR, James EK, Poole PS (2013) The plant microbiome. *Genome Biol* 14(11): 1-10
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyojuka J, Yamaguchi s (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195–200

- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135–162
- Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119(3): 243-254
- Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 11: 184–191
- Van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36: 453–483
- Van Zyl LJ, Schubert WD, Tuffin MI, Cowan DA (2014) Structure and functional characterization of pyruvate decarboxylase from *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *BMC Struct Biol* 14(21): 1-13
- Vance CP (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol* 127: 390–397
- Vargas L, Santa Brígida AB, Mota Filho JP, de Carvalho TG, Rojas CA, Vaneechoutte D, Bel MV, Farrinelli R, Cavalcante PCG, Vandepoele K, Hemerly AS (2014) Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. *PLoS One* 9(12): 1-44
- Velázquez-Hernández ML, Baizabal-Aguirre VM, Cruz-Vázquez F, Trejo-Contreras MJ, Fuentes-Ramírez LE, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ (2011) *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Arch Microbiol* 193: 137–149
- Verhage A, Van Wees CMS, Pieterse CMJ (2010) Plant Immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol* 154: 536–540

- Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91: 127–141
- Vessey JK, Pan B (2003) Living a grounded life: growth and nitrogenase activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* on solid media in response to culture conditions. *Symbiosis* 35(1–3): 181–197
- Vinagre F, Vargas C, Schwarcz K, Cavalcante J, Nogueira EM, Baldani, JI, Ferreira PCG, Hemerly AS (2006) SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *J Exp Bot* 57(3): 559-569
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47: 177–206
- Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Hendrickson AC, Dong X (2007) Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* 17: 1784-1790
- Weilharter A, Mitter B, Shin MV, Chain PSG, Nowak J, Sessitsch A (2011) Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *J Bacteriol* 193: 3383-3384
- Wenbo M, Kelly Z, Glick BR (2001) Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiol Ecol* 35(2): 137-144
- Weyens N, Truyens S, Dupae J, Newman L, Taghavi S, Lelie D, Carleer R, Vangronsveld J (2010) Potential of the TCE degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environ Pollut* 158: 2915–2919

- Weyens N, Van Der Lelie D, Taghavi S, Newman L, Vangronsveld J (2009) Exploiting plant–microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends Biotechnol* 27(10): 591-598
- Weyens N, Van Der Lelie D, Taghavi S, Vangronsveld J (2009b) Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. *Curr. Opin. Biotechnol* 20: 248–254
- Wilson D (1995) Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274-276
- Yamada Y, Hoshino KI, Ishikawa T (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci Biotechnol Bioche* 61(8): 1244–1251
- Yamada T (1993) The role of auxin in plant-disease development. *Annu Rev Phytopathol* 31: 253–273
- Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* 14: 1-4
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Maruyama-Nakashita A, Kudo T, Shinozaki K, Yoshida S, Nakashita H (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 1678-1692
- Youssef HH, Fayez M, Monib M, Hegazi N (2004) *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biol Fert Soils* 39(6): 391–397

- Zakria M, Njoloma J, Saeki Y, Akao S (2007) Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 gfp1 and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. *Microbes Environ* 22: 197-206
- Zamioudis C, Pieterse CMJ (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant-Microbe Interact* 25(2): 139–150
- Zhang J, Elo A, Helariutta Y (2011) *Arabidopsis* as a model for wood formation. *Curr Opin Biotechnol* 22: 293–299
- Zhang Y, He L, Chen Z, Zhang W, Wang Q, Qian M, Sheng X (2011) Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape. *J Hazard Mater* 186: 1720–1725
- Zipfel C (2013) Combined roles of ethylene and endogenous peptides in regulating plant immunity and growth. *Proc Natl Acad Sci* 110(15): 5748-5749

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem por objetivo geral estudar o efeito da inoculação de *Arabidopsis thaliana* com *Gluconacetobacter diazotrophicus* no âmbito da promoção do crescimento, obtendo um sistema modelo, a fim de analisar a regulação da expressão gênica e a participação das vias hormonais e de defesa durante a interação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudar o efeito da inoculação de *A. thaliana* selvagem com *G. diazotrophicus* PAL5 no âmbito da promoção do crescimento vegetal;
- ✓ Estudar o efeito da inoculação de *A. thaliana* selvagem com *G. diazotrophicus* PAL5 na eficiência fotossintética e na eficiência de uso da água pela planta.
- ✓ Quantificar a população bacteriana bem como sua localização nos tecidos de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus*.
- ✓ Realizar análise transcritômica de raízes e folhas de plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* através de sequenciamento de RNA mensageiro total (*RNAseq*);
- ✓ Estudar os conjuntos gênicos regulados em tecidos radiculares e folhas, mediante análise dos principais transcritos induzidos e reprimidos ao longo da interação;
- ✓ Identificar os principais genes relacionados com as vias hormonais e de defesa vegetal induzido após a inoculação de *A. thaliana* com *G. diazotrophicus* PAL5;
- ✓ Avaliar o efeito de mutações nas vias de produção e percepção dos hormônios de *A. thaliana* sobre a suscetibilidade a colonização/promoção do crescimento induzida por *G. diazotrophicus* PAL5.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DA TESE

Os resultados desta tese estão apresentados em dois capítulos.

O capítulo I se refere ao artigo intitulado “Endophytic colonization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in *Arabidopsis thaliana* and its effect on plant growth promotion, plant physiology and activation of plant-defense”, publicado pela revista *Plant and Soil*.

O capítulo II se refere ao artigo a ser submetido posteriormente, intitulado "Participação das vias hormonais na promoção do crescimento e ativação do mecanismo de defesa vegetal de *Arabidopsis thaliana* durante interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5".

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO I:

Endophytic colonization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in *Arabidopsis thaliana* and its effect on plant growth promotion, plant physiology and activation of plant-defense

Endophytic colonization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in *Arabidopsis thaliana* and its effect on plant growth promotion, plant physiology and activation of plant-defense

A.L.S. Rangel de Souza, S.A. de Souza, M.V.V. de Oliveira, T.M. Ferraz, F.A.M.M.A. Figueiredo, N.D. da Silva, P.L. Rangel, C.R.S. Panisset, F.L. Olivares, E. Campostrini, and G.A. de Souza Filho

A.L.S. Rangel de Souza, S.A. de Souza, M.V.V. de Oliveira, N.D. da Silva, P.L. Rangel, C.R.S. Panisset and G.A. de Souza Filho

Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

T.M. Ferraz, F.A.M.M.A. Figueiredo and E. Campostrini

Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

F.L. Olivares

Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding Author: Prof. Gonçalo Apolinario de Souza Filho; goncalos@uenf.br

ABSTRACT

Background and Aims

Gluconacetobacter diazotrophicus is a plant growth-promoting bacteria (PGPB) that colonizes several plant species. Here, we studied the internal colonization of *Arabidopsis thaliana* tissues by *G. diazotrophicus* and analyzed its effects on physiology, growth and activation of plant immune system during such association.

Methods

A. thaliana seedlings were inoculated with *G. diazotrophicus* and grown in substrate for 50 days. Effects on plant growth were estimated by quantifying number of leaves, leaf area, fresh and dry weight. Endophytic bacterial population was determined by colony forming unit (CFU), and its location in plant tissues was assayed by epifluorescence microscopy of red fluorescent protein-labeled bacterium. Whole canopy gas exchange (photosynthesis and transpiration) was determined using a portable photosynthesis system.

Results

G. diazotrophicus efficiently promoted *A. thaliana* plant growth at 50 days after inoculation. Inoculated plants showed higher whole canopy photosynthesis, lower whole plant transpiration and increased water use efficiency. The bacterium colonized preferentially root xylem. The inoculation of plants defective in SAR-associated defense revealed that plant immune system plays an important role during the early association stages.

Conclusions

G. diazotrophicus endophytically colonizes *A. thaliana* roots, promotes plant growth and increases whole canopy photosynthesis. Our results indicate that *A. thaliana* is useful for molecular studies of the mechanisms involved in the interaction between plants and PGPB, especially those involving to *G. diazotrophicus*.

KEYWORDS

PGPB, endophytic bacteria, BNF, plant defense, plant immunity, *G.diazotrophicus*

INTRODUCTION

The massive use of chemical fertilizers in agriculture constitutes a major component of production costs and represents a significant source of environmental contamination reaching groundwater resources, lakes and rivers (Kummu et al. 2012; Savci 2012). A promising alternative for chemical fertilizers is the use of biological processes such as plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculation, which improve plant performance and operate via a multitude of physiological, molecular and biochemical pathways (Palacios et al. 2014). The benefits of PGPB to host plants include biological nitrogen fixation; phosphorus, potassium and zinc solubilization; phytohormone production; modulation of pathogen activity; and vitamin production (Hardoim et al. 2008; Berg 2009; Burgess et al. 2009; Compant et al. 2010).

Beneficial plant-microbe associations require mutual recognition and high degree of coordination of plant immune responses (Harrison 2005; Zamioudis and Pieterse 2012; Pieterse et al. 2014). Because plants do not have specialized immune cells, balancing growth and defense is critical for their survival (Fu and Dong 2013). In addition, plant hormones play a central role because they act as signal molecules regulating different processes such as plant growth (Pieterse et al. 2012). The importance of salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) as primary signals in the regulation of the plant's immune response is well established (Pieterse and Dicke 2007; Pieterse et al. 2009).

Gluconacetobacter diazotrophicus is an endophytic PGPB first isolated from sugarcane (Cavalcante and Döbereiner 1988; Gillis et al. 1989; Li and MacRae 1992; Reis et al. 1994). Further studies have demonstrated that this microorganism colonizes several other plant species such as tea, banana (Matiru and Thomson 1998), pineapple (Tapia-Hernández et al. 2000) and wetland rice (Muthukumarasamy et al. 2005), as well as dicot species such as coffee (Jimenez-Salgado et al. 1997), sweet potato (Paula et al. 1991), carrot, radish and beet (Madhaiyan et al. 2004). PGPB provide beneficial characteristics which includes biological nitrogen fixation (Anitha and Thangaraju 2010; Meenakshisundaram and Santhaguru 2010), phosphorus and zinc solubilization (Madhaiyan et al. 2004; Saravanan et al. 2007), plant pathogen control (Muthukumarasamy et al. 2000; Piñón et al. 2002; Blanco et al. 2005; Mehnaz and Lazarovits 2006), and production of plant growth-regulating hormones such as auxins (Fuentes-Ramírez et al. 1993; Bastián et al. 1998; Lee et al. 2004; Anitha and Thangaraju 2010) and gibberellins (Bastián et al. 1998).

G. diazotrophicus has been isolated from sugarcane leaf and root tissues (James et al. 1994; Fuentes-Ramírez et al. 1999) and its ability to promote sugarcane growth has been characterized by several researches (Fuentes-Ramírez et al. 1993; Caballero-Mellado and Martínez-Romero 1994; Fuentes-Ramírez et al. 1999; Oliveira et al. 2002; Baldani et al. 2002; Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado 2003; Saravanan et al. 2007). This bacterium colonizes root apoplast (Sevilla et al. 1997), xylem vessels (James et al. 1994), protoxylem and the xylem parenchyma (James et al. 2001).

Despite available knowledge of the sugarcane and *G. diazotrophicus* interaction, data detailing molecular aspects involved in plant growth promotion by this bacterium is scarce (Cavalcante et al. 2007; Meneses et al. 2011; Serrato et al. 2013). Endophytic colonization mechanisms and signaling pathways involved from initial contact between plant and microorganism to endophytic establishment have been partially elucidated. Gene expression studies have shown that the receptor kinase SHR5 is involved in N₂ fixation in plant-endophytic bacteria associations (Vinagre et al. 2006). Additionally, quantitative proteomic and transcriptomic analysis of the interaction between sugarcane and *G. diazotrophicus* have provided insight into the early signaling and initial molecular events that may trigger the increased drought tolerance observed in the host plant (Lery et al. 2011; Vargas et al. 2014). Glutathione reductase and bacterial superoxide dismutase are known to be crucial for the colonization of rice by *G. diazotrophicus* (Alquéres et al. 2013). However, the role of plant defense response and hormonal pathways in this plant-endophyte interaction remain largely unknown (Zamioudis and Pieterse 2012). Genome complexity, long life cycle of host plants, and the difficulty of growing in a controlled environment are some of the main limitations for knowledge progress in this area. Additionally, the lacks of host specie with a wide range of mutants or transgenic lines also hinder the genetic and molecular characterization of this interaction.

Arabidopsis thaliana is a widely used plant species for plant biology studies, including investigation on the interaction between plants and microorganisms (O'Callaghan et al. 2001; Koornneef and Meinke 2010). The main advantages that justify the use of *A. thaliana* are the small size, ease of cultivation, fast life cycle, prolific seed production, extensive genomic knowledge and wide range of available mutant lines (Wang et al. 2005; Cocking et al. 2006). Several studies on plant-bacteria interactions have been carried out using *A. thaliana* (Dodds and Rathjen 2010; Maclean et al. 2011; Ouibrahim and Caranta 2013; Windram et al. 2014). Furthermore, *A. thaliana* has also

been used in molecular studies involving the association between plants and beneficial microorganisms and its effect on growth promotion (Verhagen et al. 2004; Wang et al. 2005). Advancing the knowledge on the molecular and genetic basis of plant-beneficial microbe communication will be highly instrumental for the development of sustainable future crops (Pieterse et al. 2014).

This work aimed to investigate the ability of *G. diazotrophicus* to endophytically colonize *A. thaliana* tissue. Thus, we analyzed the effects of the interaction in promoting growth and development during the life cycle of the plant. We also verified the location of the bacteria in the root tissue at 1 and 50 days after inoculation. In addition, using a transgenic line, we analyzed the activation of *A. thaliana* defense responses during the plant-bacteria association and its influence on plant growth during the early stages of interaction.

MATERIAL AND METHODS

- **Bacterial strains**

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 was obtained from Culture Collection of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil).

The kanamycin-resistant *G. diazotrophicus* strain (GD-Kan) contains the Tn5 < R6Kyori/KAN-2 transposon insertion in an intergenic region of the genome, and was obtained by screening an insertion transposon library (Intorne et al. 2009).

DsRed Fluorescent Protein-labeled *G. diazotrophicus* (GD-F) was obtained by electroporation with DsRed-pDE1001 plasmid. This plasmid was generated by digesting the DsRed-pAA100 plasmid (Denecke et al. 1992) with EcoRI restriction enzyme (single cut) and ligating it to the pDE1001 plasmid (Aertsen et al. 2008), digested with the same enzyme. The ligation product was electroporated into *E. coli* DH5 α . Red fluorescent colonies containing the fused plasmid were grown in LB medium amended with ampicillin (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for plasmid extraction. The obtained plasmid was electroporated into *G. diazotrophicus* and positive colonies were selected on streptomycin-containing medium

(Intorne et al. 2009). Red fluorescence was confirmed using a DarkReader® Transilluminator DR-45M (Dark Reader – Clare Chemical Research).

- **Bacterial culture conditions**

Isolated colonies of *G. diazotrophicus* strain PAL 5 (GD-Kan, GD-F and wild-type) were grown in DYGS medium (g L⁻¹ composition): glucose 2.0, yeast extract 2.0, peptone 1.5, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5 and glutamic acid 1.5 (Rodrigues Neto et al. 1986) at 30 °C and 180 rpm (Cavalcante and Döbereiner 1988). Kanamycin (50 µg mL⁻¹) was added to the medium for cultivation of the kanamycin-resistant *G. diazotrophicus* strain, GD-Kan. Kanamycin and streptomycin (50 µg mL⁻¹) were added to the medium for cultivation of the DsRed Fluorescent Protein-labeled strain, GD-F.

- **Plant material and growth conditions**

Seeds of wild-type *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0) and *NahG* transgenic line (Defective in defense by expressing the bacterial salicylate hydroxylase gene, *NahG*) (Delaney et al. 1994) were kindly provided by Dr. Frederick Ausubel (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). The seeds were germinated on Petri dishes containing half-strength Murashige and Skoog (MS) medium with 0.5% sucrose and 0.05% MES buffer for 7 days. *A. thaliana* seedlings were transferred into pots containing West Garden commercial substrate and were irrigated with 25% Hoagland solution (Hoagland and Arnon 1950) every two days for 50 days. Seed germination and cultivation of plants occurred at 23 °C, 60% relative humidity, 70 µmol m⁻² s⁻¹ light (12h photoperiod).

- **Inoculation and colonization assays**

G. diazotrophicus strain PAL 5 (GD-Kan, GD-F and wild-type) were cultivated in liquid DYGS media and centrifuged at 12,000 *g*. After discarding the supernatant, the cells were washed twice in ultrapure sterile water. The cells were suspended in sterile water to a final OD₆₀₀ of 0.01 [equivalent to 1 x 10⁶ colony forming units (CFU) mL⁻¹]. Twenty mL of inoculum were applied to the Petri dishes containing seven-day-old *A. thaliana* seedlings, previously germinated and cultivated in half-strength Murashige and

Skoog (MS) medium. The same amount of ultrapure sterile water was applied to the non-inoculated seedlings, as control. After 3h incubation, the bacterial suspension was replaced by sterile water. Then, the seedlings were transferred to pots containing West Garden commercial substrate and cultivated as previously described.

- **Anatomical and morphological analyses**

The number of rosette leaves was counted and total fresh and dry weight of shoot and root parts was determined. Fresh weight was measured using a precision scale immediately after collection. The material was oven dried at 60 °C for 24 h and dry weight was determined. Twenty plants from each treatment were used for these analyses. *G. diazotrophicus* PAL5 colonization effect on *A. thaliana* plant-growth was assessed at 28 and 50 days after inoculation. Moreover, leaf area was measured using a leaf area meter (LI-3100C, Licor, USA).

- **Gas exchange measurements**

Whole canopy photosynthesis (A , $\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and transpiration (E , $\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) levels were determined using a whole-plant *A. thaliana* (WPA) chamber attached to a LI-6400 portable photosynthesis system (model 6400-17, LI-COR, Lincoln, NE, USA). Gas exchange was measured at approximately 400 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ concentration within the chamber (supplied by CO_2 cartridges, Li-6400 CO_2 injector), at 24.26 ± 0.08 °C, 2 ± 0.02 kPa vapor pressure deficit, and $40 \pm 0.87\%$ relative humidity using a Licor 6400 System (Licor, Lincoln, NE, USA). The CO_2 soil flux was suppressed by sealing the top of the medium with a 4–5mm thick layer of standard pottery clay. A 5–8mm hole was made in the center of the clay disk through which seeds were planted. As the plant grew, the hole was occluded to suppress any CO_2 soil flux from the planting medium. Leaf area was large enough to provide a good ΔCO_2 to measure photosynthesis with low self-shading by leaves. To normalize values for differences in leaf size and number, the gas exchange parameters are reported per leaf area. The whole-plant photosynthesis and transpiration measurements were performed between 09:00 and 10:00 am. The photosynthetically active radiation (PAR) was of $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and CO_2 concentration at $400 \mu\text{L L}^{-1}$. Whole canopy instantaneous water-use efficiency (wciWUE) was estimated by the ratio between net photosynthetic rate ($\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and transpiration rate ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (A/E). Ten plants per treatment were used in gas exchange analyses.

- **Epifluorescence microscopy analysis**

Five plants of the same size, at 1 and 50 days post inoculation (dpi), were chosen for epifluorescence microscopy analysis. At 1 dpi the total root was analyzed. At 50 dpi regions of 3.0 cm in length, taken at an intermediate point of the root (3 cm from root tip) were analyzed. The material was carefully washed and slides were prepared for observation. The samples were examined under a epifluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200; Carl Zeiss, Jena, Germany) coupled to a digital recording system and green light excitation (568 nm; 640 ± 60 nm emission filter) to visualize the DsRed Fluorescent Protein-labeled bacteria.

- **Determination of microbial population in plant tissues**

Colonization analyses were conducted at 14 and 28 days post inoculation, using the total amount of roots and shoots. At 50 dpi, due to the size of the plant, two leaf disks/plant (0.5 cm diameter) and 1.0 cm length root sections/plant (3 cm from the root tip) were used for CFU analysis. Ten plants per treatment were used. Leaf samples were surface disinfected by immersion in 70% ethanol for 3 min and rinsed 3 times in ultrapure sterile water. Roots were removed from the pots and washed with ultrapure water. Washed roots were immersed in 1% chloramine-T for 1 min and rinsed 3 times in ultrapure sterile water. The samples were then macerated in ultrapure sterile water and serially diluted. Subsequently, samples were plated on solid LGI-P medium (Cavalcante and Döbereiner 1988; Reis et al. 1994) containing (in g L⁻¹): sucrose, 100.0; K₂HPO₄, 0.2; KH₂PO₄, 0.6; MgSO₄.7H₂O, 0.2; CaCl₂.2H₂O, 0.2; Na₂MoO₄.H₂O, 0.002; FeCl₃.6H₂O, 0.01; 5.0 mL 0.5% bromothymol blue in 0.2 M KOH; 15.0 agar and pH adjusted to 5.5. Kanamycin (50 µg.mL⁻¹) was added to the medium when *G. diazotrophicus* Gd-Kan strain was used. Kanamycin (50 µg.mL⁻¹) and streptomycin antibiotics (50 µg.mL⁻¹) were added to medium when DsRed Fluorescent Protein-labeled *G. diazotrophicus* was used for inoculation. Plates were kept at 28 °C for 4 days.

- **Statistical analysis**

Data were analyzed through variance analysis (ANOVA) and Tukey test was applied to assess significance of group comparisons at 5% probability level. The analyses were performed used Assistat 7.0 Beta software.

RESULTS

Gluconacetobacter diazotrophicus colonizes and promotes the growth of *Arabidopsis thaliana*

Endophytic population analyses by colony forming units (CFU), plant growth-promoting experiments and whole canopy gas exchange measurement used a kanamycin-resistant *G. diazotrophicus* strain (GD-Kan). Red Fluorescent Protein-expressing *G. diazotrophicus* (GD-F) was used for fluorescence microscopy assays. Comparative analysis between GD-Kan, GD-F and wild-type *G. diazotrophicus* PAL5 revealed that all strains behave similarly, as evidenced by their comparable growth curves and resistance to stress (data not shown). Similar effects were detected during interaction with plants and equivalent bacterial concentrations were found within root tissue via colonization tests (Fig. S1). Based on these results, a set of plants was inoculated with strain GD-F for microscopy analysis and another set with strain GD-Kan for all other assays.

