Carolina Krebs Kleingesinds

Bactérias diazotróficas em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): identificação, sinalização e colonização dos tecidos foliares

Diazotrophic bacteria in *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): identification, signaling and leaf tissue colonization

São Paulo

2016

Carolina Krebs Kleingesinds

Bactérias diazotróficas em *Guzmania*
monostachia (Bromeliaceae): identificação,
sinalização e colonização dos tecidos foliares

Diazotrophic bacteria in *Guzmania*
monostachia (Bromeliaceae): identification,
signaling and leaf tissue colonization

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências Biológicas, na Área
de Botânica. **Versão corrigida.**
Exemplar original encontra-se
disponível no IB, USP.

Orientador(a): Helenice Mercier
Co-orientador: Marcos P. M. Aidar

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Kleingesinds, Carolina Krebs

Bactérias diazotróficas em Guzmania monostachia (Bromeliaceae): identificação, sinalização e colonização dos tecidos foliares

93p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio
2. Bromélia I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Não basta apreciar a beleza de um jardim,
sem ter que imaginar que há fadas nele?

Douglas Adams
(Trad. Paulo Fernando Henriques Britto e Carlos Irineu da Costa)

Agradecimentos

À Profa. Dra. Helenice Mercier pelas oportunidades oferecidas e pelas sugestões ao longo de todo o doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcos P. M. Aidar pela compreensão e por incentivar a independência e crescimento de seus alunos.

Ao Programa de Pós-graduação do IB, USP, ao CNPq, a CAPES e a FAPESP.

À Dra. Maria Aurineide pelos ensinamentos de bancada e pelas valiosas sugestões de escrita em artigo.

Ao Prof. Dr. Diego por toda sua paciência, atenção e sempre me acompanhando às sessões do confocal. Também agradeço às suas alunas pela gentileza.

Ao Prof. Dr. Leonardo de Melo Versieux e à Márcia pela ajuda com a coleta das folhas do ambiente natural em Guaramiranga, CE.

À Profa. Dra. Rose Adele da UFPR por ceder plasmídios com genes de fluorescência e por ter me recebido em seu laboratório. Fico grata aos seus alunos Thalita e Estevan e aos demais alunos e técnicos do departamento de bioquímica da UFPR.

Aos professores Fábio L. Olivares, Gregório C. Gomez e Luciano Freschi pelas valiosas sugestões na minha banca de qualificação.

Aos membros da minha banca de defesa Ana Z. Gonçalves, Fábio L. Olivares, Halley C. de Oliveira e Welington L. de Araújo por todas as ideias que me deram para o desenvolvimento dos manuscritos.

Aos professores Heloiza e Welington do ICB, USP, assim como aos técnicos Íris e Aelson pela ajuda principalmente nas etapas iniciais deste trabalho, por disponibilizar equipamentos, materiais e pelas sugestões. Agradeço também aos seus alunos que sempre foram muito gentis.

Aos técnicos do IB, USP, Aline B., Ana, Willian (LFDV) agradeço pela ajuda com a execução de alguns experimentos e por conseguir materiais. À Sílvia (laboratório de genética molecular de plantas) pelos materiais e à Tatiana (GateLab) pelo grande auxílio com protocolos e sugestões.

Aos técnicos de microscopia confocal Valdir (IB, USP) e Marco (CEFAP, USP) pela atenção. Agradeço ao IB, USP e ao CEFAP (ICB, USP) por ter utilizado seus equipamentos.

Aos secretários do departamento e aos da pós-graduação pela atenção e ajuda com burocracia. Especialmente ao Norberto e Erika.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos alunos, ex-alunos e pós-docs do LFDV por desde o início terem me recebido tão bem, pela companhia e pelo grande espírito colaborativo. Muito obrigada ao Paulo, Alejandra, Rafael, Bruno, Filipe, Cassia, Perdigão, Dêvisson, Antônio, Paula, Dioceni, Grilo, Frederico, Alininha, Nielda, Aline B, Aline C, Paulinha Yumi, Bruna, Marília, Auri, Beth e Sabrina.

Ao meu tio Hermano e a Sra. Elaine Weiner, agradeço pelas correções do inglês no capítulo 1.

Aos amigos Tânia, Theresa, Diogo, Lina, Ricardo e Zilda pelas conversas sobre pesquisas.

A amiga Luciana por sempre ter enviado sugestões de vídeos, palestras e pela companhia em alguns almoços ao longo desses anos de USP.

Aos meus pais por terem priorizado a educação de seus filhos e ao meu irmão pela compreensão e por ter cedido sua cadeira presidencial magnífica que foi fundamental para o desenvolvimento do presente trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho, muito obrigada!

Sumário

Introdução Geral	9
1 A Família Bromeliaceae	9
2 Fixação Biológica do Nitrogênio	15
3 Interação entre micro-organismos e plantas.....	17
3.1 Interação entre bactérias diazotróficas e plantas	17
3.2 Interações com diferentes micro-organismos	18
3.3 Sinalização entre planta e bactéria	20
4 Identificação de bactérias.....	24
5 Bactérias diazotróficas em Bromeliaceae.....	25
Objetivos.....	28
 Capítulo 1	 30
1 Introduction	31
2 Materials and Methods	34
2.1 Plant material.....	34
2.2 Microorganisms	34
2.3 Procedures to separate epiphytic and endophytic bacteria	34
2.4 Procedures to isolate diazotrophic bacteria.....	35
2.5 Acetylene reduction assay (ARA).....	36
2.6 16S rRNA Sequencing	36
3 Results and Discussion.....	37

Capítulo 2	42
1 Introduction	43
2 Materials and Methods	46
2.1 <i>Microorganisms</i>	46
2.2 <i>Plants</i>	46
2.3 <i>Bacteria tagging with GFP</i>	48
2.4 <i>Inoculation of bacteria in G. monostachia plants</i>	49
2.5 <i>Analysis of signaling molecules</i>	49
2.5.1 Endogenous NO content	50
2.5.2 Endogenous IAA and SA content	50
2.5.3 Ethylene emission analysis	51
2.6 <i>Monitoring the bacteria colonization</i>	51
2.6.1 Confocal microscopy analysis.....	51
2.6.2 Estimation of external and internal bacterial population	52
2.7 <i>Statistical Analysis</i>	52
3 Results	53
4 Discussion	62
 Discussão Geral	66
Conclusões.....	72
Perspectivas	74
Resumo	77
Abstract	79
Lista de Abreviaturas	81
Referências.....	83

Introdução Geral

1 A família Bromeliaceae

A família Bromeliaceae agrupa em torno de 3140 espécies (Givnish *et al.*, 2014) e está distribuída ao longo de toda zona tropical e subtropical das Américas (Leme & Marigo, 1993). As bromélias são encontradas nas mais diversas condições ambientais (Givnish 2005): ocorrem desde o nível do mar até altitudes superiores a 4000 metros, sobrevivendo tanto nas zonas desérticas como em áreas úmidas (Benzing, 2000).

Essa família desenvolveu acentuado índice de especialização, não observado em qualquer outro grupo vegetal (Leme & Marigo, 1993) e por isso, recentemente, foram propostas alterações para a taxonomia da família Bromeliaceae. Tradicionalmente, de acordo com peculiaridades florais e da estrutura de frutos e sementes, a família Bromeliaceae era dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae e Bromelioideae (Givnish, 2005). Porém, mais recentemente a primeira subfamília citada foi dividida formando novas subfamílias (Givnish *et al.*, 2011).