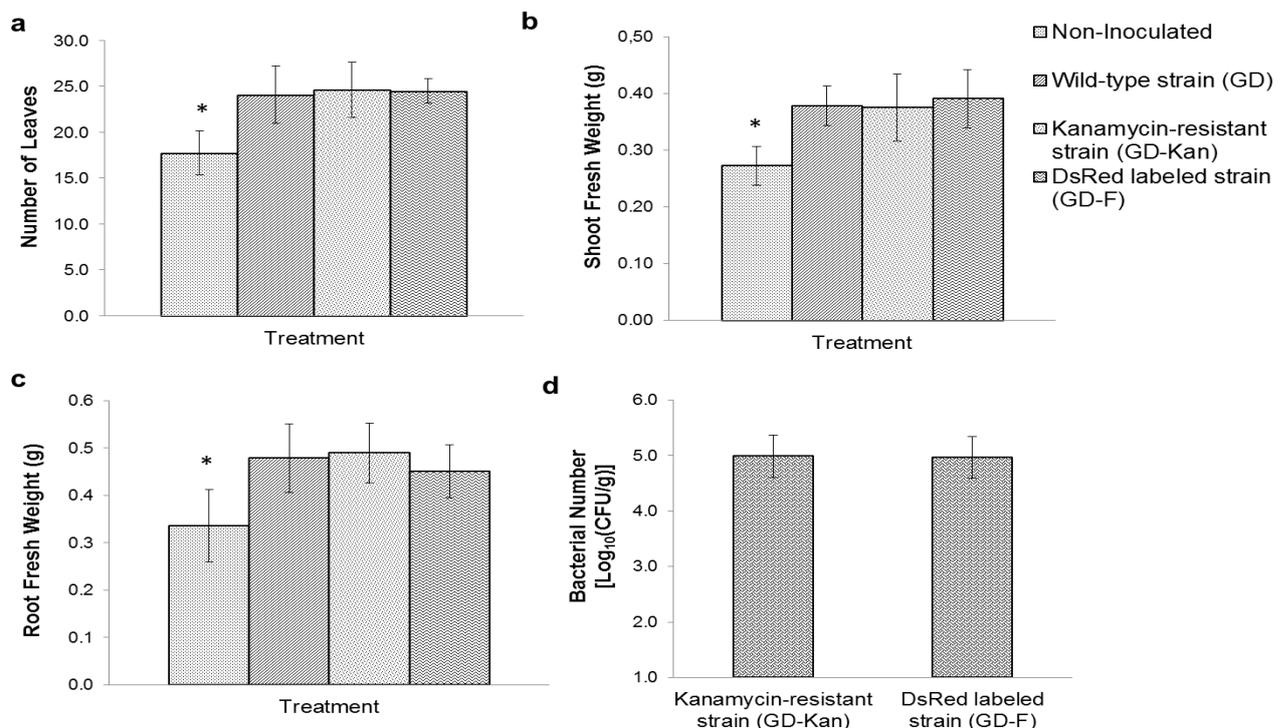


Fig. S1 Comparison of growth promotion by *G. diazotrophicus* PAL5 strains in *A. thaliana* plants. Seven day old wild-type (Col-0) plants were inoculated with *G. diazotrophicus* PAL5 wild-type, kanamycin-resistant strain (GD-Kan) and DsRed-expressing strain (GD-F) at a concentration of 10^6 CFU mL⁻¹. The number of leaves (a), fresh weight of aerial (b) and root parts (c) and the number of bacteria in inoculated roots (d) were determined 50 days post-inoculation (dpi). Twenty plants from each treatment were used for this analysis. These experiments were repeated three times with similar results. Error bars represent the standard deviation. Significant differences between treatments are represented by * (ANOVA, p < 0.05).

Anatomical and morphological analyses of both shoot and roots revealed that *G. diazotrophicus* PAL5 promotes growth of *A. thaliana* plants (Fig. 1a and b). At 50 dpi, *G. diazotrophicus*-inoculated plants showed higher shoot and root weight values than non-inoculated ones. Shoot and root fresh weight showed an increase of 22.6% and 35.9%, respectively, for inoculated plants (Fig. 1c). Interestingly, at 28 dpi, inoculation was observed to cause growth inhibition in *A. thaliana* (Fig. 1a). At this stage, shoot and root weight showed a reduction of 56.2% and 41.4%, respectively, for inoculated plants (Fig. 1c).

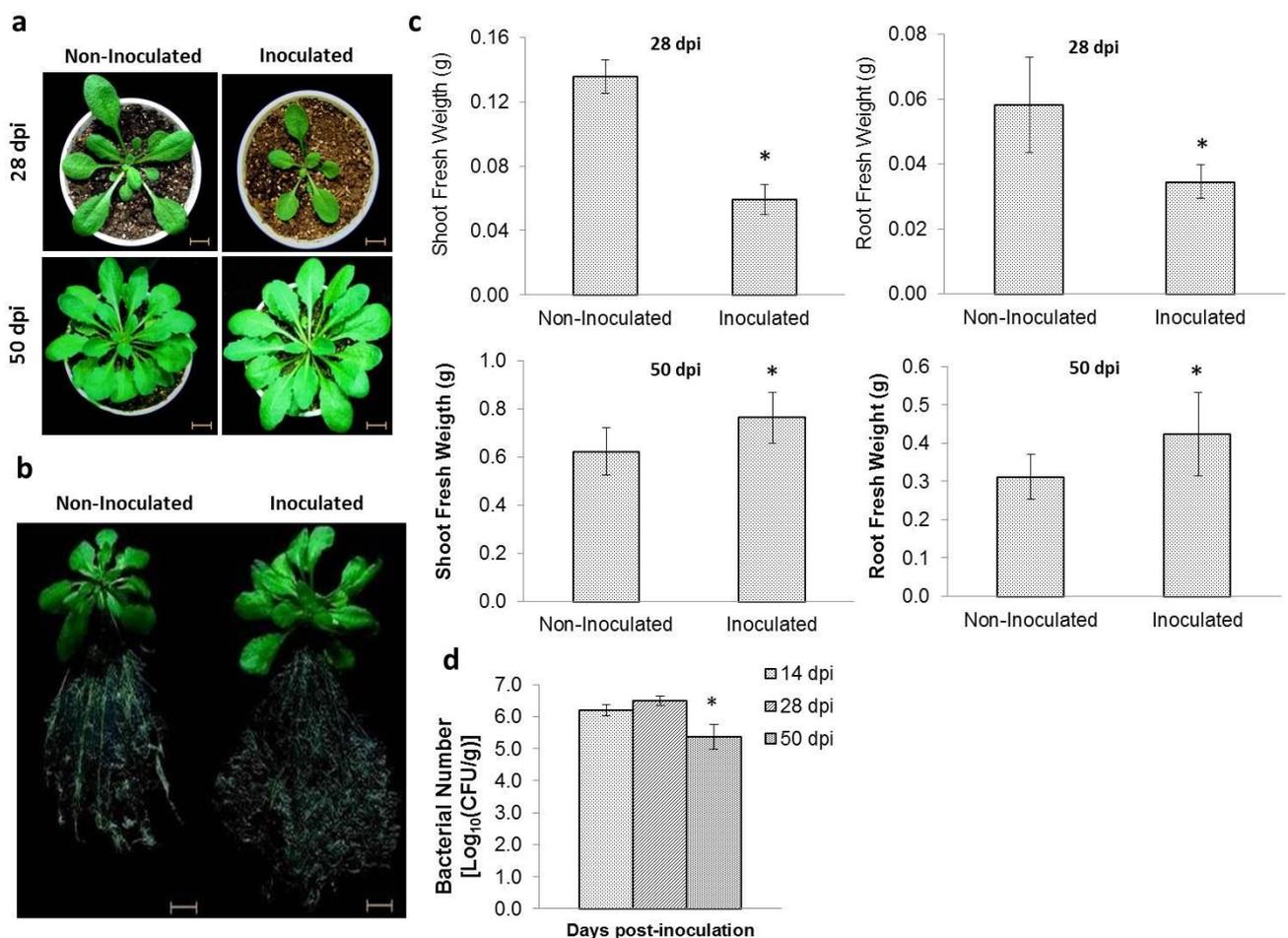


Fig. 1 Effect on plant growth, at 28 and 50 dpi, of *A. thaliana* inoculated with *G. diazotrophicus*. Seven day old wild-type (Col-0) seedlings were inoculated with GD-Kan (10^6 CFU mL^{-1}). Phenotypic analyzes of aerial leaves were performed at 28 and 50 dpi (a) followed by observation of the bacterial effect in promoting root growth at 50 dpi (b). The fresh mass of shoots and roots was measured at 28 and 50 dpi (c). The number of bacteria presents in the roots 14, 28 and 50 dpi was also examined (d). Twenty plants from each treatment were used for these analyses. These experiments were repeated three times with similar results. Error bars represent the standard deviation. Significant differences between treatments are represented by * (ANOVA, $p < 0.05$).

Endophytic bacterial population in roots and leaves was analyzed at three different stages after inoculation. CFU counting assays revealed that the bacterial population within *A. thaliana* roots was 1.5×10^6 , 3.1×10^6 and 2.1×10^5 CFU/g at 14, 28 and 50 dpi, respectively (Fig. 1d). In leaves, no bacteria were detected by CFU in at 14 and 50 dpi; GD-Kan was only detected at 28 dpi, but at very low concentrations (10^2 CFU/g).

At 50 dpi, an increase in number of leaves, leaf area, shoot and root dry weight was observed (Fig. 2). Number of leaves was 28.9 ± 4.06 and 25.9 ± 3.7 for inoculated and non-inoculated plants, respectively (Fig. 2a). Total leaf area per plant was approximately 5.0 cm^2 higher in inoculated plants than in control plants (Fig. 2b). Dry weight results confirmed increased leaf and root mass in inoculated plants (Fig. 2c and d).

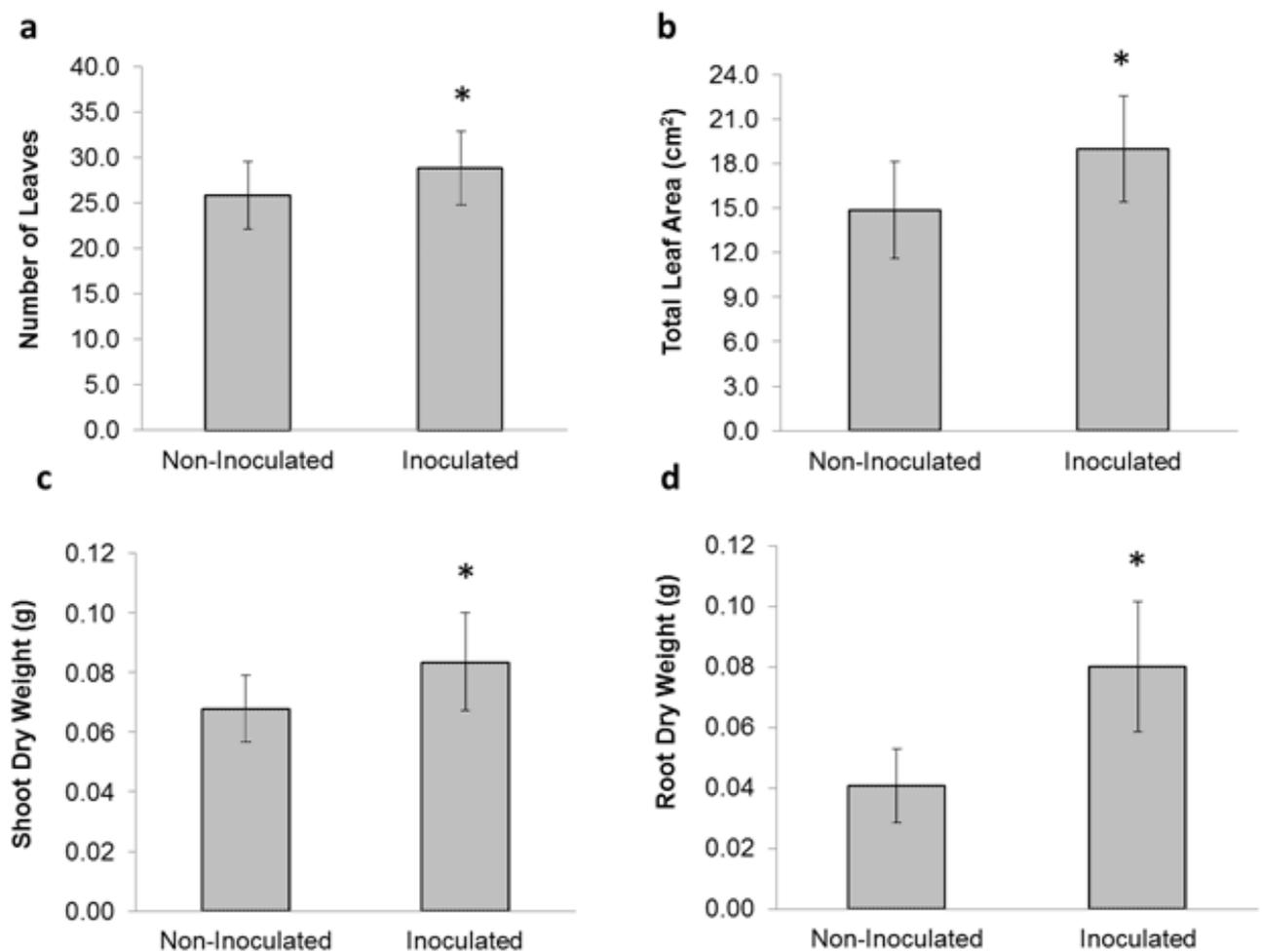


Fig. 2 Impact of *G. diazotrophicus* inoculation on root and leaf growth promotion of *A. thaliana* plants. Twenty, seven day old wild-type (Col-0), seedlings were inoculated with the GD-Kan (10^6 CFU mL⁻¹) strain or water, as non-inoculated controls, for this study. The number of leaves (a), total leaf area (b), dry weight of aerial (c) and root (d) parts were determined 50 days post inoculation (dpi). The experiments were repeated three times with similar results. Error bars represent the standard deviation. Significant differences between treatments are represented by * (ANOVA, $p < 0.05$).

During the early association stages (before 28 dpi), inoculated plants were smaller than the non-inoculated ones, indicating inhibition of plant growth by the presence of the bacteria. This result was confirmed by analysis made at 28 dpi which showed a lower number of leaves, leaf area, shoot and root dry weight (Fig. S2). Inoculated plants showed in average 2.9 leaves less than non-inoculated ones (Fig. S2a) and total leaf area was 2.5 cm² smaller (Fig. S2b). Additionally, shoot and root dry weight showed a reduction of 57.4% and 26.3%, respectively, for inoculated plants (Fig. S2c and d).

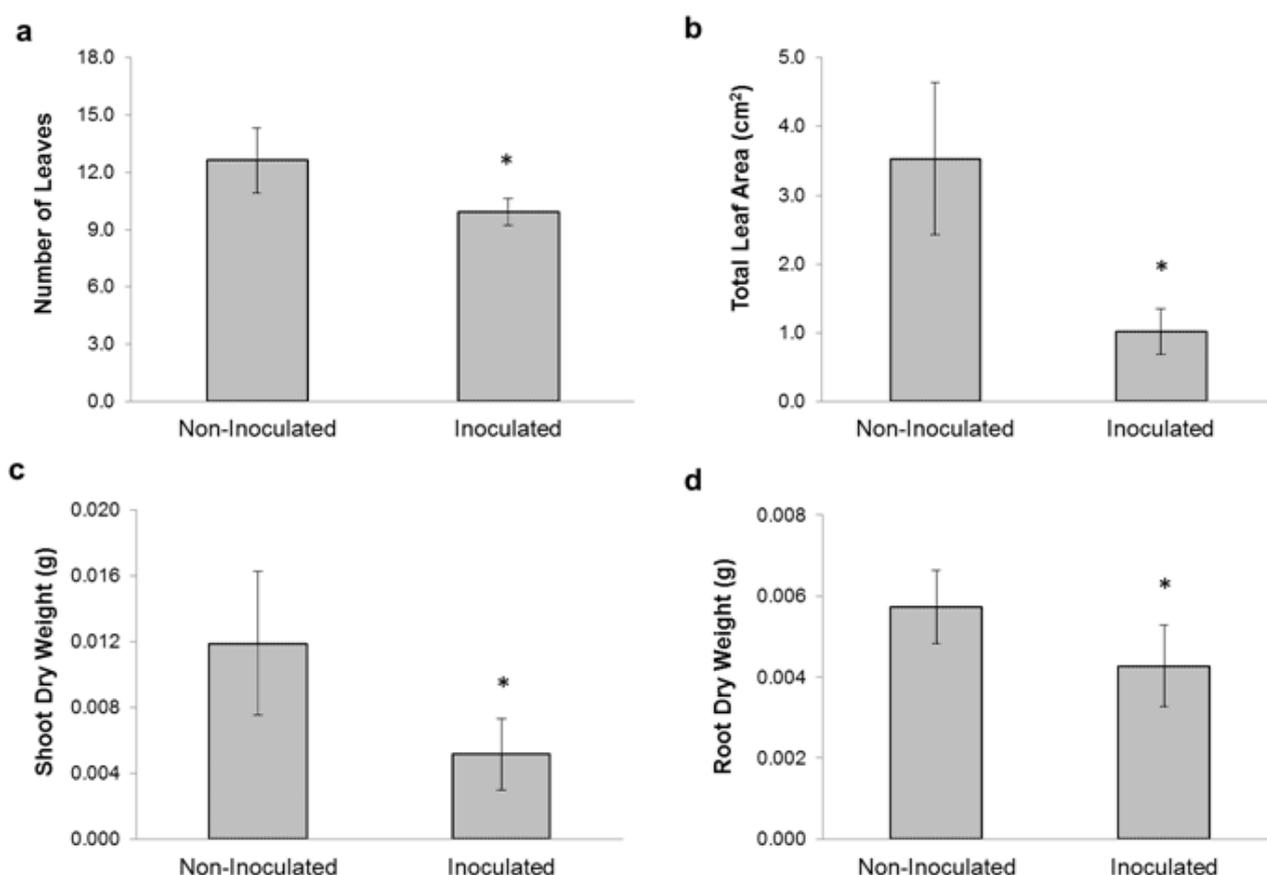


Fig. S2 Effect on plant growth, at 28 dpi, of *A. thaliana* inoculated with GD-Kan (10^6 CFU mL⁻¹). The number of leaves (a), total leaf area (b), dry weight of aerial (c) and root (d) parts were determined 28 days post inoculation (dpi). Twenty plants from each treatment were used for these analyses. These experiments were repeated three times with similar results. Error bars represent the standard deviation. Significant differences between treatments are represented by * (ANOVA, $p < 0.05$).

These results show that *G. diazotrophicus* PAL5 effectively colonized and promoted growth in *A. thaliana* after 50 dpi, despite the growth inhibition observed at early stages of association.

Gluconacetobacter diazotrophicus increases photosynthetic rate and water-use efficiency

Inoculation of *A. thaliana* with *G. diazotrophicus* has beneficial effects on photosynthesis. Whole-canopy photosynthesis levels were significantly higher (68.1%) in inoculated plants ($4.64 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) than in non-inoculated plants at 50 dpi ($2.76 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Fig. 3a), whereas transpiration rate was significantly lower (15.46%) (Fig. 3b). As consequence of greater carbon uptake and lower water loss through transpiration, inoculated plants showed increase of 94.5% in whole canopy water use efficiency compared to non-inoculated plants (Fig. 3c). These results suggest that *G. diazotrophicus* positively affects *A. thaliana* physiology by enhancing photosynthetic capacity and improve water use efficiency.

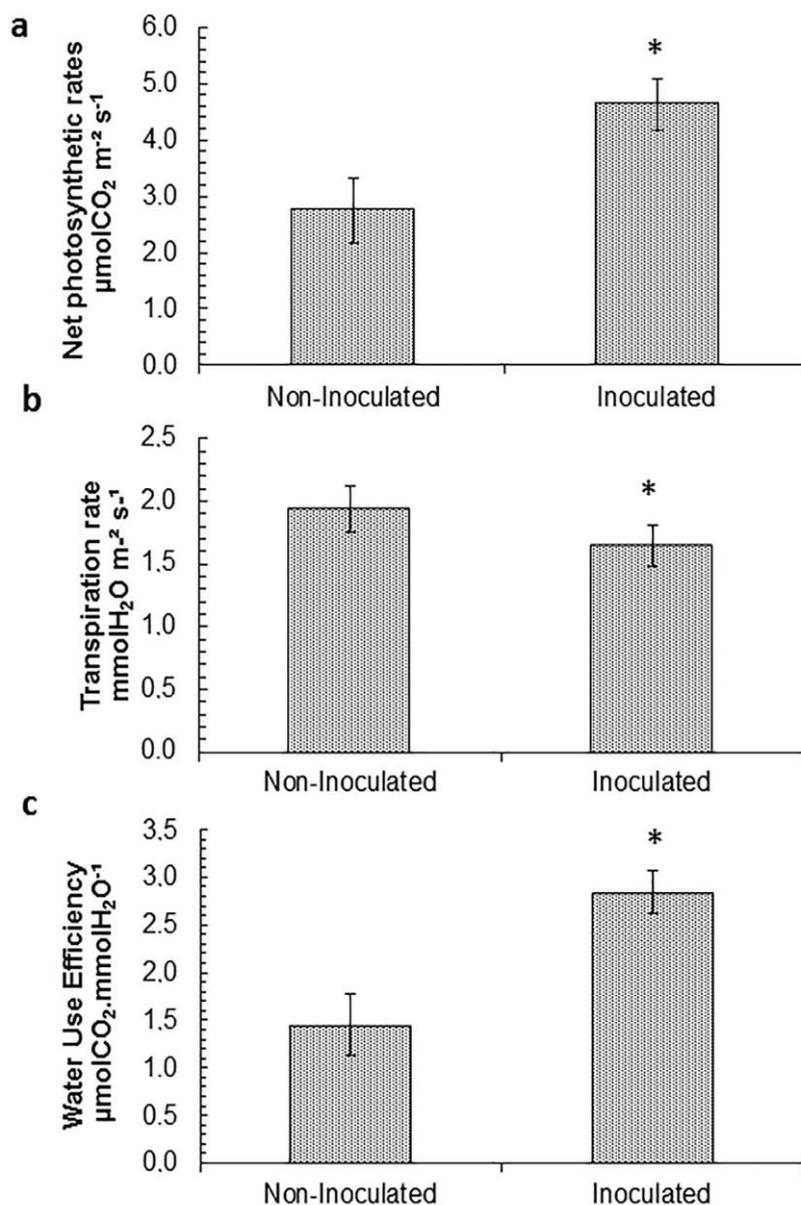


Fig. 3 Effect on water-use efficiency, photosynthetic and transpiration rates of *A. thaliana* inoculated with *G. diazotrophicus*. Seven day old wild-type (Col-0) seedlings were inoculated with GD-Kan (10^6 CFU mL^{-1}). Net photosynthetic rate (a), transpiration rate (b) and water use efficiency (c) were determined 50 days after inoculation. Twenty plants from each treatment were used for these analyses. Experiments were repeated three times with similar results. Error bars represent the standard deviation. Significant differences between treatments are represented by * (ANOVA, $p < 0.05$).

***G. diazotrophicus* colonizes endophytically *A. thaliana* root tissues**

Aiming to locate bacteria within root tissues, seven-day-old seedlings were inoculated with DsRed Fluorescent Protein-labeled *G. diazotrophicus* strain (GD-F), as previously described. Bacterial presence was analyzed by epifluorescence microscopy at 1 and 50 dpi. At 1 dpi, the bacteria were adhered to root surface and root hairs (Fig. 4a). Interestingly, the results suggested intracellular localization of bacteria in some epidermal cells (Fig. 4b). At 50 dpi, bacterial cells were observed only within the xylem apoplast, attached to secondary cell wall, suggesting that *G. diazotrophicus* tends to be confined within the root xylem during colonization stage (Fig. 4c and d).