As bromélias podem ser terrícolas, rupícolas ou epífitas. Acredita-se que ao longo da evolução, as bromélias teriam partido do solo, alcançando o dossel e, portanto adquirindo o hábito epífito (Benzing, 2000). Atualmente, há um elevado número de espécies epífitas. Há hipóteses que apontam que o epifitismo proporcionaria características vantajosas, como, por exemplo, maior acesso a trechos bem iluminados na floresta, diminuição de danos causados pela herbivoria, aumento de possibilidades no auxílio da fauna para nutrição e polinização e maior eficiência na dispersão das sementes (Givnish 2005; Leme & Marigo, 1993). Contudo, as plantas epífitas comumente deparam-se com substratos pobres em água e nutrientes (Zotz & Hietz 2001).

Como já mencionado, as bromélias são encontradas em ambientes bastante distintos, sob as condições mais adversas e, ao longo da evolução, foram sendo selecionadas certas características que possibilitaram a sobrevivência dessas plantas. Por exemplo, Benzing (2000) ressalta a relevância das adaptações morfológicas que podem ser verificadas na estrutura geral do vegetal. As bromélias são constituídas, geralmente, por um caule muito curto. Ao longo desse eixo caulinar são dispostas as folhas de modo espiralado-rosulado, umas contíguas às outras, com as mais diferentes formas e tamanhos. Muitas espécies têm a parte basal das folhas mais alargada do que a parte médio-apical, formando o tanque, o qual permite acumular água e nutrientes (Figura 1). As raízes são bastante reduzidas: em muitas espécies terrícolas elas mantêm a função de absorção de água e nutrientes, porém, nas epífitas e rupícolas elas são importantes, principalmente, para a fixação na planta hospedeira (Figura 2). A independência da obtenção de água e nutrientes do substrato é possível pela presença de tricomas foliares modificados (Benzing, 2000) (Figura 3), que além de ter função de absorção, em algumas espécies, também são importantes para reflexão da luz, amenizando a ação térmica dos raios solares e promovendo importante economia hídrica (Benzing *et al.*, 1978). Sendo assim, para as bromélias epífitas, as folhas são as principais responsáveis pela aquisição de nutrientes e água (Takahashi & Mercier 2011).

Figura 1 – *Guzmania monostachia* (bromélia epífita) com suas folhas apresentando as porções basais mais alargadas e justapostas formando o tanque que permite o acúmulo de água e nutrientes. Diferentes grupos de folhas estão indicados como folhas jovens (FJ), folhas intermediárias (FI), folhas velhas (FV).

Figura 2 - *Guzmania monostachia* evidenciando o sistema caulinar muito maior em relação às raízes.

Figura 3 - Microscopia confocal de tricoma foliar da base de folhas intermediárias de *Guzmania monostachia*. Nessa imagem o tricoma apresenta quatro células centrais e duas camadas de células periféricas.

As bromélias tanque passam por diferentes fases ontogenéticas, vão desde plantas juvenis atmosféricas, as quais não possuem ainda o tanque formado, passando por uma fase intermediária até chegarem à fase madura vegetativa com um tanque bem estabelecido. Depois disso, alcançam a fase madura reprodutiva (Rodrigues *et al.*, 2016 em fase de elaboração) (Figura 4). Dentro do próprio sistema caular em forma de roseta, é possível diferenciar as folhas em jovens, intermediárias e velhas (Figura 1). Além disso, ao longo do próprio limbo foliar existem diferenças anatômicas e funcionais (Matiz *et al.*, 2013) (Figura 5).

Figura 4 – Estágios do desenvolvimento de *Guzmania monostachia*: A – Fase atmosférica, a qual não apresenta um tanque desenvolvido; B – Fase intermediária, a qual a planta começa a formar o tanque; C – Fase madura vegetativa, a qual a planta mostra um tanque bem desenvolvido.

Figura 5 – Esquema com a divisão de funções ao longo do comprimento foliar. A – as porções apical e também mediana interceptam mais radiação luminosa e por isso têm funções relacionadas à fotossíntese, enquanto que a base recebe menor radiação luminosa e tem um contato direto com a água e nutrientes presentes no tanque sendo importante para absorção da água e nutrientes. B – Corroborando a ideia da divisão de funções, no ápice (região de maior incidência da radiação fotossintética - PAR) foi encontrado um maior número de estômatos, clorofilas e carotenoides enquanto na base foi encontrado um maior número de tricomas, uma abundância de células parenquimáticas com maior volume de água (hidrênquima) e também maior atividade da enzima nitrato redutase (NR). A mediana é uma porção de transição, porém, normalmente mais semelhante com o ápice. ¹Freschi *et al.*, 2010a; ²Pereira *et al.*, 2013.

Uma característica fisiológica que é considerada bastante importante para esse grupo colonizar diferentes habitats é a capacidade que certas bromélias possuem de realizar a fotossíntese do tipo metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Esse padrão fotossintético tem sido registrado em um grande número de espécies de Bromeliaceae (Benzing, 2000). O CAM é um modo especial de fotossíntese que permite a absorção de CO₂ atmosférico durante a noite, quando a umidade relativa do ar é normalmente mais elevada e os estômatos estão abertos, propiciando um aumento da eficiência do uso da água (Silvera *et al.*, 2010). Nas plantas CAM o carbono originado do CO₂ é fixado, formando o oxaloacetato (composto de 4 carbonos). Essa reação é catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC). Posteriormente, com a ação de outra enzima, a malato desidrogenase (MDH), o oxaloacetato é reduzido a malato, sendo este acumulado em vacúolos na forma de ácido málico. No período diurno (quando os estômatos se fecham), o ácido málico vai sendo transportado para o citoplasma e o malato é descarboxilado. Assim, o CO₂ entra no ciclo C₃ e os carboidratos são formados. Além desse metabolismo CAM dito clássico, no qual há assimilação de CO₂ principalmente noturna, são conhecidos outros dois tipos de CAM: 1) o CAM “cycling”, que é uma condição em que as trocas gasosas são verificadas durante o dia (como ocorre com as plantas C₃), mas se observa um pequeno acúmulo de ácidos orgânicos à noite e 2) o CAM “idling”, no qual as plantas mantêm os estômatos fechados ao longo do período de 24h, se observando um acúmulo de ácidos orgânicos à noite. Esse CO₂ fixado é derivado do gás carbônico proveniente da respiração (Matiz *et al.*, 2013; Silvera *et al.*, 2010).

Nem todas as espécies da família Bromeliaceae são CAM. Também existem espécies C₃ e outras que podem realizar ajustes no metabolismo fotossintético, sendo denominadas por C₃-CAM facultativas. Essas, quando

em condições ambientais adequadas, realizam fotossíntese C_3 , já quando há algum tipo de estresse hídrico e/ou nutricional desempenham a fotossíntese CAM (Cushman & Borland, 2002). Dependendo de fatores internos e ambientais, é possível ocorrer variação entre os diferentes tipos de CAM: por exemplo, uma determinada planta que exibe CAM-cycling passa a realizar CAM-idling (Matiz *et al.*, 2013).

Um exemplo de bromélia epífita com tanque, que exibe uma plasticidade desse metabolismo e pode atingir o CAM “idling” é a *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez (Bromeliaceae, subfamília Tillandsioideae) (Freschi *et al.*, 2010a). Além disso, foi visto que as folhas dessa bromélia exibem diferenciação anatômica e funcional ao longo do comprimento foliar como explicado anteriormente (Pereira *et al.*, 2013; Freschi *et al.*, 2010a). No Brasil, essa espécie é encontrada somente no nordeste, sendo um dos locais de ocorrência o município de Guaramiranga localizado no estado do Ceará na região denominada por Massivo de Baturité, região esta que vem sofrendo desflorestamento progressivo em função da crescente urbanização (Siqueira-Filho & Tabarelli 2006; Santos *et al.*, 2012).

Os nutrientes para uma bromélia epífita com tanque, como a *G. monostachia*, provêm de fatores atmosféricos (chuvas, neblina, ventos), da decomposição das camadas superficiais de troncos e galhos do hospedeiro, da atuação da fauna (como material orgânico trazido do solo por formigas) (Leme & Marigo, 1993) e de possíveis interações com microrganismos, inclusive, os fixadores de nitrogênio (Benzing, 2000).

2 Fixação Biológica do Nitrogênio

Apenas alguns procariotos (limitadas espécies do grupo Bacteria e Archaea) conseguem romper a tripla ligação da molécula de N_2 , sendo o

produto gerado a amônia. Esse processo é conhecido por fixação biológica do nitrogênio (Galloway *et al.*, 2004; Seefeldt *et al.*, 2009). Este nitrogênio quando combinado com outros elementos como o hidrogênio ou oxigênio é dito como fixado e devido ao fato do nitrogênio ser inerte para os animais e plantas, ele também é denominado de azoto (Hassan, 2005). Assim, bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2) também são denominadas diazotróficas.

Todos os microrganismos fixadores de nitrogênio tem genes que codificam para a enzima nitrogenase que promove a reação da quebra da tripla ligação entre os átomos de N_2 . A nitrogenase é sensível ao oxigênio (Postgate, 1998) e a catálise ocorre em temperatura ambiente, em condições de pressão atmosférica, com a presença de metais como cofatores. A energia é obtida a partir de ATP (Seefeldt *et al.*, 2009) para que o N_2 atmosférico possa ser reduzido a 2 moléculas de NH_3 (Postgate, 1998).

O complexo da nitrogenase pode reduzir também outras moléculas pequenas e com tripla ligação, além do N_2 . O acetileno (C_2H_2) é um substrato com essas características e, portanto, pode ser reduzido pela nitrogenase. O produto da catálise é o etileno (C_2H_4). Tanto o acetileno como o etileno são rapidamente detectados por um cromatógrafo a gás (Postgate, 1998), fato este que tornou o ensaio de redução de acetileno (Acetylene Reduction Assay – ARA) um método muito comum para monitorar a atividade da nitrogenase (Seefeldt *et al.*, 2009). Existem outras técnicas que também podem ser utilizadas para avaliar a fixação biológica do nitrogênio em um sistema de interação planta-bactéria. Uma delas é a quantificação total de nitrogênio que pode ser realizada em um experimento com inoculação bacteriana e fazer uma comparação com plantas não inoculadas (Boddey *et al.*, 2008). Outra técnica que pode ser utilizada é a determinação da razão isotópica nos tecidos das plantas. Como

a nitrogenase praticamente não discrimina ^{15}N e ^{14}N (Schlesinger & Bernhardt, 2013), ao se comparar plantas controle e inoculadas, a razão isotópica nos tecidos das plantas inoculadas pode ser diferente, e desse modo, pode sugerir a ocorrência de nitrogênio assimilado originado por fixação simbiótica.

3 Interação entre micro-organismos e plantas

3.1 Interação entre bactérias diazotróficas e plantas

Desde o final do século XIX, a fixação biológica do nitrogênio tem sido muito bem estudada na relação simbiótica de bactérias diazotróficas com leguminosas (Galloway *et al.*, 2004). A partir de 1970, houve um grande progresso na pesquisa a respeito da possível contribuição que bactérias fixadoras de nitrogênio teriam para as gramíneas (Baldani & Baldani, 2005). Essa questão foi levantada com base em observações da cultura canavieira. Mesmo com aplicação de fertilizantes nitrogenados, um cultivo contínuo de cana-de-açúcar poderia levar ao esgotamento de nitrogênio no solo e a uma queda da produção dessa cultura. No entanto, essa diminuição não tem sido verificada no Brasil, sugerindo a possibilidade de a cana-de-açúcar receber contribuições significativas de nitrogênio reduzido de organismos fixadores de nitrogênio (Lima *et al.*, 1987). Concomitantemente a essa observação, o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio do solo do canavial, pelo grupo da pesquisadora Johanna Döbereiner, corroborou essa hipótese (Baldani & Baldani, 2005). Desde então, um grande número de trabalhos tem sido realizados sobre a relação entre plantas não leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Esses estudos utilizam, principalmente, plantas de interesse agrícola, como por exemplo, a cana-de-açúcar, o milho, o trigo e o arroz. Inclusive, após

anos de estudos realizados pela parceria entre a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) com a Universidade Federal do Paraná e a iniciativa privada, foi disponibilizado para o comércio um inoculante com *Azospirillum brasilense* (bactéria diazotrófica) para milho e para trigo. Ensaios conduzidos em cinco anos mostraram incrementos médios de 25% a 30% no rendimento do milho e de 8% a 11% no do trigo. Também está sendo produzido um inoculante para cana-de-açúcar que é composto por 5 linhagens bacterianas (Embrapa, 2009).

Além de bactérias diazotróficas, fungos e bactérias não fixadoras de nitrogênio podem ser encontrados em associação com plantas (Azevedo *et al.*, 2000) e promover o seu crescimento.

3.2 Interações com diferentes micro-organismos

Os microrganismos que interagem com as plantas podem habitar o solo ou ambientes aquáticos, sendo atraídos por exudados de raízes, secreções e deposição de material vegetal, havendo a possibilidade de colonização de superfícies de raízes e também da parte aérea (epifíticos) e/ou colonização do interior dos tecidos vegetais (endofíticos) (Hardoim *et al.*, 2008; Lodewyckx *et al.*, 2002). Contudo, muitos autores consideram como endofíticos somente os microrganismos que, em pelo menos parte do seu ciclo de vida, habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos visíveis às plantas (Azevedo *et al.*, 2000; Hallmann *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2008). Existem também bactérias endofíticas que só conseguem crescer e sobreviver no ambiente interno da planta (Hardoim *et al.*, 2008). A dispersão dessas bactérias pode ocorrer por meio das sementes, ou por vetores, como, por exemplo, os insetos (Baldani *et al.*, 1997).

As bactérias benéficas às plantas podem ser potenciais agentes de biocontrole, por apresentarem um nicho ecológico similar ao de

fitopatógenos (Ryan *et al.*, 2008) e por produzirem compostos antimicrobianos (Dobbelaere *et al.*, 2003). Além disso, podem trazer muitos outros benefícios às plantas: 1) liberando fitormônios como o ácido indol-3-acético (IAA), as citocininas e as giberelinas (Bhattacharjee *et al.*, 2008), 2) incrementando absorção de nutrientes, 3) aumentando resistência aos estresses hídricos e osmótico e 4) induzindo resistência sistêmica na planta (Dobbelaere *et al.*, 2003). As bactérias diazotróficas podem, ainda, disponibilizar nitrogênio reduzido para o vegetal (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Pouco se sabe sobre como se dá a transferência do nitrogênio fixado para as plantas (Canuto *et al.*, 2003). Thuler *et al.*, (2003) verificaram (*in vitro*) que bactérias fixadoras de nitrogênio, podem produzir e liberar aminoácidos, poliaminas e IAA, possíveis formas de transferência de nitrogênio fixado.

Carvalho *et al.*, (2011) ressaltam a importância de se entender mais profundamente esses mecanismos promotores de crescimento durante a associação entre planta e bactéria diazotrófica. O nitrogênio fixado é o principal fator benéfico ou a produção de fitormônios pelas bactérias e alteração nos níveis hormonais das plantas colonizadas proporcionariam um melhor desenvolvimento da planta? Segundo esses autores, essas questões são ainda muito difíceis de serem elucidadas e o que se sabe é que a eficiência da associação depende do genótipo bacteriano, da espécie vegetal e das condições ambientais.