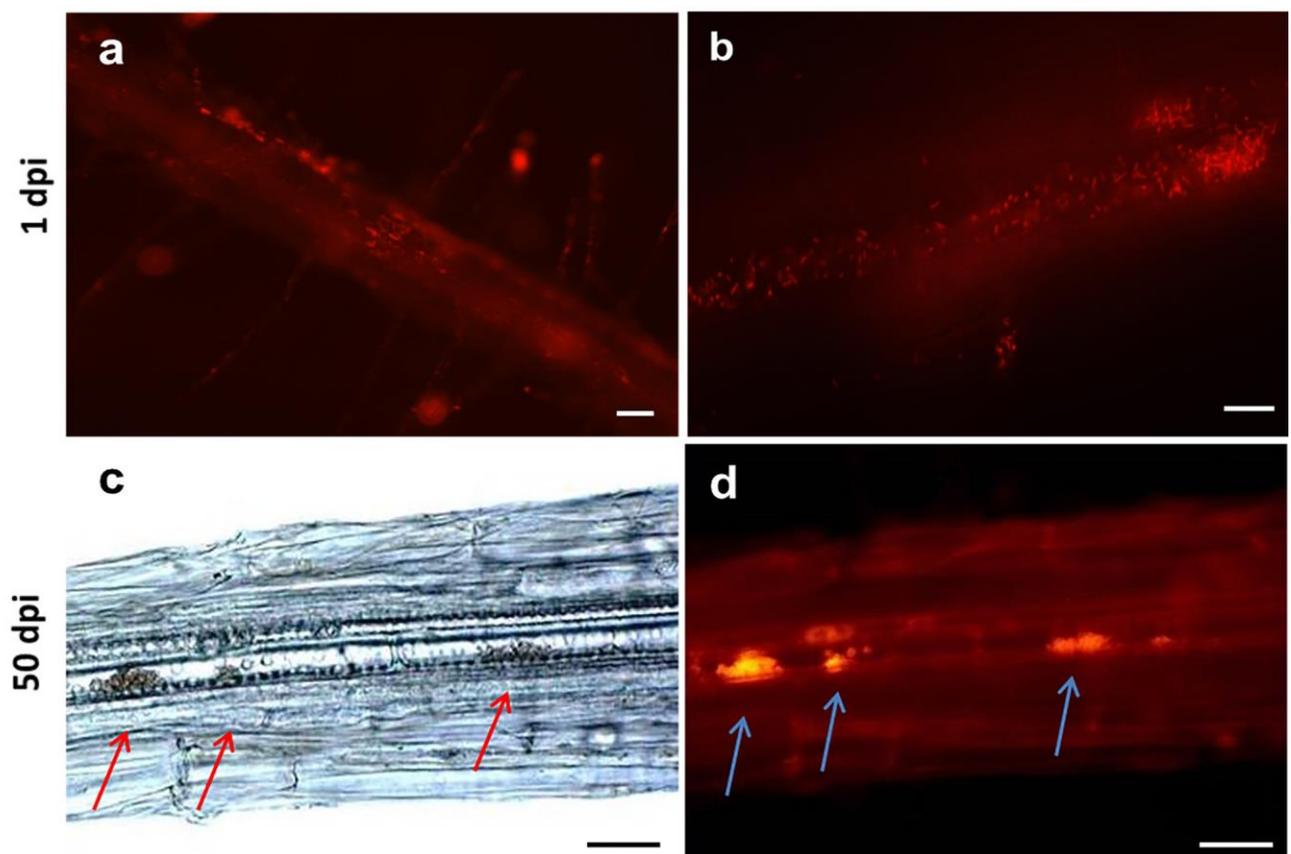


Fig. 4 Localization of *G. diazotrophicus* colonization of *A. thaliana* roots at 1 and 50 dpi. Seven day old wild-type (Col-0) seedlings were inoculated with DsRed fluorescent protein-expressing *G. diazotrophicus* strain GD-F and analyzed at a 568 nm wavelength. At 1 dpi, the bacterium was adhered to the root surface and root hairs (a), around the root epidermal cells (b). At 50 dpi the presence of bacteria was observed within root xylem vessels, examined under light microscopy (c) and epifluorescence microscopy (d). Arrows indicate bacterial colonies in the root xylem. The scale bars are 20 μ m.

Our results confirm *G. diazotrophicus* ability to endophytically colonize *A. thaliana* plants and its tendency to concentrate within root xylem at the late stages of plant-bacteria association.

Plant defense is activated by the plant-bacteria association, affecting plant growth at initial stages and restricting bacterial colonization of leaves

The negative effect on plant growth observed during the initial stages of *G. diazotrophicus* - *A. thaliana* association, at 28 dpi (Fig. 1), leads us to hypothesize that *G. diazotrophicus* inoculation triggers plant defenses. To test this hypothesis, *NahG* transgenic (defective in SA-associated defense) and Col-0 (wild-type) plants were inoculated with the GD-Kan strain. Plant-growth promotion and bacterial population levels were measured and compared at 28 and 50 dpi. Figure 5a shows that *NahG* transgenic plant growth was increased by *G. diazotrophicus* at 28 dpi, unlike the growth inhibition observed in inoculated Col-0 plants. There was an increase of 89.7% in shoot fresh weight and 79.2% in root for inoculated *NahG* plants. However, at 50 dpi, both Col-0 and *NahG* plants presented growth-promotion induced by bacterial inoculation. Even at this time point, the size of *NahG* inoculated plants was greater than that observed for Col-0 inoculated plants (Fig. 5b).

Bacterial counting by colony forming units (CFU) assay in root tissues, at 28 days, showed that the bacterial concentration in *NahG* plants was higher than Col-0. Interestingly, leaves of *NahG* plants showed a bacterial concentration of 10^5 CFU/g, unlike the result obtained for Col-0, in which the microorganisms were detected in very low amount (Fig. 5c).

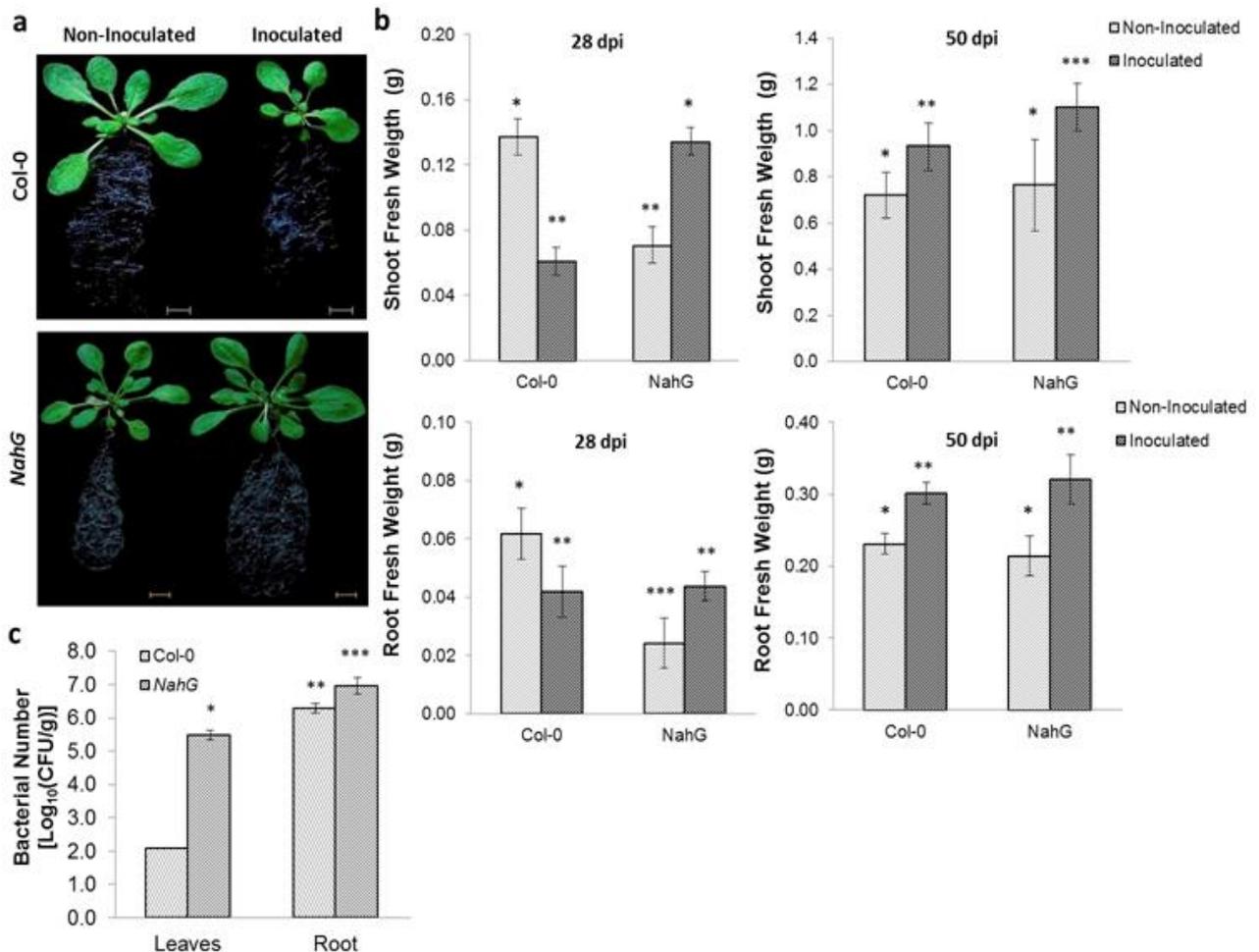


Fig. 5 Effect of *G. diazotrophicus* on growth of plant defense defective *A. thaliana* transgenic plants. *NahG* transgenic, defective in SA-associated defense, and wild-type (Col-0) *A. thaliana* plants were inoculated with *G. diazotrophicus* GD-Kan (10^6 CFU mL⁻¹) strain. Growth comparison of inoculated and non-inoculated as well as transgenic and wild type *A. thaliana* at 28 dpi (a) and quantification of fresh and dry weight of roots and shoots at 28 and 50 dpi (b). The number of bacteria present on the shoots and roots of Col-0 and *NahG* was also examined at 28 dpi (c). Twenty plants from each treatment were used for these analyses. These experiments were repeated three times with similar results. Error bars represent the standard deviation. Significant differences between treatments are represented by * (ANOVA, $p < 0.05$).

Analyzes of dry weight confirmed the effect of *G. diazotrophicus* on *NahG* plants in promoting growth. The dry mass value obtained in shoots of inoculated plants was three times the value found in non-inoculated plants (Fig. S3a). Similarly, the root dry mass value showed increase of 74.4% in inoculated plants compared to non-inoculated (Fig. S3b). The Fig. S3c and d show the dry weight data of Col-0 confirming the negative effect of bacteria in promoting growth in 28 dpi. Together, the results show that, at 28 dpi, *G. diazotrophicus* colonization is high enough to have a negative effect on plant growth; this trend is not observed in non-inoculated plants.

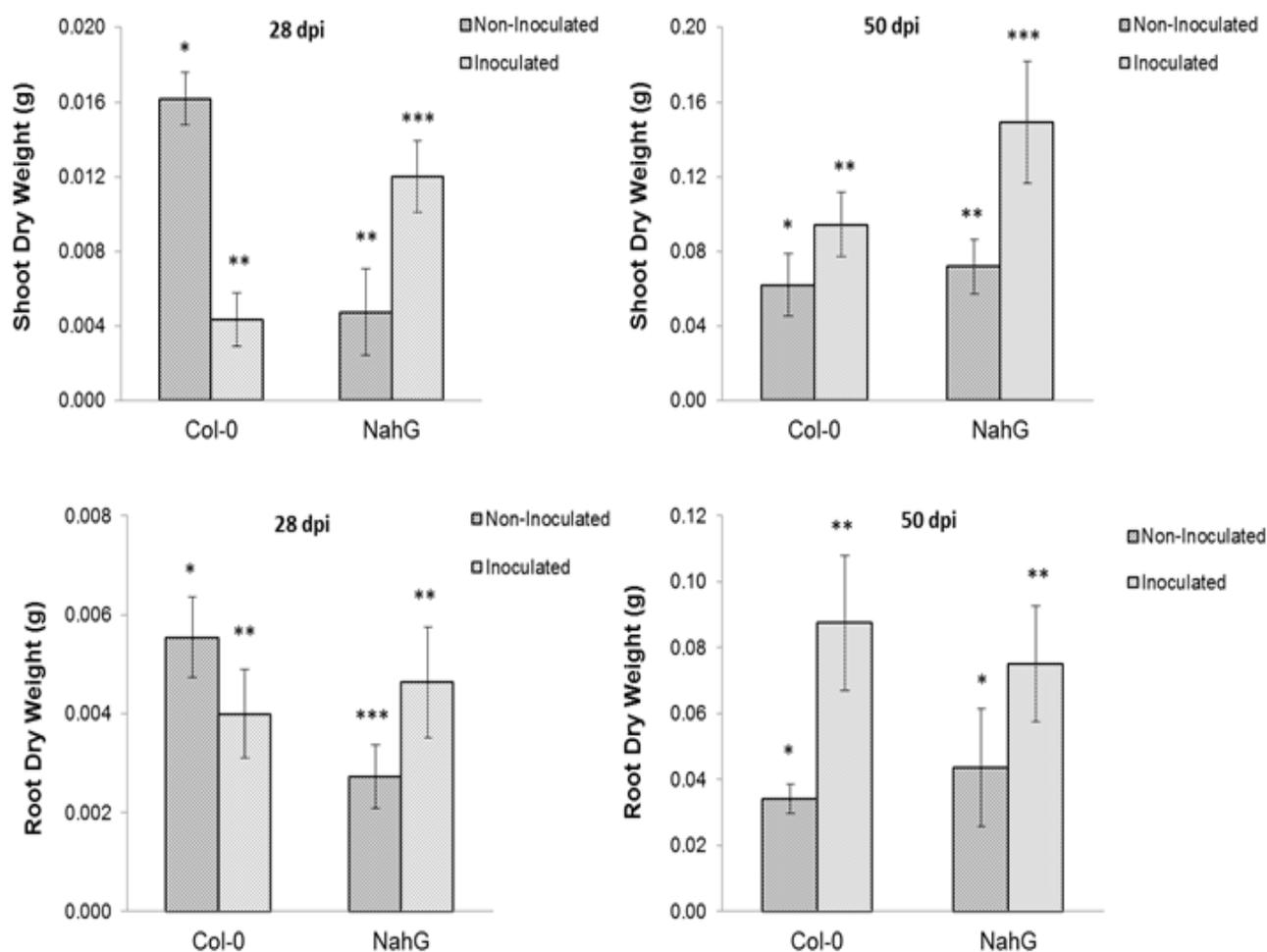


Fig. S3 Plant growth promotion by *G. diazotrophicus* GD-Kan strains in *A. thaliana* wild-type (Col-0) and *NahG* lines. Seven day old seedlings were inoculated with 10^6 CFU mL⁻¹ of GD-Kan. At 28 and 50 dpi weight of roots and shoots was the quantified. Twenty plants from each treatment were used for these analyses. Experiments were repeated three times with similar results. Error bars represent the standard deviation. Significant differences between treatments are represented by * (ANOVA, $p < 0.05$).

Additionally, our results demonstrated that plant growth retardation, observed at the initial stages of *G. diazotrophicus*-*A. thaliana* (Col-0) association, is a consequence of the activation of plant defense system. SAR-associated plant defenses also limit bacterial colonization of *A. thaliana* leaves.

DISCUSSION

Plants live in complex environments in which they interact closely with a wide range of microorganisms (Verhage et al. 2010). *Gluconacetobacter diazotrophicus* is an endophytic bacterium found in a number of unrelated monocot and dicot plant species. The bacterium is capable of promoting plant growth through different mechanisms including biological nitrogen fixation, phytohormone secretion, mineral nutrient solubilization and phytopathogen antagonism (Eskin et al. 2014).

During the last decades, several studies have attempted to identify genes and proteins regulated during *G. diazotrophicus*-plant associations (dos Santos et al. 2010; Lery et al. 2011; Galisa et al. 2012; Bertini et al. 2014). However, most of agronomical relevant plants are slow-growing species with a complex genome, and whose large size hinders cultivation under controlled environment, which limits the detailed molecular characterization of plant-bacteria interaction. Rice seedlings have been used to characterize interaction between plants and bacteria isolated from grasses, including *G. diazotrophicus* (Rouws et al. 2010; Meneses et al. 2011; Alquéres et al. 2013). In the current study, we demonstrated that *G. diazotrophicus* endophytically colonizes *A. thaliana* roots and promotes plant growth. Growth promotion in *A. thaliana* plants by inoculation with beneficial bacteria has been reported for several bacteria, such as *Pseudomonas fluorescens*, *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Burkholderia phytofirmans* PsJN, *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 and *Bacillus cereus* AR156 strains (Mercado-Blanco and Bakker 2007; Niu et al. 2011; Kechid et al. 2013; Brock et al. 2013; Poupin et al. 2013). In our assays, inoculation with *G. diazotrophicus* resulted in increased number of leaves, total leaf area, as well as dry and fresh weight of shoot and roots.

G. diazotrophicus was also found to enhance whole canopy photosynthesis and reduce whole canopy transpiration, resulting in improved instantaneous water-use efficiency. PGPB inoculation effects on photosynthetic capacity have been reported in the interaction of several plant and bacteria species (Peng et al. 2002; Zhou et al. 2006; Bhattacharjee et al. 2008; del Amor and Cuadra-Crespo 2012). However, there are few reports on the benefit in water-use efficiency of endophytic bacteria to host plant. Similar positive results were obtained for *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 rhizobacteria, which induced water-use efficiency and drought tolerance in inoculated *A. thaliana* plants (Bresson et al. 2013). The increase in the photosynthetic rate of inoculated plants suggests that *G. diazotrophicus* can stimulate a biochemical pathway

associated with photosynthetic carbon assimilation as the evaluation of PSII maximum efficiency using chlorophyll fluorescence (Fv/Fm ratio) showed values above 0.75 (high maximum photochemical efficiency of PS II - data not shown). It has been reported that inoculation with beneficial microorganisms provides an increase in the photosynthetic rate of the host plant (Peng et al. 2002; Hunt et al. 2005; Khan et al. 2012; Li and Zhang 2015). Our data showed that *G. diazotrophicus* caused negative effects on whole canopy transpiration (reduced 15%) in inoculated plants, possibly due to stomatal closure. According to Peng et al. (2002) inoculation of rice plants had a small effect on stomatal conductance and a greater effect on net photosynthetic rate (12% increase). Our data showed that the increase in whole canopy photosynthesis in inoculated plants was about 70%. This result suggests that the *G. diazotrophicus* colonizing *A. thaliana* can reduce the stomatal conductance and, in turn, reduce whole canopy transpiration. However PGPB did not affect whole canopy photosynthesis, resulting in more instantaneous water use efficient. These results justify further analysis to identify specific *G. diazotrophicus* traits that are responsible for physiological effects in the host plant.

G. diazotrophicus colonize a wide variety of crops, including maize (Riggs et al. 2001; Cocking et al. 2006), sorghum (Luna et al. 2010), tomato (Cocking et al. 2006), wheat (Youssef et al. 2004; Cocking et al. 2006; Luna et al. 2010), among others. Several different inoculation methods have been used to successfully introduce *G. diazotrophicus* into crop plants (Eskin et al. 2014). We demonstrated that *G. diazotrophicus* survives and multiplies within *A. thaliana* root tissues even at 50 dpi. In the early stages of interaction, bacterial cells were observed on the root surface and around the root epidermal cells. Our results also suggested intracellular localization of bacteria, but more detailed analyzes, including transmission electron microscopy and study of colonization dynamics may elucidate this hypothesis. Studies in sugarcane also showed that some bacterial entered root cells but these bacteria appeared to be subsequently lysed by the host (James et al. 1994; James and Olivares 1998). Differently, at 50 dpi, the bacterium was observed only within root xylem vessels at concentrations below those observed at 14 dpi and 28 dpi. This data is consistent with the results found by Luna et al. (2010) where by inoculating sorghum and wheat seeds with *G. diazotrophicus* was observed that endophytic population remained at 6.0-6.5 log CFU g⁻¹ (fresh weight) for more than 7 days. After that, endophytic population decreased to the level of 5.5 log CFU g⁻¹ (fresh weight) and remained constant until the end of the experiment. In studies of growth promotion in tomato by *G. diazotrophicus*, it was

observed that the endophytic population remained at 5.0–6.0 log CFU g⁻¹ (fw) for the first 7 days. After that, the population showed fluctuations varying between 4.0 and 6.0 log CFU g⁻¹ (fw) along the observation period (Luna et al. 2012). We speculate that as the association progresses, the bacterial population reduces, probably as consequence of plant defense system activation. In sugarcane it was showed that *G. diazotrophicus* colonized the intercellular spaces of the root and xylem vessels at the base of the stem (James et al. 1994). As seen in our analysis, the bacteria do not appear to be sufficiently numerous to block the vessels (James and Olivares 1998).

The colonization of *A. thaliana* by *G. diazotrophicus* was previously addressed by Cocking et al. (2006), where it was performed through seed germination in culture medium containing the bacteria followed by cultivation in MS medium. Their study showed seedling colonization by *G. diazotrophicus*, at 7 and 14 dpi. However, they did not observe beneficial effects such as plant growth promotion. Actually, our data shows that plant-growth promotion can be observed only at late stages of plant-bacterium interaction, after 28 dpi. In our assays, we did not observe “Symbiosome-like” structures within root cell cytoplasm as described by Cocking et al. (2006). Possibly, such structures are produced under the specific experimental conditions used by these authors.

During the first 28 dpi, inoculated plants grew slower than non-inoculated controls. Similarly, Wang et al. (2005) observed that *P. fluorescens* promoted growth inhibition in *A. thaliana* plants in the first days after inoculation and promoted growth only at subsequent stages. A possible explanation is that plant immune response, at the early association stages, results in lower plant growth compared to non-inoculated plants. Growth inhibition by activation of plant immune response has been reported in several studies (Hua et al. 2001; Shirano et al. 2002; Zhang et al. 2003; Yang and Hua 2004). Among the plant defense mechanisms, SA-mediated pathways play an essential role against bacterial colonization (Durrant and Dong 2004). To test this hypothesis we used the *NahG* transgenic *A. thaliana* plants for inoculation with *G. diazotrophicus*. This plant material is defective in defense by expressing the gene *NahG*, a bacterial salicylate hydroxylase that degrades SA produced by the plant, preventing SAR triggering. In contrast to wild-type plant (Col-0) observations, *NahG* plant growth was not repressed at 28 dpi. Indeed, plant growth was induced by bacterium in such plants, confirming the participation of SA-associated defense mechanism in growth inhibition during the initial stages of bacterial association with *A. thaliana*.

CFU analysis revealed consistent bacterial concentration levels in root and leaves

tissues of *NahG* plants, unlike those observed for Col-0, in which the bacteria concentrates mostly within root tissue. This data suggest that plant growth was induced by bacterium in *NahG* plants and SA-mediated pathway participates in the prevention of the bacterial colonization process of leaves in wild-type *A. thaliana*. Interestingly, at 28 dpi, non-inoculated *NahG* plants showed lower growth than wild-type. This effect was attenuated when these plants were inoculated with bacteria. We can speculate that the growth condition used in this study were restrictive for the development of *NahG* plants at this developmental stage. In this context, the colonization by *G. diazotrophicus* alleviated this inhibition. The ostensibly positive effect of leaves colonization by *G. diazotrophicus* on growth, during the first four weeks, might be due to the compensation of a specific defect in leaves of *NahG* plant. Further testing to characterize gene expression may confirm the activation of the pathway in this specific defense.

Our findings on *A. thaliana* colonization and plant growth promotion by *G. diazotrophicus* open interesting prospects to significantly expand the analysis of molecular mechanisms activated during the plant-microbe interaction, in complement to data obtained from inoculation of native hosts. *A. thaliana* plants can be easily manipulated to study plant–endophyte interactions, enabling further analyses of molecular mechanisms that positively and negatively regulate this process.

Genomic, transcriptomic and proteomic analyses have revealed a wide range of plant molecular responses to *G. diazotrophicus* inoculation in plants (Carvalho et al. 2011; Lery et al. 2011; Alquéres et al. 2013; Vargas et al. 2014). However, difficulty on carrying multiple and simultaneous experiments under controlled conditions, during the full life cycle of most host plants, have generated fragmentary comparative data which in turn has impaired rapid understanding and kept relevant questions unclear. Thus, the use of *A. thaliana* and its various available mutants will enable analyses of different plant mechanisms involved in *G. diazotrophicus* interaction, including: SA-mediated innate immune pathways, hormone synthesis and perception, and production of defense compounds. Interesting findings should be confirmed from inoculation of native hosts. Additionally, this will enable further studies on effectiveness of plant-endophytic bacterium association in biocontrol of pathogens and its role in plant protection against environmental stresses.