Curiosamente uma mesma espécie de micro-organismo pode causar doença em algumas plantas e promover o crescimento de outras. A linhagem do micro-organismo e a variedade da planta são importantes em como se desenvolve a relação entre os dois organismos. Pode ser dado o exemplo da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum rubrisubalbicans* que inicialmente foi descrita como patogênica para cana-de-açúcar e também para o sorgo e atualmente vem sendo estudada como promotora de

crescimento para diversas espécies agricultáveis inclusive para a própria cana-de-açúcar (Schmidt *et al.*, 2012). O estabelecimento da relação entre bactéria e planta depende de uma série de sinalizações por parte de ambos os organismos.

3.3 Sinalização entre planta e bactéria

Não é uma tarefa fácil para a maioria dos micro-organismos ter sucesso na colonização de uma planta. Tanto para aqueles que seriam benéficos quanto possíveis patogênicos. Os vegetais exibem barreiras físicas como a presença de cera, cutícula, paredes celulares espessas e fechamento de estômatos (Agrios 2005; Melotto *et al.*, 2006). Além disso, existem agentes químicos como compostos antimicrobianos nas proximidades dos tecidos vegetais produzidos pelas plantas e também por outros micro-organismos (Hardoim *et al.*, 2008; Cassán *et al.*, 2014).

Com exceção da relação simbiótica na nodulação de leguminosas, há um maior conhecimento dos mecanismos de sinalização entre plantas e bactérias patogênicas em comparação com as bactérias benéficas. Sabe-se que os vegetais, ao reconhecer as moléculas eliciadoras de um micro-organismo, disparam um mecanismo de defesa. As plantas possuem receptores para algumas das moléculas de alguns micro-organismos, mas não para todos. Essa relação de reconhecimento dos elicitores varia entre as diferentes espécies vegetais (Agrios 2005). Os patógenos carregam diferentes genes de avirulência sendo estes reconhecidos pela planta. Essa possui os genes específicos de resistência para determinado patógeno. No caso de reconhecimento pela planta ocorre uma reação incompatível com a doença, o hospedeiro se torna resistente e a doença não se desenvolve. Contudo, se não ocorre esse reconhecimento gene a gene ou porque o patógeno não possui genes de avirulência ou pela planta não possuir os

genes específicos de resistência, a planta torna-se suscetível à doença e a reação é denominada compatível com a doença (Glazebrook 2005; Chen *et al.*, 2014).

Nas interações incompatíveis foi demonstrado que o óxido nítrico (NO) atua no sistema de defesa das plantas e junto com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) participa da ativação da resposta hipersensível (Bellin *et al.*, 2013). Foi verificado que ao se inocular plantas de *Arabidopsis thaliana* com uma linhagem bacteriana de *Pseudomonas* dita como avirulenta (reação incompatível) ocorre um aumento bastante expressivo de NO, verificado a partir de algumas horas após a inoculação, atingindo os maiores valores por volta de 12 horas após a inoculação. Esse aumento de NO está relacionado com o início da resposta de hipersensibilidade. Essa análise também foi realizada com a inoculação de uma linhagem de *Pseudomonas* dita como virulenta (reação compatível) e foi observado que o incremento de NO era menor e demorava mais tempo para ser detectado (Chen *et al.*, 2014).

É conhecido que bactérias também produzem NO. Apesar de se saber que procariotos produziam NO, muito antes inclusive do estudo dessa molécula em animais, apenas mais recentemente passou a se dar maior atenção à investigação do papel do NO para esse grupo (Röszer 2012). Um exemplo é o estudo do NO como regulador da formação de biofilmes bacterianos. Estes são associações bacterianas formando uma comunidade multicelular bastante resistente à ação de antibióticos (Arora *et al.*, 2015). Além disso, nos últimos anos, tem se verificado que o NO também é produzido pelas bactérias para comunicação com as plantas (Creus *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a rizobactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* produz NO e este participa na sinalização para indução de raízes laterais e adventícias em tomate (Amenta *et al.*, 2015). Bactérias patogênicas de plantas também produzem NO e esse fato

tem relevância para a sua virulência e capacidade de sobrevivência nos tecidos das plantas (Arasimowicz-Jelonek & Floryszak-Wieczorek, 2014).

Outras moléculas sinalizadoras estão sendo estudadas na interação entre plantas e micro-organismos. Contudo acredita-se que essa troca de sinais é bastante específica e varia com o hospedeiro e micro-organismo. Ainda assim algumas generalizações podem ser feitas principalmente para os fitormônios mais estudados na defesa de plantas, como o ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (Derksen *et al.*, 2013). Em geral, o ET e o JA atuam conjuntamente induzindo a expressão de alguns genes enquanto o SA e o JA são mutuamente inibitórios para a expressão de vários genes. Evidências têm mostrado que o SA regula as defesas da planta contra patógenos biotróficos (patógenos que infectam células vivas do hospedeiro) por ativar genes que resultam na morte celular programada no hospedeiro. Diferentemente, o JA e o ET são moléculas sinalizadoras para patógenos necrotróficos (patógenos que matam as células do hospedeiro para sua nutrição) e, portanto, ativam outros mecanismos de defesa que têm sido estudados por meio do uso de plantas mutantes as quais apresentam bloqueios na sinalização desses hormônios (Glazebrook 2005; Pozo *et al.*, 2004). Além disso, também há estudos mostrando que tanto patógenos quanto micro-organismos benéficos podem aumentar o sistema de defesa de plantas, porém, ativando genes e vias bioquímicas diferentes (Pieterse *et al.*, 2014). O primeiro mecanismo foi denominado resistência sistêmica adquirida (induzida pelo patógeno) que é caracterizado pelo incremento de SA nos tecidos da planta (Spoel & Dong 2012). O segundo mecanismo foi denominado resistência sistêmica induzida (induzido pelo micro-organismo benéfico) no qual o JA e o ET são fundamentais (Pieterse, 1998). Análises do banco de dados de expressão gênica do projeto SUCEST da cana de açúcar indicaram que em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas ocorreu a supressão de

partes das vias do etileno e ao mesmo tempo ativação de outros componentes da referida via, perfil exatamente oposto ao que ocorre em plantas inoculadas com bactérias patogênicas. Assim, há indícios de que apenas alguns componentes da via do etileno podem identificar associações benéficas com as bactérias diazotróficas (Carvalho *et al.*, 2014).

Também é relatado que bactérias produzem etileno *in vitro* quando crescidas em meio de cultura acrescido de metionina (Ferrara *et al.*, 2012; Thuler *et al.*, 2003) e acredita-se que esse etileno liberado pelas bactérias pode modular o nível de etileno e de outros hormônios produzidos pela planta. Além do próprio etileno, outros fitormônios como o ácido-indol-3-acético (IAA), que também pode ser produzido por procariotos, interferem na modulação dos níveis de etileno na planta (Cassán *et al.*, 2014).

O IAA, fitormônio importante no controle do desenvolvimento de plantas, é também considerado como uma molécula sinalizadora entre planta e bactéria e é bastante estudado na relação com bactérias promotoras de crescimento encontradas na rizosfera. Apesar disso, foi verificado que bactérias isoladas de cana-de-açúcar da rizosfera e também como endofíticas produziram quantidades semelhantes de IAA *in vitro* (Ferrara *et al.*, 2012). Para a produção máxima de IAA, diferentes bactérias requerem diferentes quantidades de suplementação de triptofano exógeno. Bactérias que conseguem produzir maior quantidade de triptofano e precisam de uma menor quantidade desse aminoácido oriundo de fonte exógena, tem uma vantagem sobre outras bactérias (Duca *et al.*, 2014).

Além do estudo do IAA na interação com bactérias promotoras de crescimento, sabe-se que essa molécula também é regulada na interação com patógenos. O IAA também é descrito participando da resposta hipersensível, porém, nesse caso, a resistência ao patógeno é observada quando esse mecanismo de sinalização é reprimido por um microRNA (pequenas moléculas de RNA não codificante que podem silenciar RNA e

regular a expressão gênica pós-transcricional) da planta previamente induzido por moléculas presentes no patógeno (Navarro *et al.*, 2006). Em um experimento com inoculação de uma linhagem bacteriana avirulenta verificou-se um aumento na expressão do gene *GH3* que codifica para uma proteína que participa na conjugação do IAA com aminoácidos e uma diminuição do gene *ILL1* que codifica para uma proteína com ação de quebra do IAA conjugado (Vitor *et al.*, 2013). Isso conduz à teoria de que há uma diminuição do conteúdo endógeno de IAA livre como resposta à inoculação de certas bactérias e assim, essa regulação dos níveis de IAA livre parece ser importante nos mecanismos de defesa da planta.

Os estudos de produção e liberação de fitormônios por bactérias têm sido realizados com isolados bacterianos de tecidos vegetais na busca por possíveis micro-organismos promotores de crescimento vegetal. Em um experimento com isolamento de bactérias é importante além de caracterizar a morfologia das colônias (forma, tamanho, cor, concavidade, grau de opacidade, etc) a realização da identificação molecular para confirmação dos grupos filogenéticos as quais os isolados pertencem.

4 Identificação de bactérias

O gene 16S rRNA codifica para a subunidade menor do ribossomo dos procariotos, tem aproximadamente 1,5kb e vem sendo muito utilizado para análises filogenéticas e para identificação de gêneros bacterianos (Clarridge, 2004; Liu *et al.*, 2012). Esse gene é amplamente utilizado para identificações de bactérias de diversas origens (tanto ambientais quanto clínicas) por apresentar regiões muito conservadas e também regiões altamente variáveis. Sendo assim é possível sintetizar *primers* para essas regiões conservadas, conseguindo-se a amplificação dessa sequência do DNA dos diferentes grupos bacterianos presentes. Ao mesmo tempo, as regiões altamente variáveis possibilitam a realização de estudos

filogenéticos e identificação de gêneros bacterianos (Madigan *et al.*, 2012). É possível inclusive identificar até nível de espécie, mas em alguns casos, existem espécies que são muito próximas e contar somente com esse gene não é possível distingui-las (Liu *et al.*, 2012). Sendo assim, é comum encontrar estudos que usam o 16S rRNA descrevendo apenas até o nível de gênero.

Existem genes que codificam para a enzima nitrogenase que também podem ser utilizados para análises filogenéticas: *nifH*, *nifD*, *nifK*. Dos três, o *nifH* (que codifica a subunidade nitrogenase redutase) é o mais sequenciado e utilizado para estudos de diversidade de micro-organismos fixadores de nitrogênio (Madigan *et al.*, 2012; Gaby & Buckley, 2012). Apesar de existirem diversos *primers* para amplificar o *nifH*, eles não amplificam para todos os fixadores de nitrogênio. Foi verificado em um estudo no qual se testaram vários *primers* universais para o *nifH* que 15 deles amplificaram mais de 90% de amostras testadas de bactérias diazotróficas, porém 23 amplificaram menos de 50% das amostras testadas (Gaby & Buckley, 2012).

Com relação a estudos de bactérias diazotróficas em bromélias, poucos trabalhos fizeram um *screening* com identificação de isolados, muitos não chegaram a caracterizar os gêneros dos isolados e outros fizeram inoculações, verificando o efeito na planta. Segue a seguir uma lista de trabalhos com bactérias diazotróficas em bromélias.

5 Bactérias diazotróficas em Bromeliaceae

Apesar da existência de muitos estudos sobre a interação entre bactérias e plantas de interesse agrícola, existem pouquíssimas pesquisas referentes à relação estabelecida entre esses microrganismos e outras

plantas, como as pertencentes à família Bromeliaceae. Brighigna *et al.*, (1992) conduziram ensaios de redução de acetileno em 12 espécies de tillandsias (Bromeliaceae). Os referidos autores verificaram por esse método a presença de microrganismos fixadores de nitrogênio em 8 das 12 espécies coletadas. Bactérias do gênero *Bacillus* estavam presentes em 75% das espécies examinadas, além de outras linhagens bacterianas diazotróficas que também foram isoladas de folhas de *Tillandsia*: *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Vibrio* e *Aeromonas* (as três últimas bactérias são tipicamente encontradas em ambientes aquáticos). Já Puente & Bashan (1994) isolaram do interior dos tecidos de *Tillandsia recurvata* dez morfotipos bacterianos que se desenvolveram em meios de cultura sem a presença de nitrogênio reduzido. Contudo, somente um morfotipo reduziu acetileno a etileno. Essa bactéria foi identificada como *Pseudomonas stutzeri*.

Considerando a família Bromeliaceae, é possível encontrar um maior número de pesquisas a respeito da interação planta-bactéria no abacaxizeiro (*Ananas comosus*), conhecido por seu interesse na agricultura. Esses estudos se concentraram nas bactérias diazotróficas com a idéia de no futuro realizar inoculações em abacaxizeiros para diminuir a necessidade do uso de fertilizantes. Weber *et al.*, (1999) isolaram bactérias diazotróficas de amostras de raízes, caules, folhas e frutos de abacaxizeiro, encontrando uma maior densidade populacional nas raízes. No trabalho de Weber *et al.*, (2003) diferentes linhagens bacterianas isoladas previamente de abacaxizeiro foram inoculadas em diferentes cultivares dessa espécie. Esses autores verificaram que determinadas linhagens foram mais eficazes na promoção de crescimento para algumas cultivares enquanto outras linhagens bacterianas foram mais eficazes para outras. De uma forma geral, os resultados revelaram ser eficiente a inoculação com bactérias diazotróficas na promoção do crescimento do abacaxizeiro, indicando

inclusive a possibilidade de redução do tempo de aclimação de plantas micropropagadas. Baldotto *et al.*, (2010) e González *et al.*, (2011) confirmaram essa afirmação. No primeiro trabalho a inoculação com bactéria diazotrófica proporcionou aumento em 81% e 102% no crescimento (durante a fase de aclimação) das raízes e parte aérea, respectivamente. Além disso, a inoculação bacteriana também elevou o acúmulo de alguns nutrientes: N, P, K, Ca e Mg. No segundo estudo, o efeito mais significativo obtido com a inoculação foi o aumento da massa fresca das plantas.

Diferente das pesquisas mencionadas anteriormente, um estudo a respeito da interação entre plantas de abacaxizeiro e bactéria foi realizado para verificar se haveria presença de diferentes bactérias (não apenas fixadoras de nitrogênio) nos tecidos das plantas (Abreu-Tarazi *et al.*, 2010). Nesse trabalho os autores demonstraram, por meio de técnicas moleculares, a existência de bactérias endofíticas em plantas de abacaxizeiro originadas a partir da cultura de meristema e mantidas *in vitro* por mais de 5 anos. Essas plantas eram consideradas axênicas, mas essa pesquisa mostrou que mesmo sem efeitos visíveis, existem bactérias endofíticas em plantas micropropagadas, sugerindo que a presença dessas bactérias seria de fundamental importância para a sua fisiologia.

Outro estudo mostrou a contribuição de nitrogênio por bactérias presentes na filosfera da bromélia terrícola *Bromelia balansae*. As bactérias mineralizaram os compostos orgânicos o que levou a uma promoção de crescimento da planta (Gonçalves *et al.*, 2014). Contudo não foi feita ainda uma identificação de quais seriam os possíveis gêneros bacterianos importantes nesse processo.