CONCLUSIONS

Gluconacetobacter diazotrophicus endophytically colonizes *A. thaliana* roots and promotes plant growth by enhancing whole-plant photosynthesis and improving instantaneous whole canopy water-use efficiency. Our results point to the importance of plant defense in controlling endophytic population. Although further analysis in native hosts are necessary, our data indicate that *A. thaliana* is useful for molecular studies on specific traits of the interaction between plants and plant-growth-promoting bacteria, especially those involving *G. diazotrophicus*.

Acknowledgments: This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT-FBN). First author received fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

REFERENCES

- Aertsen A, Tesfazgi Mebrhatu M, Michiels CW (2008) Activation of the *Salmonella Typhimurium* Mrr protein. *Biochem Biophys Res Commun* 367(2): 435-439
- Alquéres S, Meneses C, Rouws L, Rothballer M, Baldani I, Schmid M, Hartmann A. (2013) The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol Plant-Microbe Interact* 26: 937-945
- Anitha KG, Thangaraju M (2010) Growth promotion of rice seedling by *Gluconacetobacter diazotrophicus* under *in vivo* conditions. *J Cell Plant Sci* 1: 6–12
- Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goe RS, Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume. *Soil Biol Biochem* 29: 911-922

- Baldani JI, Reis VM, Baldani VL, Döbereiner J (2002) Review: A brief story of nitrogen fixation in sugarcane—reasons for success in Brazil. *Funct Plant Biol* 29(4): 417-423
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24: 7-11
- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 11-18
- Bertini EV, Peñalver CGN, Leguina AC, Irazusta VP, de Figueroa LI (2014) *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 possesses an active quorum sensing regulatory system. *Antonie van Leeuwenhoek* 106(3): 497-506
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN (2008) Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 80: 199-209
- Blanco Y, Blanch M, Piñón D, Legaz ME, Vicente C (2005) Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J Biosci Bioeng* 99(4): 366–371
- Burgess CM, Smid EJ, van Sinderen D (2009) Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. *Int J Food Microbiol* 133:1–7
- Bresson J, Varoquaux F, Bontpart T, Touraine B, Vile D (2013) The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol* 200(2): 558-569

- Brock AK, Berger B, Mewis I, Ruppel S (2013) Impact of the PGPB *Enterobacter radicincitans* DSM 16656 on growth, glucosinolate profile, and immune responses of *Arabidopsis thaliana*. *Microb Ecol* 65(3): 661-670
- Caballero-Mellado J, Martinez-Romero E (1994) Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* 60(5): 1532-1537
- Carvalho TLG, Ferreira PCG, Hemerly AS (2011) Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. *Trop Plant Biol* 4: 31-41
- Cavalcante JJ, Vargas C, Nogueira EM, Vinagre F, Schwarcz K, Baldani JI, Ferreira PC, Hemerly AS (2007) Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *J Exp Bot* 58: 673-686
- Cavalcante VA, Dobereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane.pdf. *Plant Soil* 108: 23-31
- Cocking EC, Stone PJ, Davey MR (2006) Intracellular colonization of roots of *Arabidopsis* and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *In Vitro Cell Dev-PI* 42: 74-82
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42: 669-678
- del Amor FM, Cuadra-Crespo P (2012) Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. *Funct Plant Biol* 39: 82
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Ryals J (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266(5188): 1247-1250

- Denecke J, de Rycke R, Botterman J (1992) Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J* 11: 2345–2355
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat Genetics* 11: 539-548
- dos Santos MF, Muniz de Padua VL, de Matos Nogueira E, Hemerly AS, Domont GB (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* 73: 917-931
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42: 185–209
- Eskin N, Vessey K, Tian L (2014) Research Progress and Perspectives of Nitrogen Fixing Bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Monocot Plants. *Int J Agron* 2014: 1-13
- Fu ZQ, Dong X (2013) Systemic Acquired Resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* 64: 7.1–7.25
- Fuentes-Ramírez LE, Jimenez-Salgado T, Abarca-OCampo IR, Caballero-Mellado J (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant Soil* 154: 145-150
- Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J, Sepúlveda J, Martínez-Romero E (1999) Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microb Ecol* 29: 117-128
- Galisa PS, da Silva HA, Macedo AV, Reis VM, Vidal MS, Baldani JI, Simões-Araújo JL (2012) Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. *J Microbiol Methods* 91(1): 1-7

- Gillis M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephen MP, Teixeira KRS, Dobereiner J, de Ley J (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J Syst Bacteriol* 39: 361-364
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16: 463-471
- Harrison MJ (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 59: 19–42
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular Calif Agric Exp Sta* 347
- Hua J, Grisafi P, Cheng SH, Fink GR (2001) Plant growth homeostasis is controlled by the *Arabidopsis* BON1 and BAP1 genes. *Genes Dev* 15: 2263–2272
- Hunt MG, Rasmussen S, Newton PC, Parsons AJ, Newman JA (2005) Near-term impacts of elevated CO₂, nitrogen and fungal endophyte-infection on *Lolium perenne* L. growth, chemical composition and alkaloid production. *Plant Cell Environ* 28(11): 1345-1354
- Intorne AC, de Oliveira MV, Lima ML, da Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* 191: 477-483
- James E, Reis V, Olivares F, Baldani J, Döbereiner J (1994) Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* 45: 757-766
- James EK, Olivares FL (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit Rev Plant Sci* 17(1): 77-119

- James EK, Olivares FL, de Oliveira ALM, dos Reis Jr. FB, da Silva LG, Reis VM (2001) Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52: 747-760
- Jimenez-Salgado T, Fuentes-Ramirez LE, Tapia-Hernandez A, Mascarua-Esparza MA, Martinez-Romero E, Caballero-Mellado J (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63(9): 3676–3683
- Khan AL, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Jung HY, Lee JH, Lee IJ (2012) Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiol*, 12(1): 3
- Kechid M, Desbrosses G, Rokhsi W, Varoquaux F, Djekoun A, Touraine B (2013) The *NRT2.5* and *NRT2.6* genes are involved in growth promotion of *Arabidopsis* by the plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. *New Phytol* 198(2): 514-524
- Koornneef M, Meinke D (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J* 61(6): 909-921
- Kummu M, de Moel H, Porkka M, Siebert S, Varis O, Ward PJ (2012) Lost food, wasted resources: global food supply chain losses and their impacts on freshwater, cropland, and fertiliser use. *Sci Total Environ* 438: 477-489
- Lee S, Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla JE, Kennedy C (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J Bacteriol* 186(16): 5384–5391
- Lery LMS, Hemerly AS, Nogueira EM, Krüger MAK, Bisch PM (2011) Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-

- promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol Plant-Microbe Interact* 24: 562-576
- Li R, MacRae IC (1992) Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. *Soil Biol Biochem* 24: 413-419
- Li X, Zhang L. (2015) Endophytic infection alleviates Pb²⁺ stress effects on photosystem II functioning of *Oryza sativa* leaves. *J Hazard Mater* 295: 79-85
- Luna MF, Aprea J, Crespo JM, Boiardi JL (2012) Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl Soil Ecol* 61: 225-229
- Luna MF, Galar ML, Aprea J, Molinari ML, Boiardi JL (2010) Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnol Lett* 32: 1071-1076
- Maclean AM, Sugio A, Kingdom HN, Grieve VM, Hogenhout SA (2011) *Arabidopsis thaliana* as a model plant for understanding phytoplasma interactions with plant and insect hosts. *Bull Insectol* 64 (Supplement): S173-S174
- Madhaiyan M, Saravanan VS, Jovi DBSS (2004) Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiol Res* 159(3): 233–243
- Matiru V, Thomson J (1998) Can *Acetobacter diazotrophicus* be used as a growth promoter for coffee, tea, and banana plants? in *Proc 8th Cong Afric Assoc Biol Nitro Fixat*, F. D. Dakora, Ed.: 129–130 University of Cape Town
- Meenakshisundaram M, Santhaguru K (2010) Isolation and nitrogen fixing efficiency of a novel endophytic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* associated with *Saccharum officinarum* from southern district of tamilnadu. *Int J Biol Med Res* 1: 298–300

- Mehnaz S, Lazarovits G (2006) Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* 51(3): 326–335
- Meneses CHSG, Rouws LFM, Simões-Araújo JL, Vidal MS, Baldani JI (2011) Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol Plant-Microbe Interact* 24: 1448-1458
- Mercado-Blanco J, Bakker PA (2007) Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 367-389
- Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J (2003) Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb Ecol* 46(4): 454-464
- Muthukumarasamy R, Cleenwerck I, Revathi G, Vadivelu M, Janssens D, Hoste B, Gum KU, Park Ki-Do, Son CY, Sa T, Caballero-Mellado J (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst Appl Microbiol* 28(3): 277–286
- Muthukumarasamy R, Revathi G, Vadivelu M (2000) Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. *Curr Sci* 78: 1063-1065
- Niu DD, Liu HX, Jiang CH, Wang YP, Wang QY, Jin HL, Guo JH (2011) The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol Plant-Microbe Interact* 24(5): 533-542

- O'Callaghan KJ, Stone PJ, Hu X, Griffiths DW, Davey MR, Cocking EC (2000) Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Appl Environ Microb* 66: 2185-2191
- Oliveira AD, Urquiaga S, Döbereiner J, Baldani JI (2002) The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* 242(2): 205-215
- Ouibrahim L, Caranta C (2013) Exploitation of natural genetic diversity to study plant–virus interactions: what can we learn from *Arabidopsis thaliana*? *Mol Plant Path* 14(8): 844-854
- Palacios OA, Bashan Y, de-Bashan LE (2014) Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria—an overview. *Biol Fertil Soils* 50: 415-432
- Paula MA, Reis VM, Döbereiner J (1991) Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biol Fert Soils* 11(2): 111–115
- Peng S, Biswas JC, Ladha JK, Gyaneshwar P, Chen Y (2002) Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. *Agron J* 94(4): 925-929
- Pieterse CMJ, Dicke M (2007) Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci* 12(12): 564-569
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308-316
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 28.1–28.33

- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC, Bakker PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52: 16.1–16.29
- Piñón D, Casas M, Blanch M, Fontaniella B, Blanco Y, Vicente C, Solas MT, Legaz ME (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Res Microb* 153: 345-351
- Poupin MJ., Timmermann T, Veja A, Zuñiga A, González B (2013) Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PloS One* 8(7): e69435
- Reis VM, Olivares FL, Debereiner J (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J Microb Biot* 10: 401-405
- Riggs PJ, Chelius MK, Iniguez AL, Kaeppler SM, Triplett EW (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust J Plant Physiol* 28(9): 829–836
- Rodrigues Neto J, Malavolta Jr. V, Victor O (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathol* 12(1-2): 32
- Rouws LF, Meneses CH, Guedes HV, Vidal MS, Baldani JI, Schwab S (2010) Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. *Lett Appl Microbiol* 51: 325-330
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa TM (2007) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microb Ecol* 55: 130-140

- Savci S (2012) An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *Int J Environ Sci Develop* 3: 77-80
- Serrato, RV, Meneses CHSG, Vidal MS, Santana-Filho AP, Iacomini M, Sasaki GL, Baldani JI (2013) Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Carbohydr Polym* 98: 1153-1159
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 358-366
- Shirano Y, Kachroo P, Shah J, Klessig DF (2002) A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* Toll Interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell* 14: 3149–3162
- Tapia-Hernández A, Bustillos-Cristales MR, Jiménez-Salgado T, Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramírez LE (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb Ecol* 39 (1): 49–55
- Vargas L, Santa Brígida AB, Mota Filho JP, de Carvalho TG, Rojas CA, Vaneechoutte D, Van Bel M, Farrinelli L, Ferriera PCG, Hemerly AS (2014) Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. *PLoS One* 9(12): e114744
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon LC, Pieterse CM (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17(8): 895-908
- Verhage A, Van Wees CMS, Pieterse CMJ (2010) Plant Immunity: It's the Hormones Talking, But What Do They Say? *Plant Physiol* (154): 536–540
- Vinagre F, Vargas C, Schwarcz K, Cavalcante J, Nogueira EM, Baldani JI, Ferreira PCG, Hemerly AS (2006) SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant–N₂-fixing endophytic bacteria association. *J Exp Bot* 57(3): 559-569

- Wang Y, Ohara Y, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2005) Microarray Analysis of the Gene Expression Profile Induced by the Endophytic Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 18: 385-396
- Windram O, Penfold CA, Denby KJ (2014) Network modeling to understand plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 52: 5.1–5.20
- Yang S, Hua J (2004) A haplotype-specific resistance gene regulated by *BONZA1* mediates temperature-dependent growth control in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1060–1071
- Youssef HH, Fayez M, Monib M, Hegazi N (2004) *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biol Fert Soils* 39(6): 391–397
- Zhang Y, Goritschnig S, Dong X, Li X (2003) A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of *npr1-1*, constitutive. *Plant Cell* 15: 2636–2646
- Zhou XJ, Liang Y, Chen H, Shen SH, Jing YX (2006) Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization on photosynthetic physiology of soybean. *Photosynthetica* 44: 530-535
- Zamioudis C, Pieterse CM (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant-Microbe Interact* 25: 139-150

CAPÍTULO II:

Participação das vias hormonais na promoção do crescimento e ativação do mecanismo de defesa vegetal de *Arabidopsis thaliana* durante interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5

Participação das vias hormonais na promoção do crescimento e ativação do mecanismo de defesa vegetal de *Arabidopsis thaliana* durante interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5

A.L.S. Rangel de Souza, S.A. de Souza, J. F. da Silva, M.V.V. de Oliveira, L. S. Vespoli e G.A. de Souza Filho

Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil

e-mail: goncalos@uenf.br

RESUMO

A utilização de grandes quantidades de fertilizantes químicos industrializados representa importante componente dos custos de produção das lavouras, além de gerar prejuízos ao meio ambiente. PGPB podem melhorar o desempenho vegetal, operando através de vias fisiológicas, moleculares e bioquímicas. *G. diazotrophicus* é uma bactéria diazotrófica endofítica que produz fitormônios e coloniza várias espécies vegetais, promovendo seu crescimento. Tal microrganismo constitui um interessante modelo de estudo para bactérias tropicais promotoras do crescimento vegetal. Neste trabalho, nós buscamos elucidar as principais vias hormonais e de defesa em *A. thaliana* que são reguladas por *G. diazotrophicus* e analisamos o efeito de mutações nas mesmas no âmbito da promoção do crescimento vegetal. Amostras de plantas inoculadas e não-inoculadas com *G. diazotrophicus*, foram submetidas a análises transcriptômicas (*RNA-seq*) e os conjuntos gênicos regulados em folhas da roseta e em raízes foram analisados. Adicionalmente, plantas de diferentes genótipos foram inoculadas e a localização da bactéria foi determinada por microscopia de epifluorescência. Também foram realizadas análises anatômicas e morfológicas para verificar o efeito da bactéria na promoção do crescimento vegetal. Uma análise global das alterações transcricionais revelou que *G. diazotrophicus* interfere diretamente nos processos biológicos vegetais, regulando de modo diferenciado genes relacionados com aspectos importantes como metabolismo do nitrogênio, resposta a estímulos e vias de produção/percepção. Dentre os 20 genes induzidos no tecido radicular, 7 fazem parte da via de ABA e 6 atuam na via de JA. Em folhas metade dos genes participantes de vias hormonais que foram induzidos atuam diretamente na via de SA. Mutações nestas vias alteram a capacidade da bactéria em promover o crescimento da planta, embora os níveis de colonização bacteriana tenham sido similares entre os genótipos testados. O mutante *ein 2.1* e a linha transgênica *NahG* foram as que apresentaram maior efeito da bactéria no âmbito da promoção do crescimento. No mutante *ein 3.1* a bactéria não interferiu no crescimento vegetal e em *aux 1.7* sua presença ocasionou uma inibição do crescimento. Este trabalho, portanto, abre interessantes perspectivas para o estudo dos mecanismos moleculares que envolvem a interação entre plantas e PGPB, visando maior esclarecimento sobre as principais vias reguladas durante a interação.

PALAVRAS-CHAVES: *G. diazotrophicus*, Hormônios, Promoção do Crescimento Vegetal, Sistema Imune, *A. thaliana*.

INTRODUÇÃO

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) vêm sendo aplicadas em sistemas agrícolas nos últimos 50 anos por favorecerem o desenvolvimento das plantas e proporcionar proteção contra vários patógenos (Singh et al. 2011; Timmusk et al. 2014). PGPB associam-se com as raízes das plantas hospedeiras, sendo capazes de solubilizar fosfato, zinco e fósforo, reduzir o estresse causado por etileno, produzir fitormônios, vitaminas e sideróforos e modular a atividade patogênica, além de atuar na biorremediação de solos contaminados (Berg 2009; Burgess et al. 2009; Compant et al. 2010; Hardoim et al. 2008; He et al. 2010; Kumar et al. 2009; Zaidi et al. 2006; Zhuang et al. 2007). Adicionalmente, o suprimento de nitrogênio fornecido pela fixação biológica exercida por PGPB vem assumindo um papel de grande importância para a sustentabilidade da agricultura, visto que representa uma alternativa ao emprego de fertilizantes sintéticos nitrogenados (Madhaiyan et al. 2006).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria endofítica promotora do crescimento vegetal que coloniza diversas espécies de importância econômica como cana de açúcar, café, batata-doce, banana, abacaxi, cenoura, rabanete, beterraba e arroz (Baldani et al. 1997; Reinhold-Hurek and Hurek 1998; Saravanan et al. 2008). Sua capacidade em promover o crescimento vegetal se dá principalmente pelos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de zinco e fósforo e controle de fitopatógenos (Hardoim et al. 2008; Intorne et al. 2009; Muthukumarasamy et al. 2000; Piñón et al. 2002). Além disso, *G. diazotrophicus* é capaz de produzir hormônios reguladores do crescimento vegetal, como as auxinas (Fuentes-Ramirez et al. 1993) e giberelinas (Bastián et al. 1998).

Fitormônios são pequenas moléculas essenciais para a regulação do crescimento, desenvolvimento e defesa vegetal que, em baixas concentrações, atuam como sinalizadores (Pieterse et al. 2009). Ao serem produzidos por bactérias que interagem com plantas, podem induzir a expressão de genes específicos no hospedeiro (Pieterse et al. 2014; Robert-Seilantantz et al. 2011). As respostas de defesa local e sistêmica, ativadas por microrganismos, são controladas por uma rede de sinalização na qual os hormônios ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno desempenham papéis importantes (Glazebrook 2005; Balbi e Devoto 2008). Resistência sistêmica induzida (ISR) desencadeada por microrganismos benéficos muitas vezes é regulada por vias de sinalização dependentes de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), podendo também estimular a defesa vegetal contra patógenos (Pozo et al. 2008).

O envolvimento de muitos dos reguladores do crescimento na imunidade vegetal sugere que os mecanismos de controle do crescimento, desenvolvimento e defesa da planta estão interconectados numa complexa rede de comunicação e vias de sinalização hormonal (Pieterse et al. 2009). Através do uso de mutantes defectivos nas vias de JA e ET o papel destes reguladores na defesa induzida por algumas bactérias benéficas tem sido elucidado (Pieterse et al. 2014). Diversos estudos acerca de ISR mediada por PGPB como *Pseudomonas*, *Serratia* e *Bacillus* vêm sendo conduzidos, gerando progresso na compreensão das bases moleculares que desencadeiam a sinalização e expressão da defesa vegetal por PGPB, especialmente em *Arabidopsis thaliana*, que é considerada uma espécie modelo (de Vleesschauwer and Höfte 2009; Franken 2012; Kloepper et al. 2004; Pozo and Azcon-Aguilar 2007; Van der Ent et al. 2009; Van Loon and Bakker; Walters et al. 2013).

Nosso trabalho recente revelou que *G. diazotrophicus* coloniza raízes de *A. thaliana* de modo endofítico, promove o seu crescimento e melhora os aspectos fisiológicos. Além disso, a bactéria ativa o sistema de defesa vegetal nas fases iniciais da interação (Rangel de Souza et al., *in press*). Apesar de haver trabalhos mostrando a participação das vias hormonais e de defesa entre *A. thaliana* e endófitos (Mavrodi et al. 2011; Weller et al. 2012; Zamioudis and Pieterse 2012), o estudo da ativação do sistema imune e da regulação de vias hormonais por bactérias que têm importância agrônômica permanece pouco explorado.

No presente trabalho, as principais vias moleculares envolvidas na resposta de plantas de *A. thaliana* à colonização por *G. diazotrophicus* foram analisadas. Para tanto, o perfil de expressão gênica em raízes e folhas de plantas inoculadas foi caracterizado através de análise transcriptômica comparativa, via sequenciamento de RNA total em larga escala (*RNAseq*). Os resultados obtidos revelaram indução de várias vias de regulação de processos biológicos, destacando-se as vias relacionadas com transporte e metabolismo de compostos nitrogenados, imunidade vegetal e vias hormonais. A relevância de vias hormonais específicas foi confirmada através de ensaios de inoculação da bactéria em mutantes de *A. thaliana* defectivos para a produção/percepção de hormônios, seguida de análise da eficiência em colonizar e promover o crescimento vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Cepas Bacterianas**

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 foi obtida a partir da Coleção de Culturas pertencente à Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), localizada em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

A cepa de *G. diazotrophicus* resistente à canamicina (GD-Kan) contém o transposon Tn5 < R6Kyori/KAN-2 inserido em uma região intergênica do genoma, tendo sido obtida a partir do *screening* de uma biblioteca de inserção de transposons (Intorne et al. 2009).

A cepa de *G. diazotrophicus* marcada com proteína de fluorescência vermelha (GD-F) foi obtida a partir da eletroporação com o plasmídeo DsRed-pDE1001. A construção deste plasmídeo foi obtida a partir da digestão do plasmídeo DsRed-pAA100 (Denecke et al. 1992) com a enzima de restrição EcoRI (corte simples) seguida de ligação ao plasmídeo pDE1001 (Aertsen et al. 2008) previamente digerido com a mesma enzima. O produto da ligação foi eletroporado em *E. coli* DH5 α . Colônias de fluorescência vermelha contendo o plasmídeo fundido foram crescidas em meio LB contendo ampicilina (60 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e a cultura foi submetida à extração plasmidial. O plasmídeo obtido foi usado para eletroporar *G. diazotrophicus* e colônias positivas foram selecionadas em meio de cultura contendo estreptomicina (Intorne et al. 2009). A fluorescência vermelha foi confirmada usando um transluminador DarkReader® DR-45M (Dark Reader – Clare Chemical Research).

Análise comparativa entre a cepa resistente à canamicina (GD-Kan), cepa DsRed fluorescente (GD-F) e o tipo selvagem revelou que ambas apresentam comportamento semelhante, evidenciado por suas curvas de crescimento e resistência a diferentes estresses. Adicionalmente, as cepas utilizadas apresentaram efeitos similares durante a interação com plantas e foram detectadas nas mesmas concentrações nos tecidos radiculares por testes de colonização (Rangel de Souza et al. 2015).

- **Condições de cultivo bacteriano**

Colônias isoladas de *G. diazotrophicus* cepa PAL5 (GD-Kan e GD-F) foram crescidas em meio DYGS (composição em g L⁻¹): glicose 2.0, extrato de levedura 2.0, peptona 1.5, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄.7H₂O 0.5 e ácido glutâmico 1.5 (Rodrigues Neto et al. 1986) sob temperatura de 30 °C e agitação de 180 rpm (Cavalcante and Döbereiner

1988). Canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado ao meio para cultivo da cepa de *G. diazotrophicus* resistente à canamicina (GD-Kan). Canamicina e estreptomicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados ao meio para cultivo da cepa DsRed fluorescente (GD-F).

- **Material vegetal e condições de cultivo**

Foram utilizadas sementes de *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0, tipo selvagem) e genótipos contendo afetações nas vias hormonais (*abi4*, *jar1*, *aux 1.7*, *ein 2.1*, *ein 3.1*, *NahG*, *npr1* e *sid 2.2*), as quais foram gentilmente cedidas pelo Dr. Frederick Ausubel (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). Tais sementes foram germinadas em placas de Petri contendo meio Murashige and Skoog (MS) meia força, com sacarose 0.5% e tampão MÊS 0.05% sob temperatura de $23 \text{ }^\circ\text{C}$, 60% de umidade relativa, $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de energia luminosa (fotoperíodo de 12h) durante 7 dias. Plântulas de *A. thaliana* foram transferidas para recipientes contendo o substrato comercial *West Garden*, que foram irrigados com solução de Hoagland 25% (Hoagland and Arnon 1950) a cada dois dias durante 50 dias.

- **Ensaio de inoculação e colonização**

G. diazotrophicus cepa PAL5 (GD-Kan e GD-F) foram cultivadas em meio líquido DYGS e centrifugadas a 80 rpm. Após descartar o sobrenadante as células foram lavadas duas vezes em água ultrapura estéril. As células foram ressuspensas em água estéril na concentração final 0.01, em densidade ótica de 600 nm [equivalente a 1×10^6 unidades formadoras de colônia (CFU) mL^{-1}]. Vinte mL de inóculo foram aplicados às placas de Petri contendo plântulas de *A. thaliana* de sete dias de idade, previamente germinadas e cultivadas em meio Murashige and Skoog (MS) meia força. A mesma quantidade de água ultrapura estéril foi aplicada às plântulas não-inoculadas, como controle. Após 3h de incubação a suspensão bacteriana foi substituída por água estéril. Em seguida, as plântulas foram transferidas para potes de cultivo contendo o substrato comercial *West Garden* e cultivadas como previamente descrito.

- **Análises morfológicas**

O número de folhas da roseta foi contabilizado e o total de massa fresca e seca da roseta foliar e do sistema radicular foi determinado. A massa fresca foi mensurada usando uma balança de precisão imediatamente após a coleta. Em seguida, o material foi seco em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h e a massa seca foi determinada. Vinte plantas de

cada tratamento foram utilizadas nestas análises. O efeito da colonização por *G. diazotrophicus* PAL5 na promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana* foi avaliado aos 50 dias de cultivo após a inoculação. A área foliar foi mensurada usando um medidor de área foliar (LI-3100C, Licor, USA).

- **Microscopia de epifluorescência**

Aos 50 dias após a inoculação (dpi), cinco plantas do mesmo tamanho foram utilizadas para análise de microscopia de epifluorescência. Regiões de 3.0 cm de comprimento, retiradas de um ponto intermediário da raiz (3.0 cm de distância da ponta da raiz) foram analisadas. O material foi cuidadosamente lavado e seguiu para preparo das lâminas para visualização. As amostras foram visualizadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiovert 200; Carl Zeiss, Jena, Germany) acoplado a um sistema de gravação digital com excitação de luz verde (568 nm; 640 ± 60 nm filtro de emissão) para visualizar a cepa DsRed fluorescente.

- **Determinação da população microbiana nos tecidos vegetais**

A análise de colonização foi realizada aos 50 dias após a inoculação. Foram retirados dois discos foliares da roseta (0.5 cm de diâmetro) e uma seção de 1.0 cm de comprimento da raiz para análise de CFU. Foram utilizadas dez plantas de cada tratamento. As amostras de folhas foram desinfestadas superficialmente pela imersão em etanol 70% durante 3 min seguida de lavagem em água ultrapura 3 vezes. As raízes foram removidas do substrato, lavadas em água ultrapura e imersas em cloramina-T 1% durante 1 min e novamente lavadas 3 vezes em água ultrapura estéril. As amostras foram então maceradas em água ultrapura e diluídas de forma seriada. Em seguida, tais amostras foram plaqueadas em meio LGI-P sólido (Cavalcante and Döbereiner 1988; Reis et al. 1994) contendo (in g L⁻¹): 100.0 sacarose; 0.2 K₂HPO₄; 0.6 KH₂PO₄; 0.2 MgSO₄.7H₂O; 0.2 CaCl₂.2H₂O; 0.002 Na₂MoO₄.H₂O; 0.01 FeCl₃.6H₂O; 5.0 mL azul de bromotimol 0.5% em 0.2M KOH; 15.0 agar. Canamicina (50 µg.mL⁻¹) foi adicionada ao meio de cultivo. O pH do meio foi ajustado para 5.5 e as placas foram incubadas sob temperatura de 28 °C durante 4 dias.

- **Preparo das amostras, construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento por Illumina**

As amostras de tecidos da raiz e de folhas da roseta, obtidas após a coleta, foram maceradas em nitrogênio líquido e então submetidas à extração de RNA utilizando o

“*RNeasy Plant Mini Kit*” (Qiagen), de acordo com o protocolo e as especificações do fabricante. Após a extração, a qualidade e quantidade de RNA foi determinada através da leitura em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). As amostras foram tratadas com RNase-free DNase I (Fermentas Life Sciences, Hanover, MD). A integridade do RNA foi confirmada usando o 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) com um valor mínimo de oito. Duas misturas de quantidades iguais de três amostras de RNA de raiz de *Arabidopsis* para análise do transcriptoma foram preparadas a partir de cada tratamento usando o kit Illumina, seguindo as recomendações do fabricante. O RNAm foi purificado a partir de 30 ug de RNA total usando Sera-mag Oligo (dT) Magnetic Beads (Illumina) e fragmentado em pequenos pedaços usando cátions divalentes sob elevada temperatura. cDNA de cadeia dupla foi então sintetizado usando o Kit de Síntese SuperScript (Invitrogen, Camarillo, CA) com iniciadores (Illumina). Estes fragmentos de cDNA passaram por um processo de reparo final, fosforilação e ligação de adaptadores. Os produtos foram subsequentemente purificados e amplificados por PCR para criar a última biblioteca de cDNA. O tamanho do inserto da biblioteca foi de aproximadamente 200 pb. A biblioteca de cDNA foi sequenciada no Illumina HiSeq™ 2000 e ambas as extremidades das inserções foram sequenciadas. O sequenciamento do transcriptoma (*RNA-Seq*) foi realizado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) na Unicamp.

• **Análise da interação entre genes**

A análise dos transcritos obtidos após o sequenciamento foi feita utilizando o banco de dados STRING 9.1, por meio da ferramenta GO *Biological Processes*. As informações obtidas foram organizadas em planilhas para geração dos gráficos relacionados aos principais processos biológicos nos quais os genes analisados participam. Adicionalmente, o banco de dados STRING 9.1 prevê uma rede de interação entre as proteínas para genes induzidos e reprimidos em raiz e folhas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5.

• **Análises Estatísticas**

Os dados foram analisados usando análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi usado para comparar a significância entre grupos distintos ao nível de 5%. As análises foram realizadas usando o *software* Assistat 7.0 Beta.

RESULTADOS

G. diazotrophicus* interfere na regulação biológica de *A. thaliana

Nosso trabalho anterior revelou que *G. diazotrophicus* coloniza e promove o crescimento de plantas de *A. thaliana* tipo selvagem (ecótipo *Columbia-0*). A partir desse sistema torna-se interessante e viável analisar os mecanismos vegetais envolvidos nesta interação, incluindo as vias de resposta imune, síntese e percepção de hormônios e produção de compostos de defesa. Para caracterizar as consequências funcionais de alterações no padrão de expressão de genes associados com a inoculação de *A. thaliana* com *G. diazotrophicus*, o perfil de expressão gênica em tecidos de raízes e folhas da roseta de plantas inoculadas foi caracterizado através de sequenciamento de RNA total em larga escala (*RNAseq*).

Os resultados de transcriptômica mostraram que a inoculação de *A. thaliana* com *G. diazotrophicus* causou a indução de 241 genes em tecidos de folhas e 265 genes no sistema radicular. Outro conjunto gênico foi regulado negativamente, gerando repressão de 441 genes nas folhas e 233 genes na raiz.

O conjunto de genes diferencialmente expressos foi analisado por meio do *software* STRING 9.1, usando a ferramenta *GO Biological Process*. A análise global das alterações transcricionais ocorridas nas plantas inoculadas revelou que a bactéria interfere diretamente nos processos biológicos vegetais, ativando e reprimindo diversos genes relacionados com aspectos importantes como metabolismo do nitrogênio, resposta a estímulos, vias de produção/percepção hormonal e vias de resposta imune (Fig. 1 e 2). Dentre os genes induzidos, é possível observar que em raízes os quatro grupos de processos biológicos onde houve maior nível de indução foram “processos celulares”, “processos metabólicos”, “resposta a estímulos” e “regulação biológica”. Em tecidos foliares os quatro grupos de processos biológicos com maior número de genes induzidos foram “processos celulares”, “processos metabólicos”, “resposta a estímulos” e “resposta a estresses” (Fig. 1a).

A análise do transcriptoma dos tecidos foliares e radiculares de *A. thaliana* após inoculação com *G. diazotrophicus*, revelou a ativação de importantes vias relacionadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal, tais como transporte e metabolismo de nitrogênio e fitormônios. Dentre os genes relacionados com resposta a compostos nitrogenados em tecidos radiculares houve indução dos genes NRT2.4, NIR1, ATNRT2:1 e NRT1.5. Estes formam uma rede interconectada que codifica proteínas

transportadoras de nitrato, as quais participam de processos metabólicos diretamente relacionados com compostos nitrogenados (Fig. 1b). Já em folhas da roseta houve indução de apenas do gene NRT1.5, o qual é comumente expresso devido á presença de compostos nitrogenados e ativação de processos metabólicos a eles relacionados (Fig. 1c).

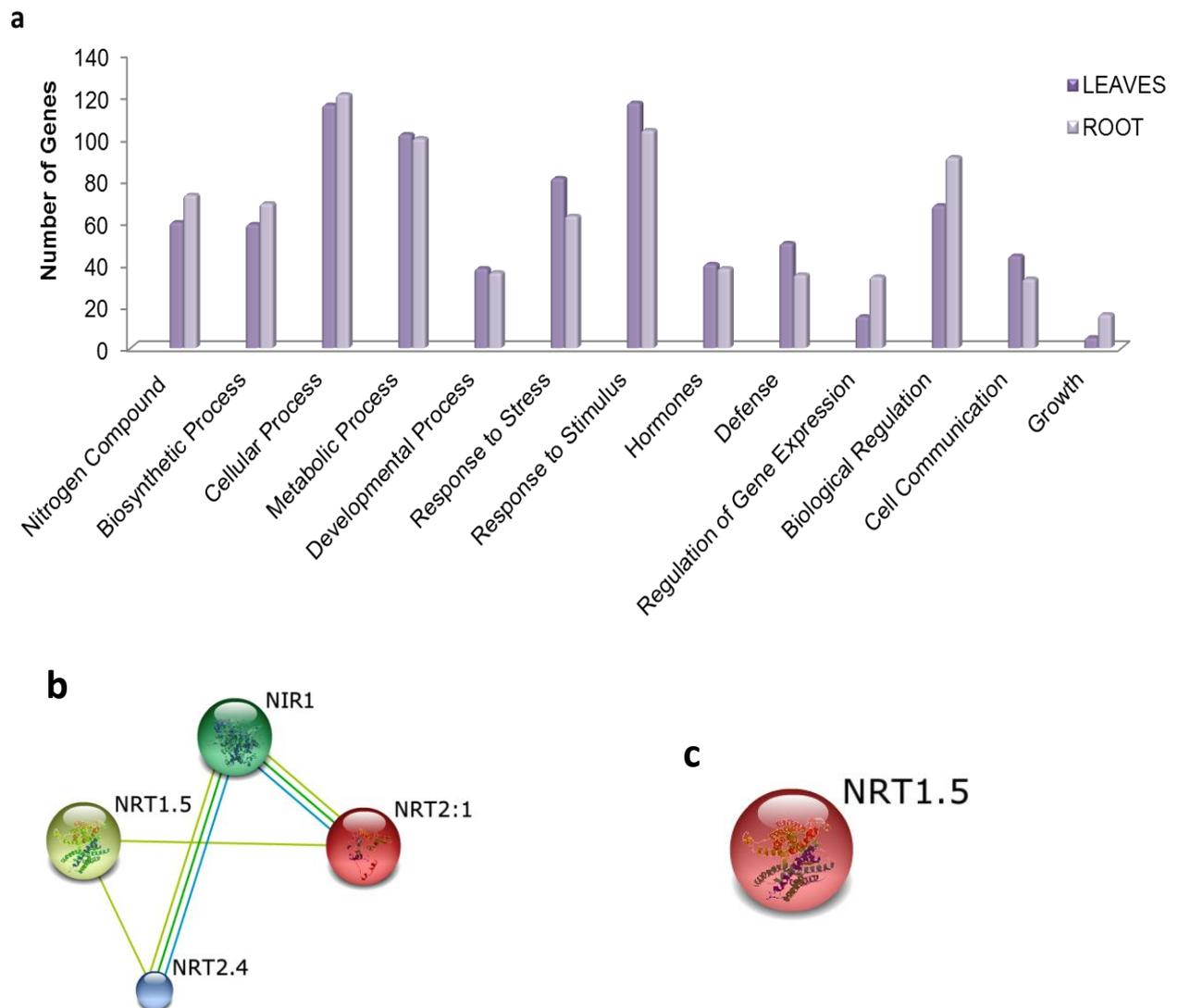


Fig. 1 Proporções de genes induzidos e a classificação dos mesmos quanto aos processos biológicos dos quais participam em tecidos de raiz e folhas de plantas de *A. thaliana* tipo selvagem após a inoculação com *G. diazotrophicus* PAL5 (GD-Kan) **(a)**. Transportadores de nitrato induzidos nos tecidos de raiz **(b)** e folhas **(c)**. As esferas apresentadas na rede representam as proteínas com sua estrutura tridimensional, enquanto as bordas da rede (arestas que conectam as esferas) representam as associações funcionais previstas entre as proteínas. A cor de cada uma das arestas representa o tipo de evidência que existe para cada interação: aresta amarela indica evidência resultante da mineração de dados existentes na literatura, aresta verde indica a proximidade de localização das proteínas no organismo analisado, enquanto a aresta azul indica evidências relacionadas com informações disponíveis em banco de dados. Os dados foram obtidos por meio de uma análise dos transcritos feita no banco de dados STRING 9.1, usando a ferramenta *GO Biological Processes*.

Em relação aos genes que sofreram repressão, observou-se que em ambos os tecidos analisados uma quantidade similar de genes relacionados com comunicação celular foi reprimida, conforme pode ser visto na Figura 2. Os únicos aspectos em que o número de genes reprimidos em tecidos radiculares foi superior ao número de genes de tecidos foliares foram “resposta a estresses” e “defesa”. No que concerne aos demais aspectos o conjunto de genes reprimidos é menor nos tecidos radiculares se comparado à quantidade de genes que sofreu repressão nas folhas.

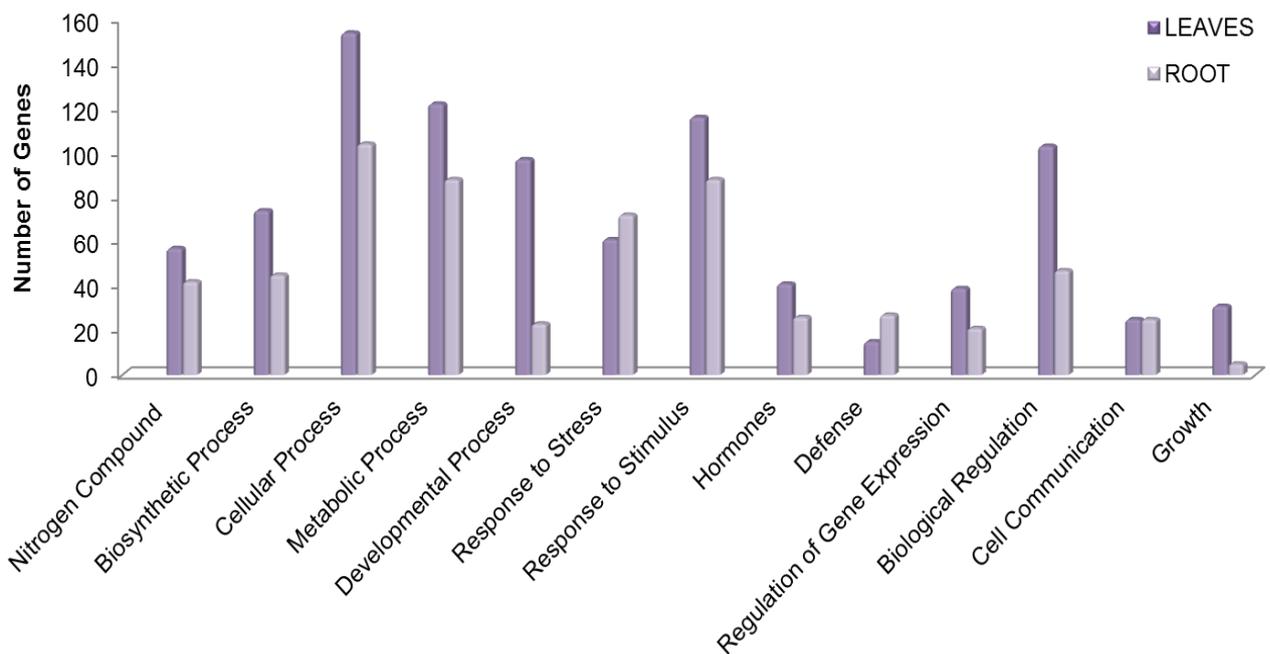


Fig. 2 Proporções de genes reprimidos e a classificação dos mesmos quanto aos processos biológicos dos quais participam em tecidos de raiz e folhas de plantas de *A. thaliana* tipo selvagem após a inoculação com *G. diazotrophicus* PAL5 (GD-Kan). Os dados foram obtidos por meio de uma análise dos transcritos feita no banco de dados STRING 9.1, usando a ferramenta *GO Biological Processes*.

Uma análise comparativa das figuras 1 e 2 revela que houve um maior nível de indução do que de repressão dos genes relacionados com a regulação biológica em tecidos radiculares. Isto sugere que a presença da bactéria interfere na ativação da expressão gênica em vários sistemas. Com exceção dos genes relacionados com resposta a estresses, em todos os processos biológicos analisados o número de genes induzidos em raiz foi superior ao de genes reprimidos. Interessantemente, a quantidade de genes envolvidos com crescimento vegetal que foram induzidos é três vezes maior

do que a de genes reprimidos. Nos tecidos foliares, o número de genes envolvidos com processos celulares que foi induzido é consideravelmente menor que o número de genes reprimidos, relacionados com os mesmos aspectos.

O envolvimento destas vias metabólicas fornece uma base para a identificação adicional dos genes envolvidos com aspectos relevantes no estudo da resposta de defesa ativada por *G. diazotrophicus* durante a interação com *A. thaliana*.

***G. diazotrophicus* ativa a resposta imune vegetal**

De acordo com os dados de expressão gênica obtidos, em raiz e folhas houve indução de alguns genes relacionados com o sistema de imunidade vegetal (Fig. 3). Foram induzidos 15 genes de resposta de defesa vegetal em raízes e 17 genes nos tecidos foliares. O número de genes reprimidos foi menor, sendo apenas 4 em raízes e 3 em folhas (Fig. 3a). A partir da identificação dos genes relacionados com a resposta de defesa tanto em tecidos radiculares quanto nas folhas, foi possível gerar uma rede de interação entre as proteínas correspondentes aos transcritos induzidos, a fim de avaliar a integração das mesmas no processo de resposta imune vegetal. As proteínas apontadas nesta rede são aquelas que atuam nos processos relacionados com a defesa da planta, desencadeada pelo contato com microrganismos.

A relação existente entre as proteínas envolvidas com a defesa em raiz pode ser vista na figura 3b, enquanto a abordagem do mesmo aspecto em tecidos de folhas é apresentada na figura 3c. Em tecidos radiculares boa parte dos genes interage fortemente entre si na ativação da resposta de defesa vegetal. Entretanto, nas folhas o nível de interação entre os genes envolvidos com a resposta imune da planta parece ser menor, havendo 7 genes não interligados com os demais. Estes dados foram obtidos a partir do *software* STRING versão 9.1, o qual integra informações acerca de interações existentes entre proteínas conhecidas. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais), que são derivadas de quatro fontes: contexto genômico, experimentos de alto rendimento, co-expressão, e conhecimento prévio.