Como descrito acima, ainda são poucos os estudos referentes à interação entre bactérias promotoras de crescimento e bromélias. Justamente essa família, por habitar ambientes tão diversificados parece

bastante promissora para descobertas de novos conhecimentos acerca da relação entre planta e bactéria. E principalmente, muito há ainda para ser pesquisado sobre as adaptações que possibilitam a sobrevivência das bromélias epífitas que estão submetidas a períodos de escassez de água e nutrientes. Acredita-se que os micro-organismos também contribuam bastante para a nutrição dessas bromélias, porém poucos estudos foram realizados até o momento. Sendo assim, nós selecionamos a bromélia epífita com tanque *G. monostachia*, que vem sendo estudada em nosso laboratório principalmente em relação à grande plasticidade fotossintética. Entretanto, não encontramos na literatura nenhum estudo caracterizando a microbiota dessa bromélia.

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo geral isolar e identificar bactérias redutoras de acetileno a etileno (sendo consideradas como diazotróficas) de diferentes grupos e porções foliares da bromélia epífita tanque *Guzmania monostachia*. Especificamente, a presente pesquisa pretendeu:

- 1) Identificar filogeneticamente os gêneros das bactérias isoladas por meio do gene 16S rRNA;
- 2) Inocular um gênero isolado de cada ambiente (natural ou casa de vegetação), separadamente, em bromélias experimentais a fim de:
 - Analisar moléculas usualmente descritas como importantes na sinalização planta-bactéria: óxido nítrico, ácido salicílico, etileno e ácido-indol-3-acético;
 - Acompanhar a colonização bacteriana nos tecidos foliares ao longo do tempo;

- Estimar a população das bactérias inoculadas (tanto epifíticas quanto endofíticas) ao longo do tempo em diferentes grupos de folhas presentes na roseta e porções foliares.

Capítulo 1

Identification of diazotrophic bacteria associated with leaves of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia*.

Abstract

Bromeliads inhabit different environments and many are found as epiphytes. These plants are often subjected to periods of water and nutrient shortage. For their survival, the epiphytic bromeliads are endowed with different morphological and physiological adaptations. *Guzmania monostachia*, an epiphytic tank-bromeliad, has been extensively studied because of its great photosynthetic plasticity. In Brazil, it is found only in the northeast region, in an area that is suffering deforestation. In addition to the already known adaptations, the interactions with microorganisms may also play a role in the nutrition process of epiphytic bromeliads, but little is known about that. Therefore, this study collected *G. monostachia* leaves in their natural environment in Brazil and in a greenhouse to isolate nitrogen fixing (diazotrophic) bacteria and characterize them phylogenetically. The isolation was performed from both the outside (epiphytic bacteria) and the inner part (endophytic) of different leaf portions (apex, middle and base). The bacteria were selected using the acetylene reduction assay (ARA) and using four different media that do not contain reduced nitrogen source. The strains were identified by 16S rRNA. Most of the isolated strains belong to the group of Proteobacteria (Family Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Burkholderia* and *Dyella*). In addition, strains belonging to Firmicutes group (*Paenibacillus*) and Actinobacteria (*Mycobacterium* and *Micrococcus*) were also isolated. Most of the genera

detected in the present work is commonly described as diazotrophic bacteria. Interestingly, the genus *Dyella*, has not been described yet as nitrogen fixing, although commonly found along with other diazotrophic bacteria. A larger number of isolates was found in leaves of natural environment rather than those from the greenhouse; in both places endophytic bacteria were located only in the leaf bases, which may indicate that this portion is suitable to bacterial entrance, probably because of the higher number of trichomes on this leaf portion. According to our knowledge we were the first to isolate and describe diazotrophic bacteria present in *G. monostachia* and provide a collection of microorganisms for further studies with inoculations to seek out some potential plant growth promoters.

1. Introduction

The Bromeliaceae family comprises around 3140 species of plants found in different environmental conditions in the American continent (Givnish *et al.*, 2014 Palma-Silva & Fay 2015; Givnish 2005). Among Bromeliaceae family there are a large number of epiphytic plants which are subjected to intermittent supply of water and nutrients (Zotz *et al.*, 2001). To survive, these plants are endowed with several morphological and physiological adaptations (Benzing, 2000). Some epiphytic bromeliads have a special structure named tank. This rosette-shaped structure is formed by the overlapping of the leaf bases, which are larger than other regions of the blade, thus allowing water and organic debris to accumulate there and serve as a nitrogen source (Schmidt & Zotz 2001). Therefore, the leaf is considered the most important vegetative organ for absorbing water and nutrients while the roots of these plants are poorly developed and mainly used for structural attachment to the substrate (Takahashi & Mercier 2011).

The water and nutrients can be absorbed by trichomes located mainly in the basal portion of the leaf surface. Furthermore, it was shown that there are structural and functional differences along the leaves of tank-bromeliads. Although the base is in closer contact with the water and nutrients retained in the tank, it receives a reduced intensity of light, hence creating a greater restriction for carrying out gas exchange than the apical and middle portions. Thus, the base is most important for absorption of water and nutrients and the middle and apex portions are most important for photosynthesis (Takahashi & Mercier 2011; Freschi *et al.*, 2010a).

In addition, there might be beneficial interactions with microorganisms and these might contribute to the survival of both the epiphytic as well as other bromeliads (Benzing, 2000). Nevertheless, there are few studies discussing the role of microorganisms in the survival of the bromeliads. Gonçalves *et al.*, 2014 showed that bacteria present on the phyllosphere of the terrestrial bromeliad *Bromelia balansae* improved plant nitrogen nutrition and plant growth by mineralizing organic nitrogen. However, an identification of which microorganisms are significant in this process has not yet been made. Other studies suggested potentially beneficial microorganisms and even genetic surveys reported the presence of nitrogenase enzyme in the water tank of bromeliads (Goffredi *et al.*, 2011), indicating the presence of nitrogen-fixing (diazotrophic) bacteria inside bromeliad tanks.

Taking into account that the epiphytic habit is related to periods of scarcity of water and nutrients, we hypothesized that the presence of beneficial microorganisms is even more relevant to those plants. Diazotrophic bacteria might be present in the leaves and might contribute to nitrogen nutrition of these plants. We chose the epiphytic-tank bromeliad *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez (Bromeliaceae) as our model. This plant has a large photosynthetic plasticity, structural differences along

the leaves and a high level of functional specialization (Freschi *et al.* 2010a; Takahashi, *et al.*, 2011). Thus, this bromeliad has been studied for issues related to metabolism, but there is a lack of information regarding the interactions with other organisms.

Our research was done both on leaves of plants collected in a natural environment as well as on leaves of plants from a greenhouse. The leaves from natural environment were collected in Guaramiranga, Ceará, Brazil, placed in Massif Baturité which is one of the last reserve areas of the Northeast Atlantic forest. Furthermore, being a wet area with a mild climate, uncommon in the Northeast of Brazil, this region is increasingly being cleared for the planting of different crops and urbanization. Hence, unfortunately, a reduction in bromeliad population in this area has been recorded. Moreover, this region is one of the few naturally occurring sites of *G. monostachia* in Brazil (Siqueira Filho & Tabarelli 2006; Santos, *et al.*, 2012). The greenhouse leaves were harvested from plants maintained in a greenhouse of the botanical department of University of São Paulo; these were obtained by *in vitro* propagation starting from plantlets derived from seeds collected in Central America.