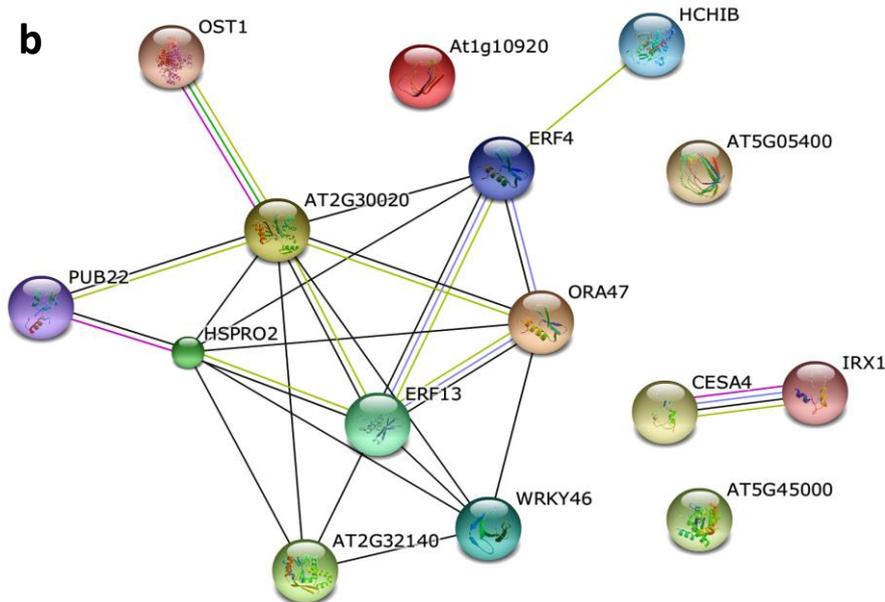
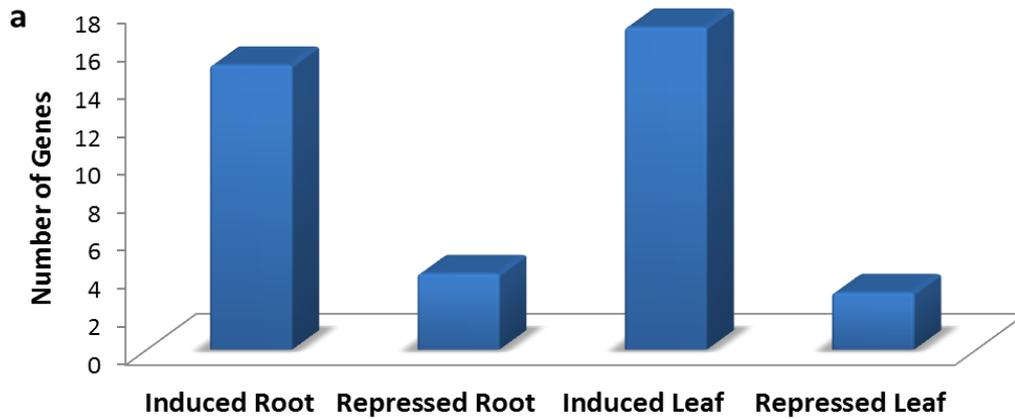
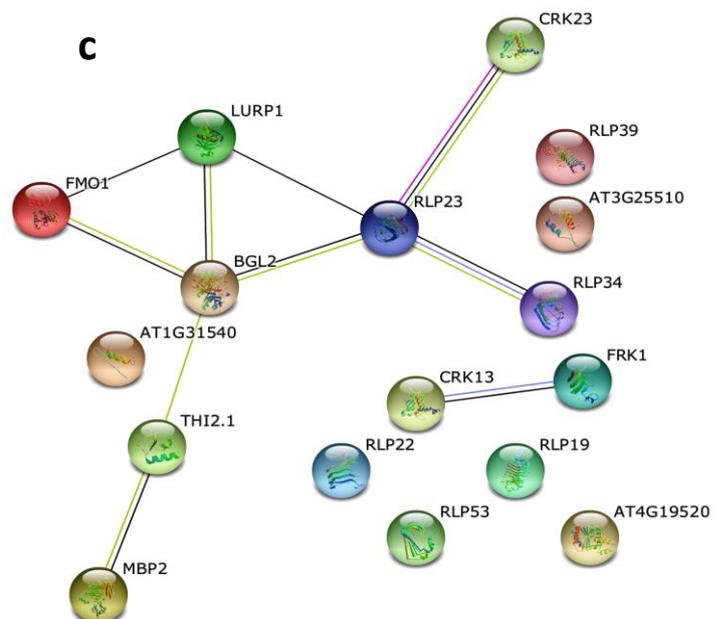


Fig. 3 Análise do número de genes relacionados com a defesa vegetal e da interação existente entre eles. Genes participantes das vias de resposta imune foram induzidos e reprimidos em tecidos da raiz e folhas de *A. thaliana* após inoculação com *G. diazotrophicus* PAL5 – GD-Kan (a). A rede de interação entre as proteínas de defesa induzidas nos tecidos de raiz (b) e folhas (c) foi determinada pelo banco de dados STRING 9.1. As esferas apresentadas na rede representam as proteínas com sua estrutura tridimensional, enquanto as bordas da rede (arestas que conectam as esferas) representam as associações funcionais previstas entre as proteínas. A cor de cada uma das arestas representa o tipo de evidência que existe para cada interação: aresta verde indica a proximidade de localização das proteínas no organismo analisado, aresta vermelha indica a ocorrência de fusão entre os genes, aresta azul royal indica evidências de co-ocorrência, aresta preta indica evidências de co-expressão, aresta roxa indica evidências experimentais sobre a relação entre as proteínas, aresta azul turquesa indica evidência sobre a relação entre as proteínas baseada em informações disponíveis em banco de dados, aresta amarela indica evidência resultante da mineração de dados existentes na literatura e aresta cinza indica a existência de homologia entre as proteínas relacionadas. Os dados foram obtidos por meio de uma análise dos transcritos feita no banco de dados STRING 9.1, usando a ferramenta *GO Biological Processes*.



Estes resultados sugerem que a resposta de defesa é desencadeada em ambos os tecidos. Apesar de *G. diazotrophicus* ser uma bactéria benéfica, ocorre ativação do sistema de defesa da planta após o início da interação. Sua ação não ocorre apenas sobre genes individuais, mas sim sobre uma rede específica de proteínas responsáveis por desencadear uma resposta de defesa que difere entre os tecidos de folha e raiz.

G. diazotrophicus* modula as vias hormonais associadas à resistência sistêmica induzida (ISR) em *A. thaliana

Um dos mecanismos utilizados por *G. diazotrophicus* para promover o crescimento vegetal é a produção de fitormônios, mas sabe-se que estas moléculas também atuam na regulação da resistência sistêmica induzida (ISR). Nossos resultados mostram que a regulação das vias hormonais ativada por *G. diazotrophicus* difere entre os tecidos vegetais analisados, embora a resposta de defesa seja induzida em ambos. A modulação das vias hormonais de *A. thaliana* desencadeada pela inoculação com *G. diazotrophicus* ocorre através da indução e repressão de diferentes genes relacionados com produção/percepção de auxina (AUX), etileno (ET), ácido jasmônico (JA), ácido absísico (ABA) e ácido salicílico (SA). Em raízes, os genes relacionados com JA e ABA foram fortemente induzidos, enquanto em folhas destacaram-se os genes da via de SA. Dentre os 20 genes induzidos em raiz, diretamente relacionados com hormônios, 7 fazem parte da via de ABA e 6 atuam na via de JA. Em tecidos foliares, metade dos genes participantes de vias hormonais que foram induzidos atua diretamente na via de SA (Fig.4a).

A análise da interação entre as proteínas correspondentes aos genes relacionados com vias hormonais, induzidos em raízes de plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* mostrou que tais proteínas atuam de forma integrada. Apenas os genes YUC5, AT1G75590 (relacionados com produção de AUX), IRX1 (induz resistência contra microrganismos via ABA) TGG2 e AGP31 (relacionado com produção de JA) não interagem diretamente com as demais proteínas participantes das vias hormonais induzidas em raiz (Fig. 4b). As proteínas participantes das vias hormonais ativadas pela presença de *G. diazotrophicus* em folhas pouco interagem entre si. Apenas as proteínas TAT3 (responsiva a JA) EDS16, FMO1 e ANK (induzidas pelo aumento no nível de SA) parecem estar interligadas (Fig. 4c).

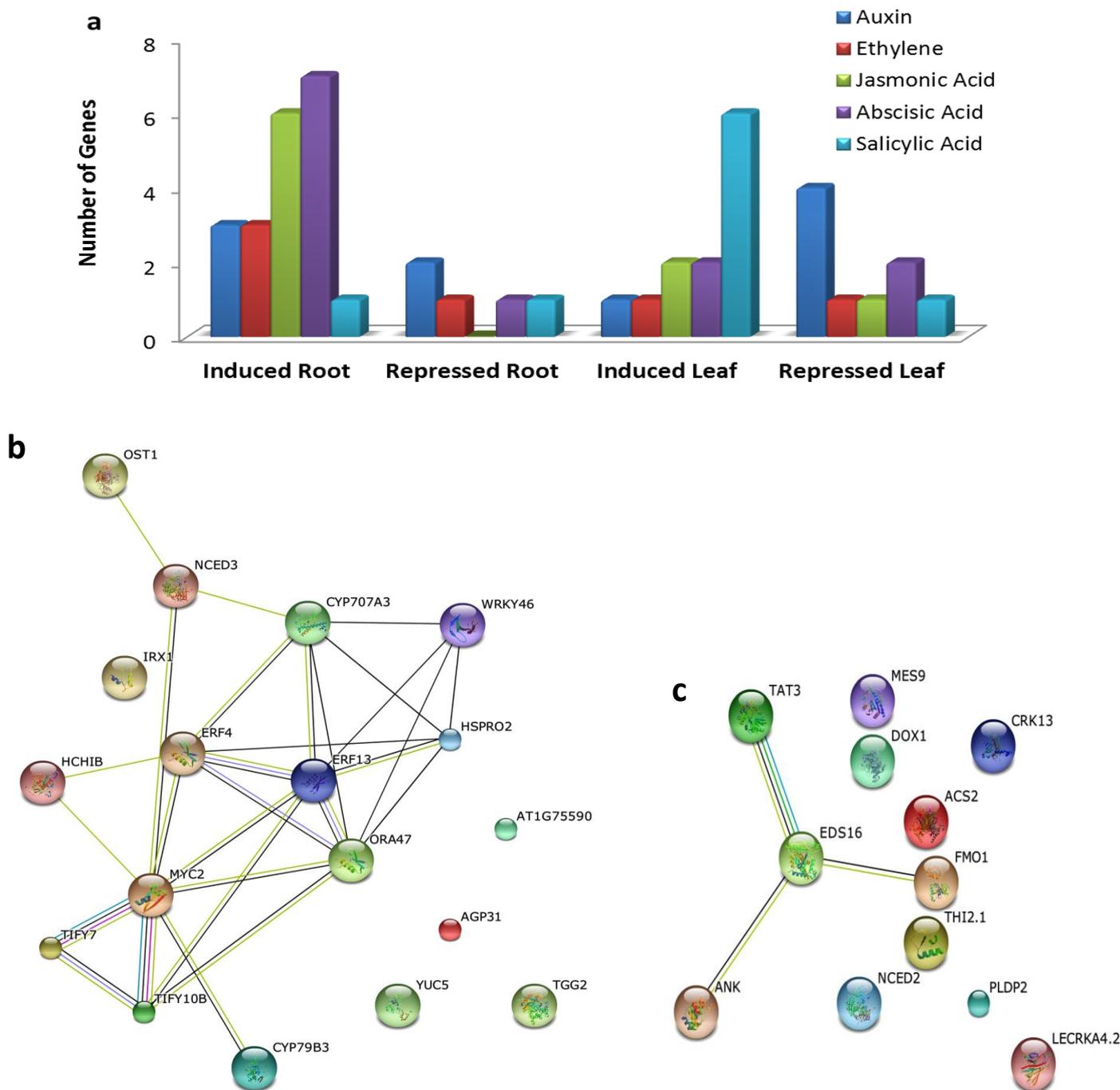


Fig. 4 Análise do número de genes relacionados com os principais fitormônios e da interação existente entre eles. Vários genes participantes das vias hormonais foram induzidos e reprimidos em tecidos de raiz e folhas de *A. thaliana* após inoculação com *G. diazotrophicus* PAL5 – GD-Kan (**a**). A rede de interação entre as proteínas induzidas nos tecidos de raiz (**b**) e folhas (**c**) foi determinada pelo banco de dados STRING. O banco de dados STRING 9.1 prevê uma rede de interação entre as proteínas, conforme mostrado na figura, para genes induzidos e reprimidos em raiz e folhas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 (GD-Kan). As arestas que conectam as esferas apresentam diferentes cores, as quais estão relacionadas com a evidência existente em cada interação. Aresta verde indica a proximidade de localização das proteínas no organismo analisado e aresta vermelha indica a ocorrência de fusão entre os genes. Já a aresta azul royal indica evidências de co-ocorrência, aresta preta indica evidências de co-expressão, aresta roxa indica evidências experimentais sobre a relação entre as proteínas, aresta azul turquesa indica evidência sobre a relação entre as proteínas baseada em informações disponíveis em banco de dados, aresta amarela indica evidência resultante da mineração de dados existentes na literatura e aresta cinza indica a existência de homologia entre as proteínas relacionadas. Os dados foram obtidos por meio de uma análise dos transcritos feita no banco de dados STRING 9.1, usando a ferramenta *GO Biological Processes*.

Além das diferenças encontradas entre as vias hormonais ativadas por *G. diazotrophicus* nos diferentes tecidos de *A. thaliana*, os níveis de expressão gênica também se mostraram diferenciados. Apesar de haver apenas 3 genes da via de ET induzidos em raízes, o fator de transcrição ERF4 apresenta o maior nível de indução se comparado aos demais genes (Fig. 5a). Em folhas nenhum gene foi induzido no mesmo nível de ERF4. No entanto, os padrões de indução para ABA e SA foram superiores aos observados em tecidos radiculares (Fig. 5b).

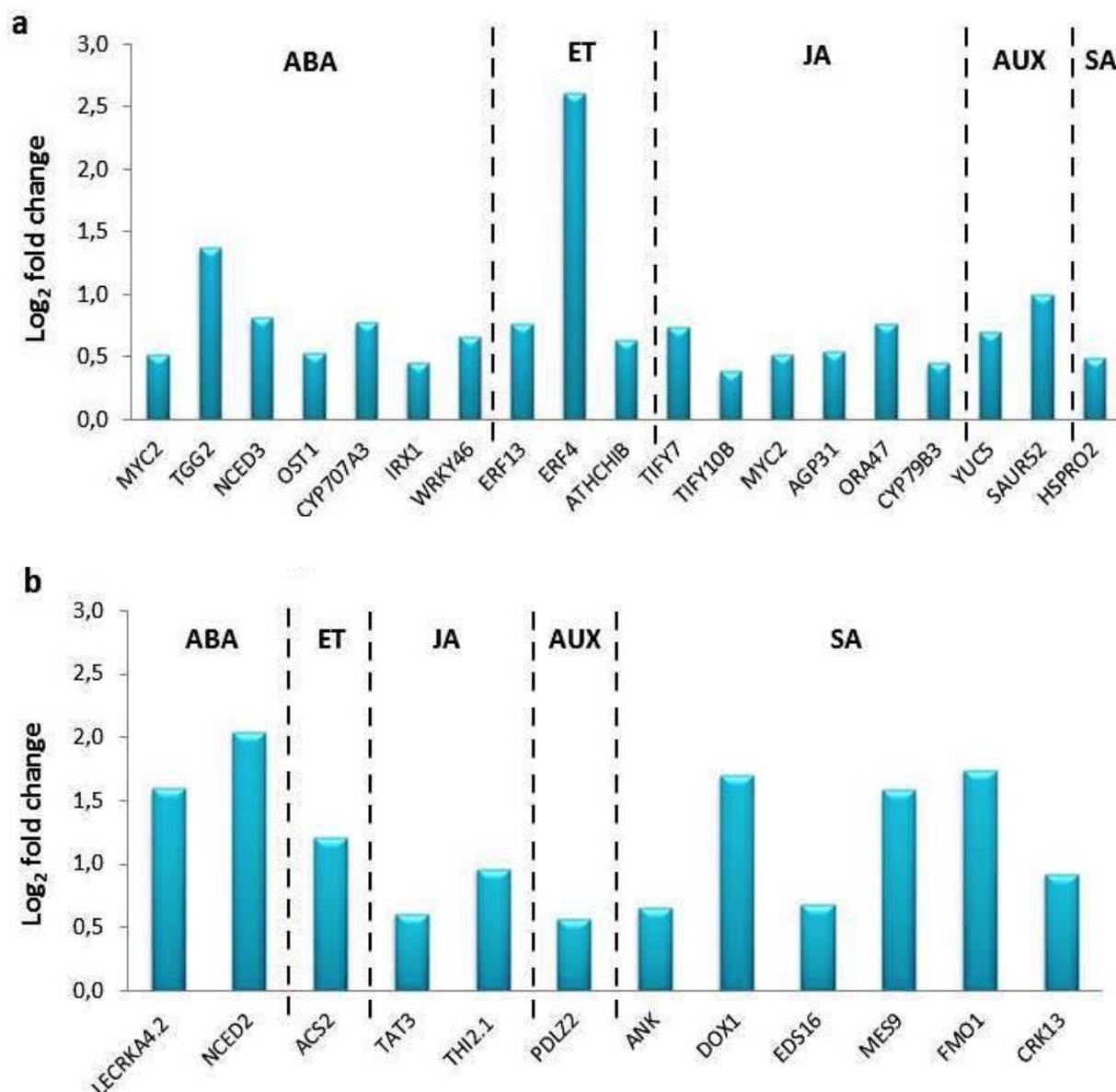


Fig. 5 Análise dos níveis de indução dos genes relacionados aos fitormônios em tecidos de raiz **(a)** e folhas **(b)** de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 (GD-Kan). As barras representam os valores de indução, em \log_2 fold change, obtidos após sequenciamento.

Ao analisar o conjunto gênico que sofreu repressão, observa-se que em tecidos de raiz o número de genes relacionados com as diferentes vias hormonais foi semelhante, porém nenhum gene da via de JA foi identificado (Fig. 6a). Os níveis de repressão variam entre os genes sendo que os mais afetados são os que atuam na via de SA. Nos tecidos foliares houve apenas 1 gene da via de JA e seu nível de repressão foi pequeno. Já o gene LTP4, que está diretamente relacionado com a defesa vegetal através da via de ABA, foi fortemente reprimido (Fig. 6b).

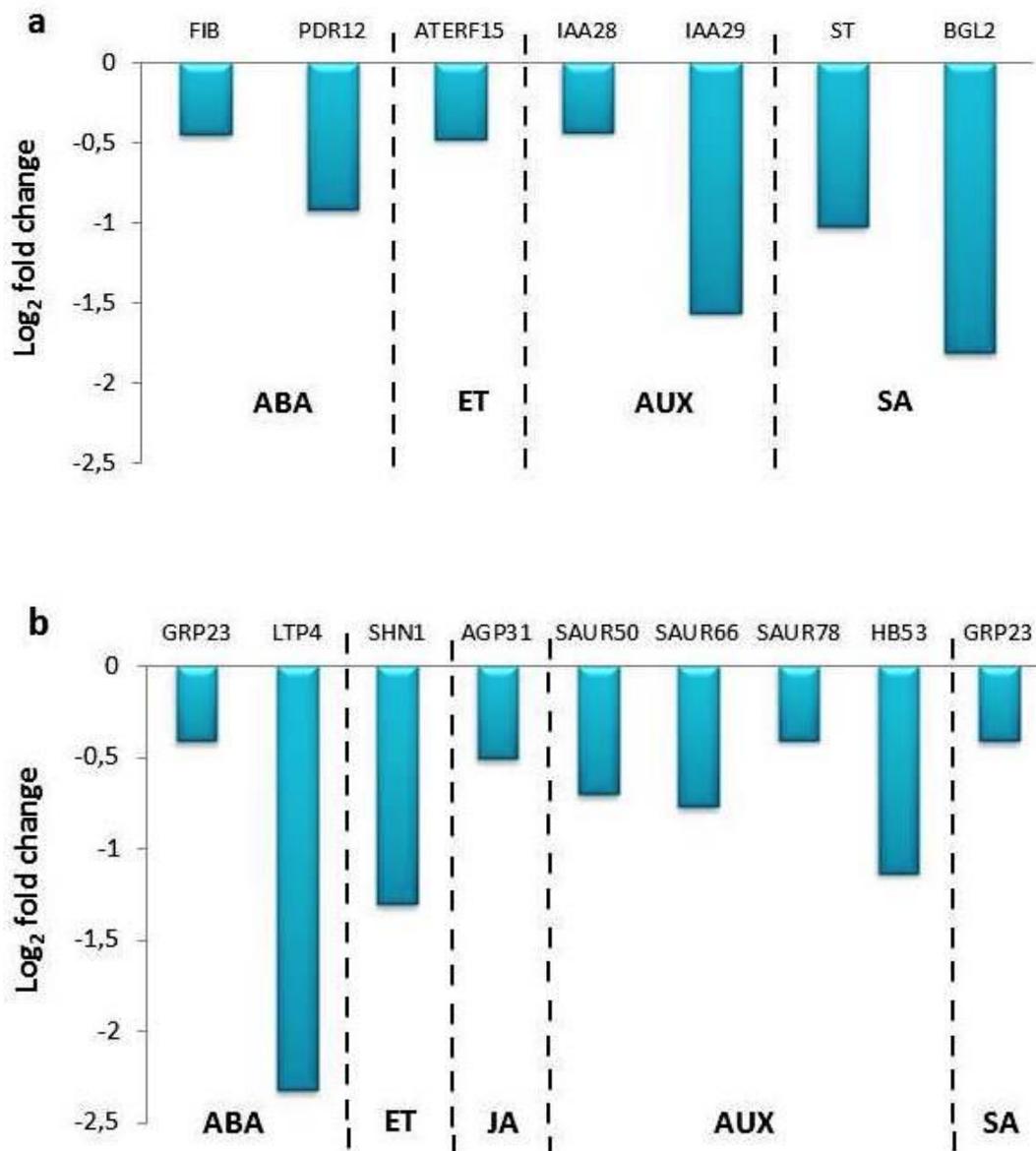


Fig. 6 Análise dos níveis de repressão dos genes relacionados aos fitormônios em tecidos de raiz **(a)** e folhas **(b)** de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 (GD-Kan). As barras representam os valores de indução, em \log_2 fold change, obtidos após sequenciamento.

G. diazotrophicus* coloniza o xilema radicular de diferentes genótipos de *A. thaliana

Nossos resultados anteriores (Capítulo I) demonstram que ocorre uma regulação da defesa vegetal por *G. diazotrophicus* em plantas de *A. thaliana*. Estes processos geram gastos de energia, o que pode ocasionar uma redução do crescimento vegetal. No entanto, a bactéria fornece outras vantagens como fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios que podem garantir a saúde e o desenvolvimento da planta. Devido à importância das vias hormonais durante a interação entre *G. diazotrophicus* e *A. thaliana*, demonstrada por meio dos dados de expressão gênica, buscou-se testar os efeitos das mutações em tais vias sobre a colonização bacteriana e a promoção do crescimento vegetal.

Primeiramente verificamos a capacidade da bactéria em colonizar os tecidos radiculares de plantas de *A. thaliana* mutantes afetadas em diferentes vias hormonais: *aux 1.7* (resistente à AUX), *ein 2.1* (insensível ao ET), *ein 3.1* (parcialmente sensível ao ET), *sid 2.2* (produção deficiente de SA), *npr1* (não expressão de proteínas PR), *NahG* (não acumula SA), *jar1* (resistente ao JA) e *abi4* (insensível ao ABA). Para verificar o comportamento endófito de *G. diazotrophicus* PAL5 no sistema radicular destes materiais, as plantas foram inoculadas com bactérias que tinham sido previamente transformadas com um plasmídeo de expressão de proteína fluorescente vermelha (RFP). O resultado obtido revela a colonização das raízes de *A. thaliana* em todos os genótipos testados. A microscopia de epifluorescência mostrou agregados bacterianos aderidos à parede celular secundária do lúmen do xilema radicular, apenas em plantas inoculadas, aos 50 dias após a inoculação (Fig. 7).

Adicionalmente, foi avaliada a concentração de bactérias presentes em parte do tecido radicular por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (CFU), 50 dias após a inoculação. O resultado obtido mostrou que *G. diazotrophicus* sobrevive e se multiplica nas raízes de plantas de *A. thaliana*, em concentração aproximada de 10^5 CFU g^{-1} . As diferenças encontradas entre a população bacteriana presente nos diferentes genótipos analisados não foram significativas (Fig. 8). Adicionalmente, foi observado que *G. diazotrophicus* coloniza tecidos foliares de plantas insensíveis ao ET (mutante *ein 2.1*) e deficientes no acúmulo de SA (transgênico *NahG*) na mesma concentração encontrada nas raízes. Nos demais genótipos a população bacteriana parece restringir-se ao sistema radicular ou está presente nas folhas em concentração não detectáveis pela técnica (dado não mostrado).

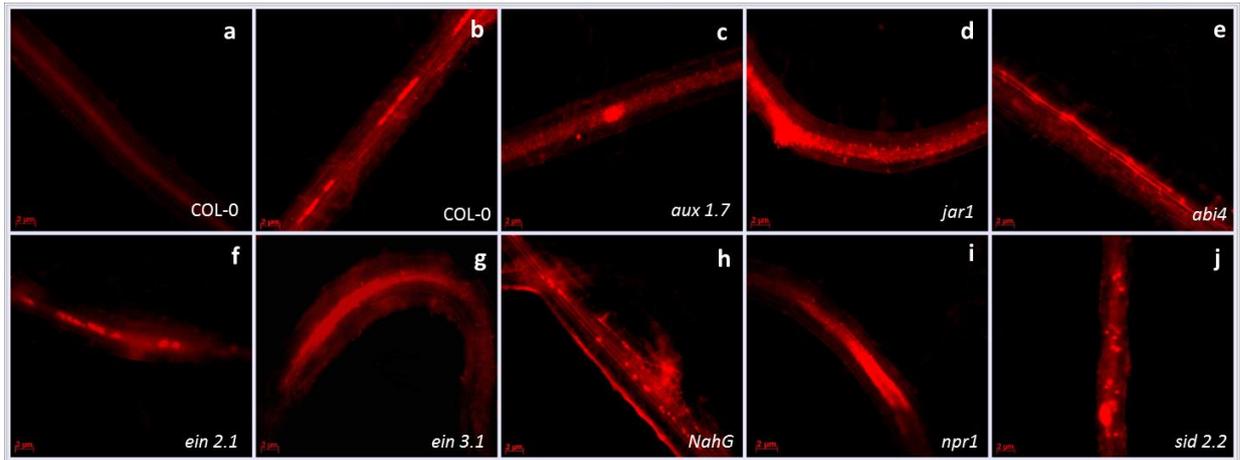


Fig. 7 Colonização endofítica das raízes de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* PAL5 (GD-F). Plantas de *A. thaliana* foram inoculadas *G. diazotrophicus* PAL5 contendo a proteína rfp e crescidas por 50 dias. Segmentos de raiz da planta inoculada apresentam a bactéria estabelecida no xilema radicular por microscopia fluorescente á 568 nm (aumento de 40X). Os segmentos radiculares de planta não inoculada (a), tipo selvagem COL-0 (b), *aux 1.7* (c), *jar1* (d), *abi4* (e), *ein 2.1* (f), *ein 3.1* (g), *NahG* (h), *npr1* (i) e *sid 2.2* (j) foram analisados.

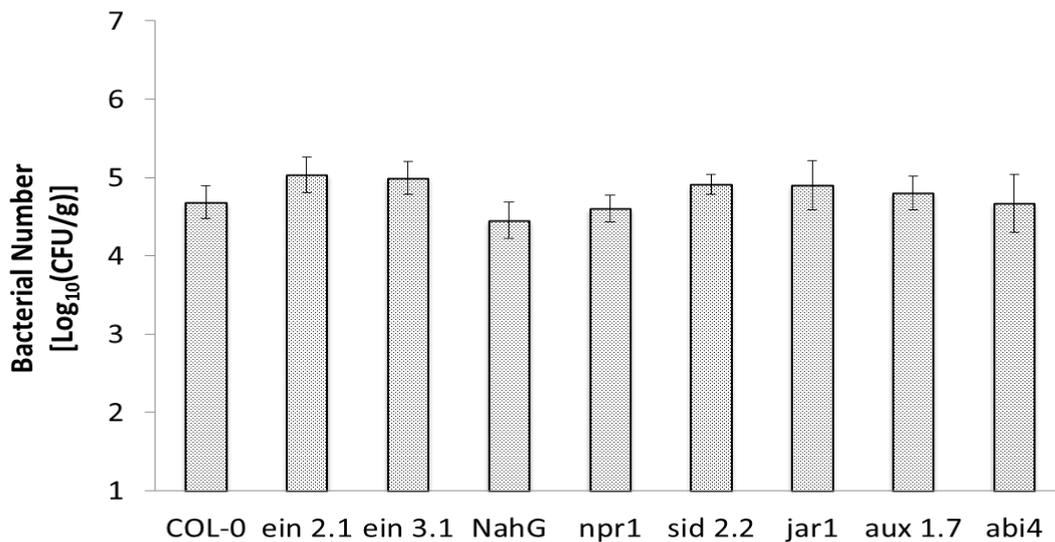


Fig. 8 População de *G. diazotrophicus* PAL5 (GD-Kan) obtida a partir dos tecidos radiculares de plantas de *A. thaliana* em diferentes genótipos. Nas plantas não inoculadas não houve detecção de bactérias. Este experimento foi repetido três vezes e apresentou resultados similares. As barras representam o desvio padrão.

Este resultado confirma a capacidade de *G. diazotrophicus* em colonizar endofiticamente plantas de *A. thaliana* e demonstra que mutações em diferentes vias hormonais não interferem nesse processo.

Algumas mutações nas vias hormonais e de defesa favorecem a capacidade de *G. diazotrophicus* em promover o crescimento

De posse dos dados mostrando que *G. diazotrophicus* coloniza os tecidos radiculares de diferentes genótipos de *A. thaliana* sem que a população bacteriana sofra alteração decorrente das mutações existentes na planta, buscou-se avaliar a capacidade da bactéria em promover o crescimento vegetal nos genótipos testados. Para tanto, foram realizadas diferentes análises anatômicas e morfológicas nas partes aérea e radicular. O registro da roseta foliar detectou diferenças fenotípicas interessantes entre plantas inoculadas e não-inoculadas. Nos genótipos *ein 2.1*, *NahG*, *npr1*, *sid 2.2*, *jar1* e *abi4*, as plantas inoculadas apresentaram maior crescimento da roseta foliar, além do tipo selvagem (Col-0), em relação a seus respectivos controles não inoculados (Fig. 9).

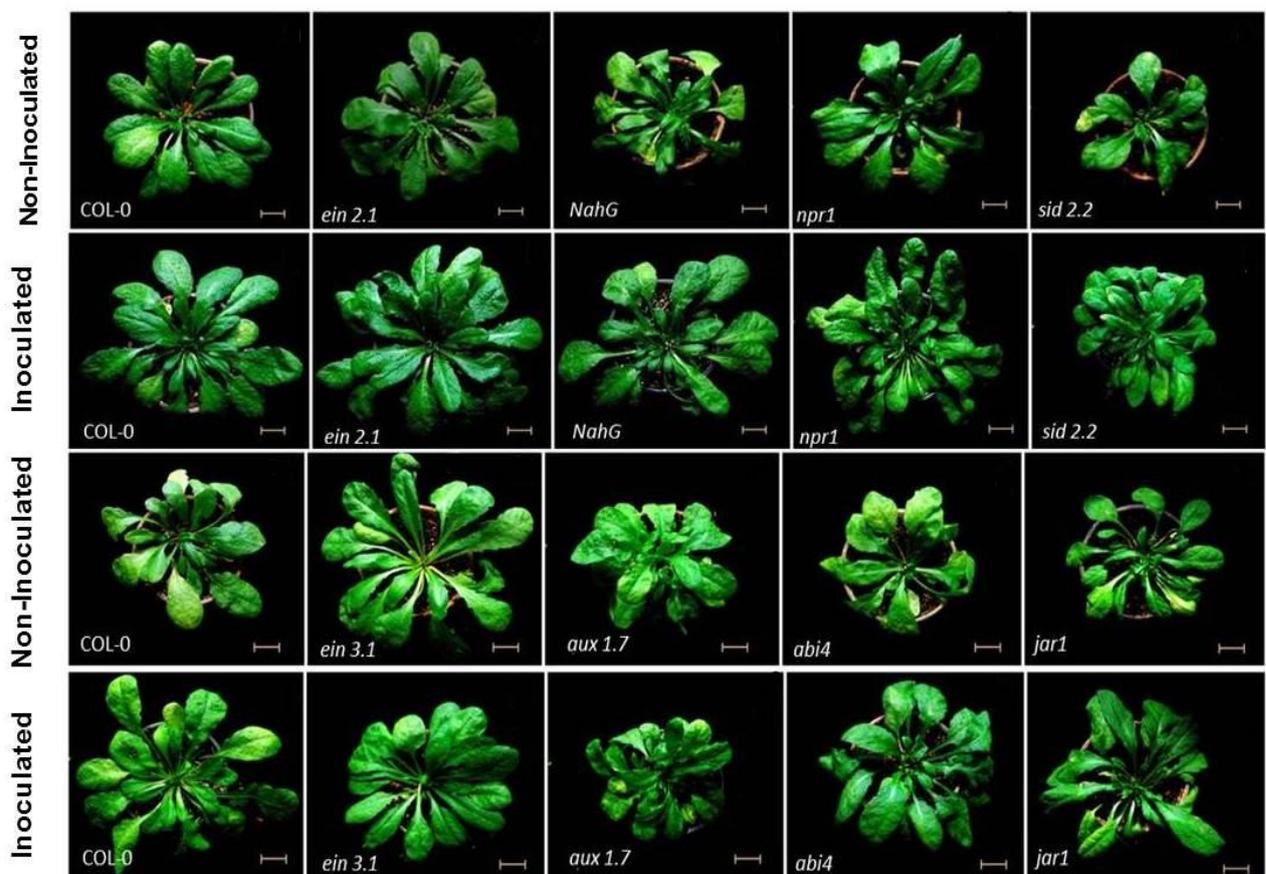


Fig. 9 Efeito da inoculação com *G. diazotrophicus* PAL5 na promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana*. Plântulas de 7 dias de idade foram inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 (GD-Kan) na concentração de 10^6 CFU mL⁻¹ e cresceram por 50 dias. O fenótipo de plantas inoculadas e não-inoculadas de diferentes genótipos foi registrado. As barras equivalem a 1.0 cm.

Para verificar esse resultado, foram realizadas análises específicas para parte aérea (roseta foliar) e radicular. Foi observado que a inoculação promove aumento no número de folhas da roseta para os mutantes *ein 2.1*, *NahG*, *npr1*, *sid 2.2* e *jar1*, além do efeito previamente observado para Col-0. Interessantemente, no mutante *aux 1.7* houve redução do número de folhas em consequência da inoculação (Fig. 10a). As análises de área foliar total confirmaram parcialmente estes resultados, visto que no mutante *abi4*, no qual não havia sido detectado aumento no número de folhas, houve acréscimo na área foliar total das plantas inoculadas (Fig. 10b). Esse dado sugere que na via regulada por ABA *G. diazotrophicus* não induz a formação de novas folhas, mas proporciona maior crescimento delas.

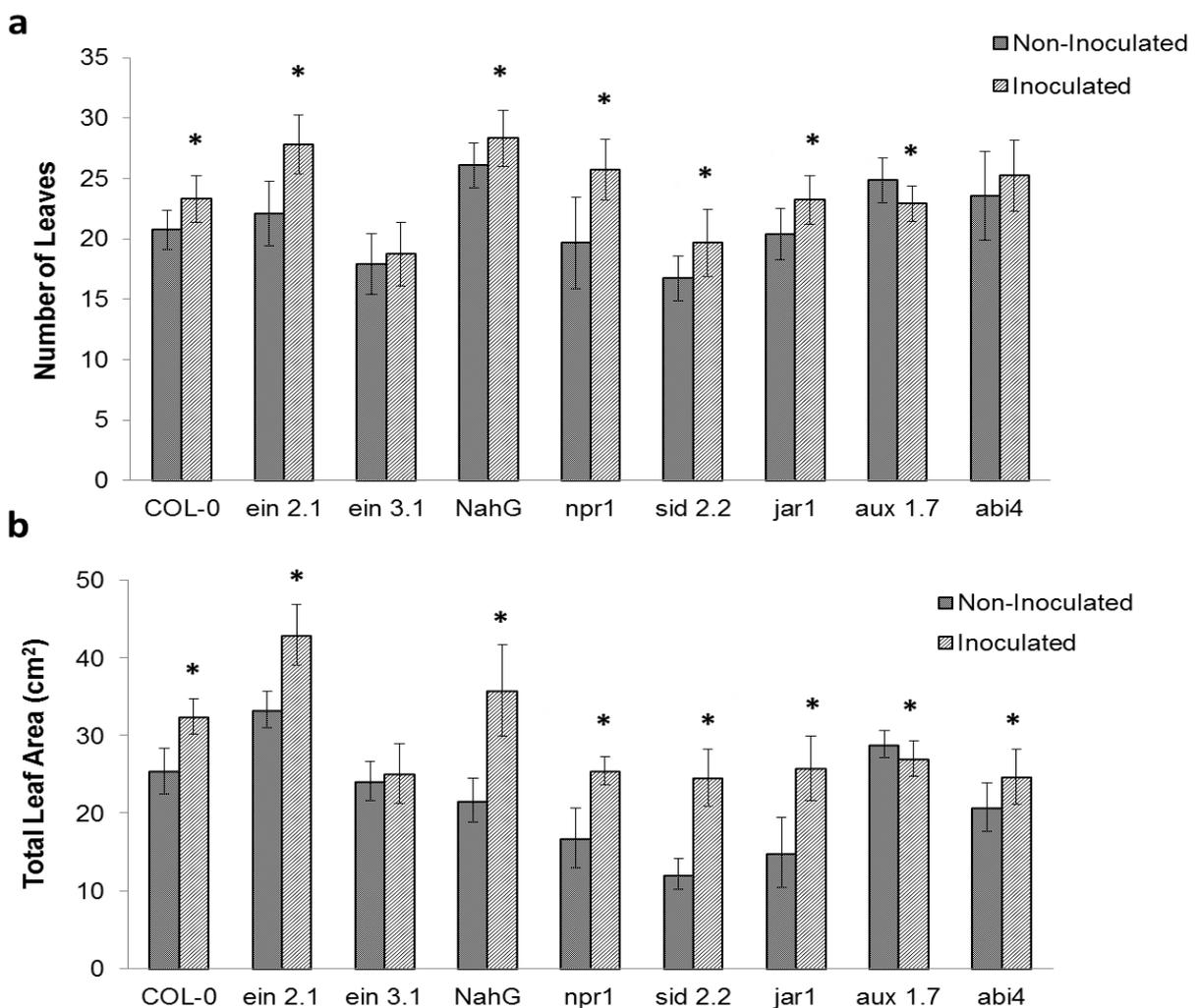


Fig. 10 Efeito na promoção do crescimento de *A. thaliana* inoculada com *G. diazotrophicus*. Plântulas de diferentes genótipos, aos sete dias de idade, foram inoculadas com GD-Kan (10^6 CFU mL⁻¹). Foram analisados o número de folhas (**a**) e a área foliar total (**b**) 50 dias após a inoculação (dpi). Vinte plantas de cada tratamento foram utilizadas para estas análises. Os experimentos foram repetidos três vezes e apresentaram resultados similares. As barras de erros representam o desvio padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos são representadas por * (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Para confirmar o efeito da promoção do crescimento de *A. thaliana* causada por *G. diazotrophicus*, foram verificadas as massas fresca e seca da roseta foliar e do sistema radicular de todas as linhagens mutantes e transgênicas, além do ecótipo Col-0. A linhagem transgênica *NahG* e o mutante *ein 2.1* foram os genótipos mais responsivos ao efeito de *G. diazotrophicus* no âmbito da promoção do crescimento da roseta foliar e do sistema radicular (Fig. 11).

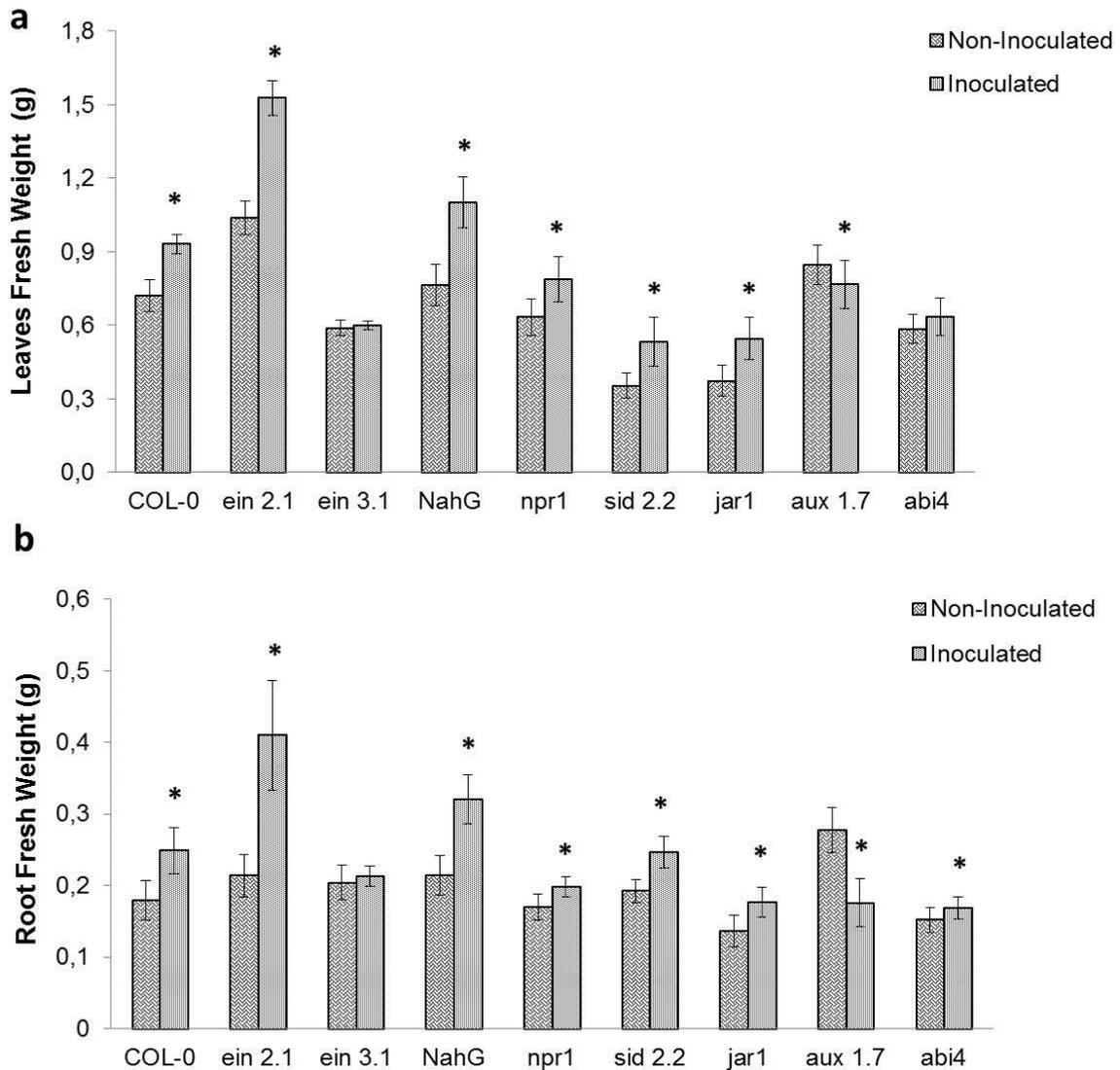


Fig. 11 Impacto da inoculação de *G. diazotrophicus* no crescimento da roseta foliar e raízes de plantas de *A. thaliana*. Plântulas de diferentes genótipos, aos sete dias de idade, foram inoculadas com GD-Kan (10^6 CFU mL⁻¹). As massas frescas da roseta foliar (**a**) e do sistema radicular (**b**) foram determinados 50 dias após a inoculação (dpi). Vinte plantas de cada tratamento foram utilizadas para estas análises. Os experimentos foram repetidos três vezes e apresentaram resultados similares. As barras de erros representam o desvio padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos são representadas por * (ANOVA, $p \leq 0,05$).

O efeito benéfico da bactéria sobre o crescimento da roseta foliar também foi comprovado nos mutantes *npr1*, *sid 2.2* e *jar1*, além de Col-0 (Fig. 11a). Interessantemente, o mutante *ein3.1* não se mostrou responsivo a este efeito no âmbito da promoção do crescimento vegetal. Em *abi4* a diferença observada entre plantas inoculadas e não-inoculadas não foi significativa, enquanto para o mutante *aux1.7* a inoculação gerou inibição do crescimento.

Quanto às análises de peso fresco de raízes, novamente não houve promoção do crescimento no mutante *ein3.1*, enquanto *aux1.7* teve o crescimento radicular inibido pela presença da bactéria. Nas demais linhagens foi detectada a promoção do crescimento radicular decorrente da inoculação (Fig. 11b).

As análises de massas secas da roseta foliar permitiram confirmar um aumento das folhas nos genótipos *ein 2.1*, *NahG* e *sid 2.2*. Para *npr1*, *jar1* e *abi4* o efeito de promoção do crescimento também foi notório (Fig. 12a). Ao contrário do que foi observado para peso fresco, no mutante *abi4* houve diferença significativa das massas secas entre plantas inoculadas e não-inoculadas.

Através das análises de massa seca das raízes foram detectados resultados de promoção do crescimento para a maioria das linhagens (Fig. 12b). Os resultados obtidos para os mutantes *ein 3.1* e *aux 1.7* na análise de massa fresca do sistema radicular foram confirmados após as massas secas terem sido verificadas. O mutante *ein3.1* não foi responsivo ao efeito da promoção de crescimento induzido pela inoculação, enquanto em *aux1.7* houve inibição do crescimento.

A análise de genótipos contendo mutações em diferentes regiões das vias hormonais sugere que tais pontos das vias de resposta a estes hormônios podem ser moduladores negativos do desenvolvimento vegetal desencadeado por *G. diazotrophicus*.

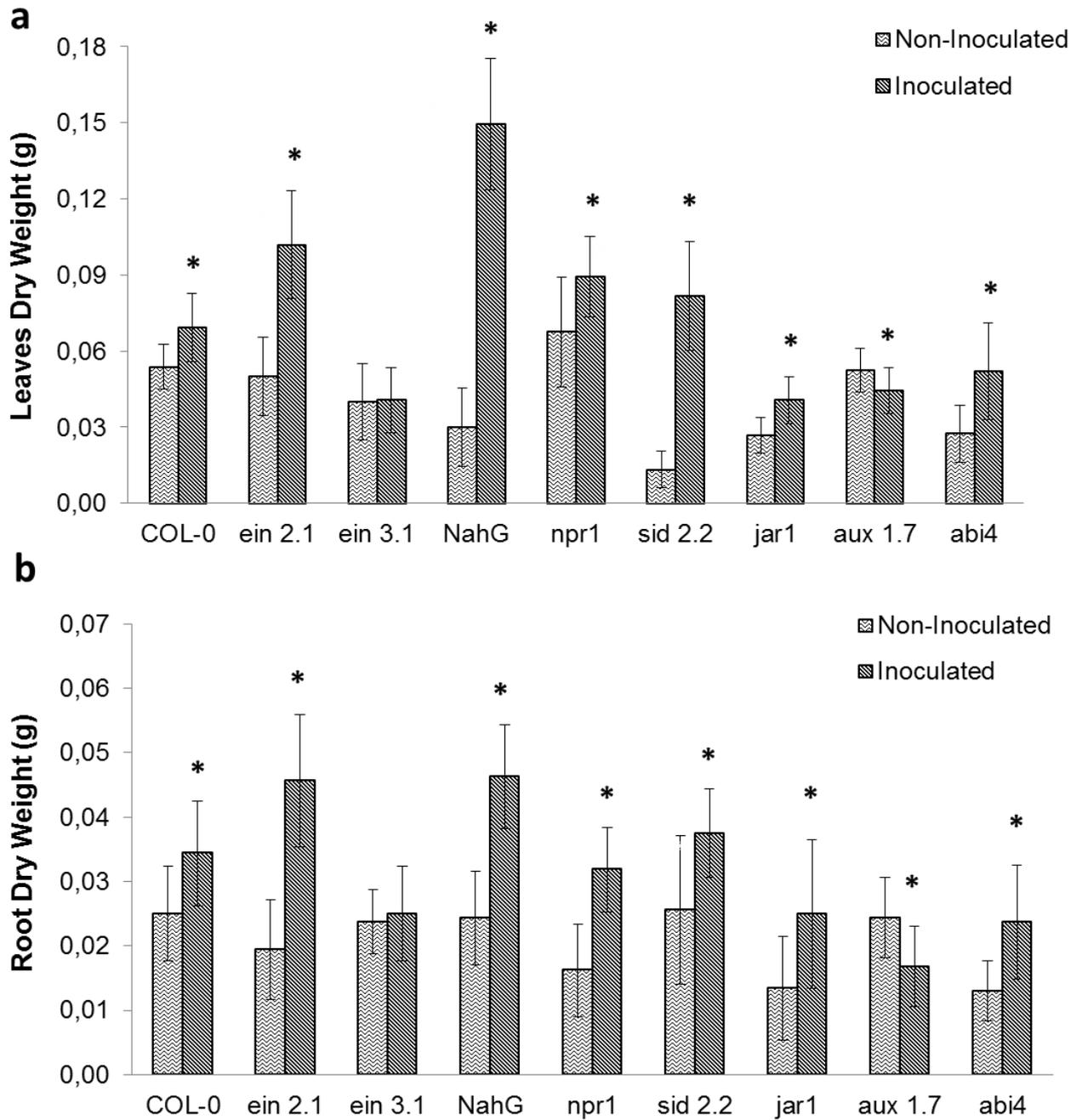


Fig. 12 Efeito da inoculação de *G. diazotrophicus* no crescimento da roseta foliar e das raízes de plantas de *A. thaliana*. Plântulas de diferentes genótipos, aos sete dias de idade, foram inoculadas com GD-Kan (10^6 CFU mL⁻¹). As massas secas da roseta foliar (**a**) e do sistema radicular (**b**) foram determinados 50 dias após a inoculação (dpi). Vinte plantas de cada tratamento foram utilizadas para estas análises. Os experimentos foram repetidos três vezes e apresentaram resultados similares. As barras de erros representam o desvio padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos são representadas por * (ANOVA, $p \leq 0,05$).