Therefore, our main purpose was to characterize diazotrophic bacteria in the epiphytic bromeliad *G. monostachia* living under natural conditions (environment) and also in plants which were watered daily and fertilized every two weeks (greenhouse). Furthermore, for both propositions we aimed to verify whether diazotrophic bacteria are present in distinct leaf portions (apical, middle and basal) and if they are in the exterior (epiphytic bacteria) or interior (endophytic bacteria) of the leaves.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

Fully expanded leaves were collected from adult plants of *Guzmania monostachia* grown in both their natural environment (Guaramiranga, CE, Brazil) and in the greenhouse of the Laboratory of Plant Developmental Physiology, Biosciences Institute, University of São Paulo (São Paulo, SP, Brazil). Before the harvest of the leaves from the greenhouse, the plants remained for 30 days in a growth chamber with a 12-h photoperiod ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), air temperature of 28°C during the light period and 23°C during the darkness, relative humidity (RH) of 45% during the light period and 65% during the darkness, in which they were watered with distilled water and were not fertilized. From both the natural environment and greenhouse 15 fully expanded leaves were harvested, each one from a different individual adult plant.

2.2 Microorganisms

Diazotrophic bacteria isolated from leaf surface (epiphytic) and from inside the leaf tissues (endophytic).

2.3 Procedures to separate epiphytic and endophytic bacteria from the leaves

The following procedure was developed separately for material collected in the natural environment and in the greenhouse.

In order to facilitate the handling of the material, the 15 harvested leaf blades were divided into 3 groups of five leaves each one. After that, the leaves were sliced into three portions: basal (comprising the leaf sheath), middle, and apical (two halves of the remaining leaf blade). The

cut areas were closed with paraffin (sealing endophytic bacteria inside the plant tissues).

Afterwards, each group of leaves was placed separately into a sterile flask containing sterile distilled water (50 mL) and the material was submitted to sonication (40 KHZ) for 15 minutes (at room temperature) to separate bacteria from the leaf surface (epiphytic bacteria). Subsequently, all leaf samples were subjected to an antiseptic procedure: washing in 70% ethanol for 2 minutes, followed by sodium hypochlorite solution (2% available Cl⁻) for 5 minutes followed by three rinses in distilled water (adapted from Araújo *et al.*, 2002). Later, the material was macerated in 20 mL of sterile distilled water using a mortar and pestle for investigation of bacteria present inside the plant tissues (endophytic bacteria).

2.4 Procedures to isolate diazotrophic bacteria

The procedures to isolate diazotrophic bacteria were adapted from Ferrara *et al.*, (2012). Two hundred microliters from the resulting epiphytic and endophytic bacterial broth were transferred to separate penicillin flasks (total volume of the flask = 10 mL), containing 4 mL of semi-solid medium plus nistatyn (30 mg mL⁻¹). Four different culture media were used NFb, JNFb, LGI and LGD (Hartmann & Baldani 2006, Dobereiner *et al.*, 1995) in duplicate to each medium. All these media are free of reduced nitrogen and contain different components and different pH values, allowing the growth of diverse bacterial genera. Then, the flasks were incubated at 30°C for 5 days and after that the cultures with bacterial growth underwent an acetylene reduction assay (ARA) (See the next section). The cultures that reduced acetylene to ethylene (ARA⁺) were transferred to Petri Plates with the corresponding medium and were incubated at 30°C for 5 days (ten-fold dilution series was carried out in replicates of two). After the isolation of the bacterial colonies, they were again transferred to semi-solid medium

and submitted to ARA for the selection of ARA⁺ bacterial strains. These ARA⁺ isolates were preserved at -80°C with glycerol 20%.

The parameters used to differentiate the colonies were: shape (round or amorphous), size (short, medium, large), elevation (flat, convex), edge (regular or irregular), texture (mucous or not), color and optical property.

2.5 Acetylene reduction assay (ARA)

In order to select the strains that reduce acetylene to ethylene, the isolates were inoculated individually in penicillin flasks as described in the section above and after the five days of incubation, acetylene was added (10% of atmospheric phase as described in Pariona-Llanos *et al.*, 2010). The cultures remained at 30°C for at least 48 hours. Afterwards, the production of ethylene was qualitatively analyzed by injection of 0,1 mL of the atmospheric phase in gas chromatograph Finnigan Thermo Trace GC ultra with single FID, with Alumina BOND/Na₂SO₄ column (30m; 0,53 mm/D, 10µm²df) at 70 °C, injector at 180 °C and detector at 230 °C.

2.6 16S rRNA Sequencing

The DNA extraction was performed using the DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN ®) kit and following the manufacturer instructions.

The isolates were identified by 16S rRNA with the primer pair 27F (5' to 3' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) and 1512R (5' to 3' TACGGTTACCTTGTTACGACTT). The parameters utilized for the PCR were: 95°C for 5min; 94°C for 30s; 30 cycles alternating temperatures at 50°C for 30s and 72°C for 1min; 1 cycle at 72°C for 10min and 4°C for infinite.

The purification was carried out using the GE health care illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit and the fabricant instructions were followed. The PCR reaction for the sequencing employed

the primer F2 (5' to 3' TGCCAGCAG CCGCGGTAATAC) besides the primers described above. In addition, we used the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and the sequencing was performed at GaTE Lab at Institute of Biosciences, University of São Paulo.

3. Results and Discussion

Most of the isolates belong to the Proteobacteria group (Figure 6) which is the largest Phylum of Bacteria and include the most common gram negative bacteria (Brenner *et al.*, 2005). Only the isolates belonging to the Enterobacteriaceae family were described as a family and not genera because the individuals of this group are genetically very closely related (Brenner *et al.*, 2005) and the distinction between genera is difficult to achieve. Some common bacteria described as diazotrophic isolates of plants were also found here as Enterobacteriaceae family, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Burkholderia* (Ferrara *et al.*, 2012; Venieraki *et al.*, 2014; Taulé *et al.*, 2012; Castro-González *et al.*, 2011). The genus *Brevundimonas* had also been described before as diazotrophic (Kumar & Gera 2013). However, here we found *Dyella*, first proposed as a novel genus during an isolation of diazotrophic bacteria from a garden in Japan whereas the three isolates named as *Dyella japonica* do not have *nifH* (gene for nitrogen fixation) and were not considered as nitrogen fixing (Xie & Yokota 2005). Since then, *Dyella* has been described in other works as: isolate of soil around the roots of bamboo (An *et al.*, 2005); as endophytic isolates from root nodule of *Lespedeza* (Palaniappan *et al.*, 2010) and from rhizosphere soil of sunflower (Anandham *et al.*, 2011; Ambrosini *et al.*, 2012); endophytes of rice (Hardoim *et al.*, 2012); part of bacterial communities in the suppression of a plant pathogenic fungus in wheat (Yin *et al.*, 2013). Although *Dyella* genus has been found together with other

plant growth promoting bacteria, including diazotrophic bacteria, it has not been described as a nitrogen fixing bacteria. Therefore, the present work, finding *Dyella* as ARA+ and growing in medium without reduced nitrogen suggests that the strains isolated here might be able to fix nitrogen.

Besides the bacteria described above, four isolates were found as gram positive bacteria, two of them belonging to the Firmicutes group (two strains identified as *Paenibacillus* sp.) and the other two belonging to the Actinobacteria group (*Microbacterium* sp. and *Micrococcus* sp.). There are several *Paenibacillus* strains that have been isolated as diazotrophic bacteria and even one isolate of one plant species was inoculated in another plant species aiming for biotechnological applications to improve crop growth (Puri *et al.*, 2015). Regarding the Actinobacteria group, it was accepted for a long time that few strains were able to fix nitrogen. However, recently, the number of reports of other strains that can fix nitrogen is increasing (Gtari *et al.*, 2012). The *nifH* sequences were detected within strains related to the genus *Microbacterium* (Zakhia *et al.*, 2006). Other studies are suggesting *Microbacterium* and *Micrococcus* as the bacteria potentially promoting plant growth although the strains are not nitrogen fixing (Chowdhury *et al.*, 2007; Vendan *et al.*, 2010).