DISCUSSÃO

A utilização de microrganismos promotores do crescimento vegetal pode desempenhar um papel importante no fornecimento de soluções viáveis para o uso excessivo de fertilizantes. Para isso é necessário compreender e explorar os aspectos moleculares que favorecem a interação com hospedeiros vegetais, a fim de desenvolver métodos para monitorar seu desempenho (Timmusk e Behers 2012; Timmusk et al. 2013; Kim e Timmusk, 2013).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria endofítica diazotrófica que promove o crescimento vegetal por meio de diversos mecanismos, sendo um deles a produção de fitormônios (Fuentes-Ramirez et al. 1993; Bastián et al. 1998). Em nosso trabalho anterior (*em publicação*) observamos que *G. diazotrophicus* PAL5 coloniza endofiticamente raízes de *A. thaliana* (tipo selvagem, Col-0) e promove seu crescimento, melhorando as taxas fotossintéticas e a eficiência do uso da água. *A. thaliana* constitui, portanto, uma ferramenta útil para estudos moleculares da interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal (Rangel de Souza et al. 2015).

No presente trabalho, buscamos estudar a regulação da expressão gênica de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus*, através de análises transcriptômicas de amostras extraídas de raízes e folhas da roseta de plantas inoculadas. Os dados revelaram indução de várias vias de regulação de processos biológicos, como aquelas relacionadas com transporte e metabolismo de nitrogênio, vias hormonais e de defesa vegetal. Considerando a importância da regulação destas vias, foi analisado o efeito de mutações nas mesmas sobre a capacidade de *G. diazotrophicus* em colonizar e promover o crescimento de *A. thaliana*. Os resultados obtidos mostraram que a concentração bacteriana nas raízes foi similar em todos os genótipos, entretanto as vias hormonais parecem afetar de modo diferencial a promoção do crescimento vegetal.

A presença de PGPB em interações com plantas tem sido relacionada com o favorecimento da capacidade vegetal na assimilação de nitrato (Kraiser et al. 2011; Mantelin e Touraine, 2004). Em nosso trabalho, os dados de transcriptômica sugerem que isto ocorre porque *G. diazotrophicus* induz a expressão de genes relacionados com proteínas transportadoras de nitrato, tais como NRT2.4, NIR1, ATNRT2:1 e NRT1.

A localização de *G. diazotrophicus* no xilema radicular induziu a expressão de genes específicos, como o NCED3 e IRX1, que atuam na fixação de componentes da parede celular secundária e consequente produção de vasos do xilema (Endo et al. 2008; Hernández-Blanco et al. 2007). Outro gene induzido, CYP707A3, regula os níveis

sistêmicos de ABA no tecido vascular em resposta às condições ambientais (Okamoto et al. 2009). A indução do gene de tecido vascular AGP31, relacionado com a via de JA, sugere seu envolvimento tanto na resposta de defesa quanto no desenvolvimento vegetal (Liu e Mehdy, 2007). Estes dados corroboram com o fato de *G. diazotrophicus* estar confinada nos vasos xilemáticos dos genótipos analisados. No entanto, os efeitos causados pela presença da bactéria na raiz da planta diferem entre eles. Esta análise revelou que certas mutações nas vias hormonais favorecem o efeito benéfico quanto ao desenvolvimento vegetal, mas outras prejudicam. Tais resultados sugerem que as vias hormonais são essenciais não por modular a população bacteriana dentro da planta, mas para melhorar sua capacidade em responder ao estímulo benéfico proporcionado pela bactéria no âmbito da promoção do crescimento e da fisiologia vegetal.

Através da análise de transcritos regulados, observou-se a indução de genes relacionados com os hormônios ABA, JA, ET e AS. Em raízes as vias relacionadas com ABA e JA foram fortemente induzidas. O gene OST1, que codifica a proteína quinase SnRK2, controla a resposta de ABA no crescimento radicular de *Arabidopsis* e medeia a maior parte da sinalização deste hormônio (Cramer et al. 2011; Fujii e Zhu, 2009). De modo semelhante, os genes MYC2 e NCED3 atuam nas respostas primárias relacionadas com o crescimento vegetal (Harb et al. 2010). Sendo estes genes da via de ABA diretamente envolvidos no crescimento e desenvolvimento da planta, justifica-se o modesto efeito da promoção do crescimento por *G. diazotrophicus* no mutante *abi4*. Outro gene da via de ABA envolvido no crescimento vegetal é o CYP707A3, que atua no crescimento da planta pós-germinação (Okamoto et al. 2009). O gene CESA4, induzido por brassinosteróides, fitormônios que desempenham importantes papéis na regulação do alongamento e tamanho das células, contribui para o crescimento secundário (Xie et al. 2011). A expressão destes genes em plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 confirma a ativação de vias que favorecem a promoção do crescimento vegetal. Dentre os genes reprimidos em raízes destaca-se o PDR12, membro da família AtPDR, que participa da regulação do crescimento mediada pela sinalização e transporte de fitormônios (Migocka et al. 2012) e o gene ST, que atua na resposta vegetal à infecção por microrganismos e no estabelecimento da SAR (Pathange et al. 2010). A repressão da defesa vegetal mediada por SA parece ser fundamental para o efeito da bactéria na promoção do crescimento vegetal.

Em folhas é evidente a indução de genes relacionados com as vias de SA, sugerindo que a presença de *G. diazotrophicus* regula de forma diferenciada as vias

hormonais nos diferentes tecidos. O desenvolvimento de uma resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas dicotiledôneas como *Arabidopsis* é mediada por SA (de Vos et al. 2006; Durrant e Dong, 2004; Pieterse et al. 1996; Vlot et al. 2009). Dados existentes na literatura têm demonstrado que o tratamento com ABA suprime a indução de SAR, independentemente das vias de sinalização mediadas por ET e JA. Por outro lado, a ativação da SAR suprime a expressão de genes relacionados com a biossíntese de ABA e a ele responsivos, em um processo que conta com a contribuição de NPR1 (Yasuda, 2008). Nossos dados de transcriptoma revelam que a inoculação de *A. thaliana* com *G. diazotrophicus* induziu a expressão de 6 genes da via de ABA e apenas 1 gene relacionado com a via de SA, em raízes, corroborando com esta hipótese. Pode ser que, na ausência de ABA (mutante *abi4*) ocorra atuação efetiva da SAR, reprimindo o efeito bacteriano na promoção do crescimento vegetal. Na ausência de SAR (mutante *npr1*) a atuação bacteriana no âmbito da promoção do crescimento parece ser favorecida. Nos outros genótipos deficientes na produção ou acúmulo de SA (*NahG* e *sid 2.2*) *G. diazotrophicus* também promove o crescimento de maneira eficiente. Interessantemente, este hormônio participa ativamente na defesa vegetal contra microrganismos patogênicos. Na ausência dele os patógenos obtêm sucesso na colonização. No entanto, esta via também parece estar envolvida na atuação benéfica de *G. diazotrophicus* durante a interação com *A. thaliana*, o que também já foi descrito para outros microrganismos benéficos (Pieterse et al. 2014). Adicionalmente, a indução de vários genes da via de SA em folhas, os quais são envolvidos na defesa contra bactérias, justifica a ausência de *G. diazotrophicus* neste tecido.

Em raízes o único gene da via de SA induzido foi o HSPRO2. Dados da literatura revelam que na presença de ET e JA a expressão deste gene não ocorre devido à regulação negativa destes hormônios. Além disso, nos mutantes *ein2* e *jar1* a expressão de HSPRO2 ocorre após um ataque patogênico. (Murray et al. 2007). Em nosso trabalho observamos que a indução deste gene por *G. diazotrophicus* parece não atenuar o efeito da bactéria na promoção do crescimento vegetal, visto que nos mutantes *ein 2.1* e *jar1* a mesma foi evidente. Diversos trabalhos têm demonstrado que ET e JA estão envolvidos na defesa contra microrganismos benéficos do solo (Van Wees et al. 2008; Pineda et al. 2010; Zamioudis e Pieterse 2012; Pieterse et al. 2014). No entanto, para *G. diazotrophicus* não há relatos sobre a participação destas vias hormonais no processo de colonização, apesar de já ter sido demonstrado que, em cana-de-açúcar, a inoculação com esta bactéria induz a expressão de genes envolvidos na síntese de ET

(Cavalcante et al. 2007). Adicionalmente, em nossas análises identificamos genes das vias de ET e JA que são importantes no estabelecimento da ISR, tais como MYC2, cuja ativação induz uma cascata de sinalização envolvendo fatores de transcrição (TFs) como ERF4, que atuam no antagonismo entre JA/ET e SA (Dombrecht et al. 2007). Em mutantes de *Arabidopsis* que não produzem ET, o basidiomiceto mutualístico *P. indica* não consegue estabelecer uma colonização simbiótica das raízes, a qual depende dos genes CHIB (quitinase) e ERF1 (Khatabi et al. 2012). Já o fungo mutualístico *L. bicolor* regula genes das vias de ET/JA e AS nos estágios finais da interação, sendo que na presença de ET e JA a colonização radicular é dificultada, havendo aumento da expressão do fator de transcrição ERF1 (Plett et al. 2014). Nossos resultados mostram que na ausência de ET (mutante *ein 2.1*) a promoção do crescimento desencadeada por *G. diazotrophicus* é fortemente favorecida durante sua associação com *A. thaliana*. Em interações com bactérias patogênicas, a perda de função de EFR4 causa resistência do patógeno, visto que a resposta imune da planta fica limitada (Oñate-Sánchez et al. 2007). Considerando que a presença de *G. diazotrophicus* induz a expressão de diversos genes tipicamente expressos em resposta a bactérias patogênicas, é possível que sua interação com fatores de transcrição da via de ET ocorra de modo semelhante ao que acontece com patógenos. MYC2 também induz deposição de calose pela via de ABA como uma resposta sistêmica desencadeada pela ISR após o contato entre microrganismos benéficos e a raiz da planta (Wager e Browse, 2012). Este gene se liga a EFR4 e ambos passam a regular tanto a defesa vegetal quanto o crescimento radicular (Figueroa e Browse, 2012). A expressão do gene ORA47 pode ser justificada pela forte participação de MYC2, ao qual ele é responsivo, no estabelecimento da colonização de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus*.

Além dos genes cujos efeitos estão relacionados com respostas sistêmicas adquirida (SAR) e induzida (ISR), nossas análises de expressão gênica revelam que *G. diazotrophicus* induz a expressão de genes envolvidos com resposta de defesa inata, tanto em folhas quanto em raiz. Esses dados sugerem que, embora *G. diazotrophicus* seja uma bactéria benéfica, ela ativa o sistema de defesa da planta, sendo que os conjuntos gênicos regulados diferem entre os tecidos. Nos tecidos foliares, todos os genes induzidos estão relacionados com defesa contra patógenos, defesa em geral ou morte celular, sendo a maioria deles envolvida na defesa contra bactérias patogênicas. O gene WRKY46 atua na via de sinalização mediada por SA, regulando a resistência basal da planta contra o patógeno *P. syringae* (Hu et al. 2012). Possivelmente *G.*

diazotrophicus ativa a produção de SA pela planta como uma resposta de defesa que, por sua vez, induz a expressão de WRKY46. A via de resposta ativada por SA é tipicamente (mas não exclusivamente) efetiva contra patógenos biotróficos (Glazebrook, 2005; Pieterse et al. 2014). Ambos os genes IRX1 e NCED3 induzem ativação da defesa vegetal e consequente produção de compostos antimicrobianos (Hernández-Blanco et al. 2007; Sánchez-Vallet et al. 2012). Outro indício de ativação da defesa da planta é a produção de glucosinolatos (metabólitos antimicrobianos requeridos para a resposta imune vegetal), a qual é induzida pelos genes TGG2 e CYP79B3 (Barth e Georg Jander, 2006; Islam et al. 2009; Mikkelsen et al. 2003; Clay et al. 2009; Hiruma et al. 2013). Dentre os genes reprimidos nas folhas da roseta de plantas inoculadas LTP4 foi o que apresentou maior nível de repressão. Este gene está relacionado com a via de ABA e atua diretamente no estabelecimento da defesa vegetal (Brotman et al. 2012). Nossos dados sugerem que, quando raízes de *A. thaliana* são inoculadas com *G. diazotrophicus* ocorre ativação das mesmas vias reguladas por *P. syringae*, quando infiltrada em tecidos foliares, confirmando que o sistema de defesa na folha é claramente ativado pela presença da bactéria na raiz.

Apesar de haver efeito de promoção do crescimento na maioria dos genótipos analisados, nos mutantes *ein 3.1* e *aux 1.7* a mesma não ocorreu. O fator de transcrição EIN3 é um regulador negativo da imunidade ativada por PAMPs e repressor do gene ICS/SID2, causando um acúmulo reduzido de SA (Chen et al. 2009). Nosso dado sugere que no mutante *ein 3.1* a defesa passa a ser desreprimida, prejudicando a ação de *G. diazotrophicus* no âmbito de seu efeito promotor do crescimento, apesar de haver colonização. O fator de transcrição EIN3 mostra-se, portanto, essencial para a promoção do crescimento, visto que na ausência dele a mesma não ocorre. Já os genes CYP79B3 e YUCCA5 estão envolvidos na produção de AUX e resposta a estímulos desencadeados por este hormônio, o qual desempenha um papel crítico em diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta (Jones et al. 2010; Kim et al. 2007). A repressão do desenvolvimento vegetal observada no mutante *aux1.7* suporta a hipótese de que a percepção deste hormônio é importante para a modulação da defesa contra a bactéria. Na ausência desta percepção de AUX, a presença da bactéria poderia gerar um efeito deletério para o crescimento vegetal, sendo evidente a importância deste fitormônio para a interação. Neste sentido, é possível especular que vias hormonais podem atuar de forma positiva ou negativa no âmbito da promoção do crescimento vegetal, a depender do papel de cada hormônio nos mecanismos de defesa vegetal.

CONCLUSÃO

Ao colonizar endofiticamente raízes de *A. thaliana* e promover o crescimento vegetal, *G. diazotrophicus* ativa importantes vias metabólicas, dentre as quais destacam-se as respostas hormonais e os mecanismos de defesa. Nossas análises de expressão gênica revelaram forte indução de genes envolvidos nas vias de ABA e JA em raízes e de genes relacionados com ativação da defesa vegetal pela via de SA em folhas. Apesar de colonizar raízes de plantas com mutações nas vias hormonais, os padrões de promoção do crescimento são diferenciados entre os mutantes testados. Este trabalho, portanto, abre interessantes perspectivas para o estudo dos mecanismos moleculares que envolvem a interação entre plantas e PGPB, visando maior esclarecimento sobre as principais vias reguladas durante a interação.

Acknowledgments: Esta pesquisa recebeu suporte do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT-FBN). O primeiro autor recebeu bolsa de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPEs.

REFERÊNCIAS

- Baek D, Pathange P, CHUNG JS, Jiang J, Gao L, Oikawa A, Masami YH, Kazuki S, Pare PW, Shi, H. (2010) A stress-inducible sulphotransferase sulphonates salicylic acid and confers pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 33(8): 1383-1392
- Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goe RS, Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume. *Soil Biol Biochem* 29: 911-922
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24: 7-11

- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 11-18
- Brotman Y, Lisec J, Méret M, Chet I, Willmitzer L, Viterbo A (2012) Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Soc General Microbiol* 158(1): 139-146
- Burgess CM, Smid EJ, van Sinderen D (2009) Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. *Int J Food Microbiol* 133: 1-7
- Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42: 669-678
- de Vleeschouwer D, Höfte M (2009) Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. *Adv Bot Res* 51: 223-281
- Franken P (2012) The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: potential application and the biology behind. *Appl Microbiol Biotechnol* 96: 1455-1464
- Fuentes-Ramirez LE, Jimenez-Salgado T, Abarca-OCampo IR, Caballero-Mellado J (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil* 154: 145-150
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16: 463-471
- He CQ, Tan GE, Liang X, Du W, Chen YL, Zhi GY, Zhu Y (2010) Effect of Zn-tolerant bacterial strains on growth and Zn accumulation in *Orychophragmus violaceus*. *Appl Soil Ecol* 44: 1-5

- Intorne AC, de Oliveira MV, Lima ML, da Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* 191: 477-483
- Kloepper JW, Ryu C, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266
- Kumar KV, Srivastava S, Singh N, Behl HM (2009) Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *J Hazard Mater* 170: 51-57
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Hari K, Saravanan VS, Sa T (2006) Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Pest Biochem Physiol* 84: 143-154
- Mavrodi DV, Joe A, Mavrodi OV, Hassan KA, Weller DM, Paulsen IT, Loper JE, Alfano JR, Thomashow LS (2011) Structural and functional analysis of the type III secretion system from *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *J Bacteriol* 193: 177-189
- Migocka M, Papierniak A, Warzybok A, Kłobus G (2012) CsPDR8 and CsPDR12, two of the 16 pleiotropic drug resistance genes in cucumber, are transcriptionally regulated by phytohormones and auxin herbicide in roots. *Plant Growth Regul* 67(2): 171-184
- Muthukumarasamy R, Revathi G, Vadivelu M (2000) Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. *Curr Sci* 78: 1063-1065
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308-316
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, van Wees SC, Bakker PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52: 1-29

- Pineda A, Zheng S-J, Van Loon JJA, Pieterse CMJ, Dicke M (2010) Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends Plant Sci* 15: 507–14
- Piñón D, Casas M, Blanch M, Fontaniella B, Blanco, Vicente, Solas MT, Legaz ME (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Res Microbiol* 153: 345-351
- Pozo MJ, Azcon-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* 10: 393-398
- Rani MU (2012) Screening of rhizobacteria containing plant growth promoting (PGPR) traits in rhizosphere soils and their role in enhancing growth of pigeon pea. *Afr J Biotechnol* 11(32)
- Reinhold-Hurek B, Hurek T (1998) Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Crit Rev Plant Sci* 17(1): 29-54
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 49: 317-343
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M, Sa TM (2008) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microb Ecol* 55: 130-140
- Singh JS, Pandey VC, Singh DP (2011) Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agric Ecosyst Environ* 140: 339-353
- Smol JP (2012) A planet in flux. *Nature* 483: 12-15

- Timmusk S, Abd El-Daim IA, Copolovici L, Tanilas T, Kannaste A, Behers L, Nevo E, Seisenbaeva G, Stenstrom E, Niinemets U (2014) Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS ONE* 9: e96086
- Van der Ent S, Van Wees SC, Pieterse CM (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70: 1581-1588
- Van Loon LC, Bakker PAHM (2006) Root-associated bacteria inducing systemic resistance. *Plant-Associated Bacteria*: 269-316
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot* 64: 1263-1280
- Weller DM, Mavrodi DV, van Pelt JA, Pieterse CM, van Loon LC, Bakker PA (2012) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 102: 403-412
- Zaidi S, Usmani S, Singh BR, Musarrat J (2006) Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 64: 991-997
- Zamioudis C, Pieterse CM (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 139-150
- Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z (2007) New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ Int* 33: 406-413

CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho dedicou-se à análise de diversos aspectos envolvidos na interação entre *Arabidopsis thaliana* e a bactéria endofítica diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolada de espécies economicamente importantes, que promove o crescimento vegetal graças às suas características e potencialidades, constituindo um interessante modelo para pesquisas relacionadas à PGPB. O estudo dos mecanismos moleculares que permeiam a interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal é uma ferramenta que permite potencializar estas associações, fundamentais às demandas agronômicas.

O primeiro artigo resultante desta tese, em fase de publicação pela revista *Plant and Soil*, mostra que *G. diazotrophicus* é capaz de colonizar tecidos de *A. thaliana*, promovendo o crescimento, garantindo maior capacidade fotossintética e tornando as plantas mais eficientes no uso da água. Além disso, foi demonstrada a participação da via de sinalização mediada por SA e ativação da defesa vegetal nas fases iniciais da interação entre *A. thaliana* e *G. diazotrophicus*. Este foi o primeiro trabalho mostrando que esta bactéria coloniza endofiticamente raízes de *A. thaliana* e promove seu crescimento. Esta associação constitui, portanto, um sistema modelo promissor para estudo dos aspectos moleculares relacionados com o mecanismo de interação entre microrganismos endofíticos e plantas economicamente importantes.

Nossos estudos posteriores (Capítulo II) dedicaram-se a investigar a regulação da expressão gênica promovida por *G. diazotrophicus* em folhas e raízes de plantas de *A. thaliana*. As análises revelaram que *G. diazotrophicus* regula conjuntos gênicos distintos nos diferentes tecidos, ativando vias de defesa relacionadas com diferentes hormônios. Posteriormente investigamos a importância destas vias no estabelecimento da colonização e promoção do crescimento vegetal, por meio do uso de diferentes genótipos. Os resultados obtidos mostraram que os hormônios etileno, auxina e ácido abscísico são cruciais para o sucesso da interação, sendo que na ausência deles não ocorre promoção do crescimento, ainda que a bactéria seja capaz de colonizar os tecidos internos da planta. Em contrapartida, outros atuam como reguladores negativos durante a interação, com ênfase ao ácido salicílico, na ausência dos quais os efeitos benéficos proporcionados pela bactéria são favorecidos. Embora análises confirmatórias da expressão gênica ainda necessitem ser realizadas, as informações obtidas até o momento contribuem para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na associação entre plantas e PGPB, com ênfase na bactéria *G. diazotrophicus*.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- ❖ Confirmar a indução dos principais genes de *A. thaliana* regulados positivamente em decorrência da inoculação com *G. diazotrophicus*;
- ❖ Validar a importância de genes relacionados com processos metabólicos essenciais durante a associação entre *A. thaliana* e *G. diazotrophicus*, através da análise da interação entre esta bactéria e mutantes vegetais específicos;
- ❖ Analisar a população bacteriana presente no sistema radicular completo dos diferentes linhagens vegetais afetadas em vias hormonais, em diferentes fases da interação, a fim de estudar a dinâmica da colonização de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* e entender a influência dos hormônios neste processo;
- ❖ Avaliar a aplicabilidade de *A. thaliana* como modelo de estudo da interação com outras bactérias promotoras do crescimento vegetal, tais como *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*;
- ❖ Estudar os mecanismos específicos de defesa vegetal ativados durante a interação com *G. diazotrophicus*, a fim de potencializar a associação desta bactéria com seus principais hospedeiros.