Figure 6 – Classification of the isolates of *G. monostachia* from natural environment and from greenhouse into the groups (phyla) of Bacteria.

The discussion above describing other studies that found the same bacteria genera were not performed with bromeliad plants. There is a scarcity of work describing genera of diazotrophic bacteria related to the Bromeliaceae family. Brighigna *et al.*, (1992) and Puente & Bashan (1994) isolated ARA + bacterial strains from different *Tillandsia* species and identified the genera of the strains by using biochemical probes. Giongo *et al.*, (2013) isolated some potential plant growth promoters from *Tillandsia* and *Vriesea*, but the authors did not classify the genera of the isolates. As our knowledge, we were the first group to isolate and identify potential plant growth promoting bacteria from leaves of *G. monostachia*.

The study of endophytic bacteria may present strong candidates for growth-promoting strains, as it is considered that they have an intimate relation with this host (Hardoim *et al.*, 2008). In the present work, a higher number of endophytic than epiphytic bacteria were found in the greenhouse, while the opposite was verified in the natural environment. In both collection sites, endophytic bacteria were found only in the base of the leaves (Figure 7). This result was expected regarding the shape of the *G. monostachia* bromeliad, with more expanded and overlapping of leaf bases,

which allows organic matter and probably also microorganisms to accumulate in the base. The base of the leaf has the higher number of trichomes and the main portion where the nutrients are absorbed (Takahashi & Mercier 2011; Freschi *et al.*, 2010a). Therefore, it is possible that the microorganisms enter the leaf through the trichomes and, once inside the basal portion, contribute to the nutrition of the plant and/or other growth-promoting plant features.

			LEAF PORTIONS		
			Apex	Middle	Base
N E	Epi	Stenotrophomonas (2)	Pseudomonas (2)	Stenotrophomonas (3)
			Enterobacteriaceae (5)	Brevundimonas (2)	-----
			-----	Microbacterium (1)	-----
		Endo	-----	-----	Enterobacteriaceae (1)
G H	Epi	-----	-----	Paenibacillus (2)
			-----	-----	Burkholderia (1)
			-----	-----	Micrococcus (1)
		Endo	-----	-----	Burkholderia (2)
			-----	-----	Dyella (2)

Figure 7 - Identification of 16S rRNA of the isolates from *G. monostachia* originated from natural environment (NE) or from green house (GH). We described the isolates from each leaf portion apical, middle and basal as external (epiphytic - epi) and internal (endophytic - endo). Numbers in parentheses are related to the amount of isolates with the genus or family (in the case of Enterobacteriaceae) identified in each portion (Kiba *et al.*, 2011).

We found a larger number of endophytic bacteria than epiphytic bacteria in the leaves originating from the greenhouse and the opposite in the plants from the natural environment. Furthermore, we isolated a larger number of different colonies as well as a larger number of genera from the leaves from natural environment than from the greenhouse (Figure 7). The plants are subjected more to a greater number of biotic and abiotic factors in the natural environment than in the greenhouse. These factors facilitate the occurrence of microorganisms (transported by the wind, rain, animal pollinators and so on), which mainly colonize the leaves of these bromeliads since the roots are poorly developed (Benzing, 2000; Takahashi

& Mercier 2011). Bacteria that reach the plant tissues must settle an exchange of signals with the host to be able to colonize it. Not all bacteria can grow well on the surface of plants and generally a lesser number of bacteria can settle inside the plant tissues (Hardoim *et al.*, 2008).

According to our knowledge the present study was the first to isolate and describe diazotrophic bacteria present in *G. monostachia* and it provided a collection of microorganisms for further studies with inoculations to seek out some potential plant growth promoters. There was not an isolate with the same genus in greenhouse and in natural environment; however, most of the isolates from both places are from Proteobacteria group and usually described as nitrogen fixing bacteria. The isolates from greenhouse identified as *Dyella* had already been isolated together with other potential plant growth promoting bacteria, but has never been described as a diazotrophic bacteria. The present study suggests that it might be a possibility, since it seems capable of reducing acetylene. Moreover, there were isolated endophytic bacteria only from the base which may indicate that this portion is suitable to bacterial entrance, probably by trichomes that are present mainly at this leaf portion.

Capítulo 2

Diazotrophic bacteria in *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae): signaling molecules and leaf tissue colonization

Abstract

Plants interact with microorganisms throughout their life cycle, resulting in either a beneficial or pathogenic relationship. Both organisms have developed signaling mechanisms related to this interaction and a successful colonization is highly dependent on communication between them. Most of our knowledge in this issue comes from researches with model or crop plants. However, little is known about other species, such as epiphytic-tank bromeliads. These plants have a reduced root system and, therefore, an important part of the nutrient uptake is performed by the leaves. Indeed, the leaves of these bromeliads exhibit specializations according to the portions (apical, middle and basal). Data show that the base of the leaves present more trichomes and seem to be related to absorption of water and nutrients, while the apical portion performs mainly photosynthesis. Here, we studied two strains of nitrogen-fixing bacteria (*Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp.) colonizing the leaves of the tank of the epiphytic bromeliad *Guzmania monostachia*. We studied the colonization of both bacteria regarding the different leaf portions (basal and apical) and also different groups of leaves (younger and expanded) along the rosette. As plant-microbe signaling molecules we studied nitric oxide (NO), salicylic acid (SA), ethylene (ET) and indol-3-acetic acid (IAA). Both bacterial strains were marked with green fluorescent protein (GFP) and the leaf tissue colonization was monitored by confocal microscopy. The outcome shows that NO increased shortly after the inoculation in younger leaves and in the basal portion of

intermediate leaves. Apparently, none of the bacteria triggered the SA pathway. Twenty hours after the inoculation, bacteria were visualized inside the epidermis of the leaves and after forty eight hours of inoculation they were visualized entering the plant tissues by the trichomes. After five days, the bacteria were detected in the parenchyma and, ten days after the inoculation, *Pseudomonas* sp. was found on the vessels walls. It was possible to re-isolate epiphytic and endophytic bacteria from the base and middle portions, but not from the apex. Interestingly, the base did not show differences between epiphytic and endophytic populations. Our results strongly suggest that the bacteria enter through the trichomes on the leaf base and remain in this portion, which is precisely the most important for the absorption of nutrients by the plant.

1. Introduction

Plants frequently interact with a lot of organisms throughout their life cycle. Interestingly, the plants are able to selectively attract specific microbes to establish a beneficial relationship (Spence & Bais, 2015), while also having specific and nonspecific mechanisms of defense against pathogenic microorganisms (Agrios 2005).

The microbes are present in the surface (epiphytic) and inside (endophytic) the plant tissues but, to achieve a successful colonization, there is an extensive exchange of signals between both organisms (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). For example, there are bacteria that penetrate plant tissues by chance but cannot grow well, and in time the population decays. Only competent endophytes are well adapted to the inner plant environment, maintaining a harmonious balance with the host (Hardoim *et al.*, 2008). The colonization of plant surfaces by bacteria also involve an exchange of signaling molecules. Plants are able to recognize many

microbial substances such as oligosaccharides, peptides and glycopeptides and once these molecules are perceived, mechanisms such as signal transduction, ion fluxes and activation of genes and biochemical pathways are triggered (Andrews & Harris, 2000). There are some studies that suggest that beneficial microbes are initially recognized as potential invaders; however, like pathogens, many beneficial microorganisms are able to suppress the host immunity (Pel & Pieterse, 2012).

The outcome of the relationship between plant and microbe, ranging from pathogenesis to symbiosis depends on several factors, such as the microbe and host species, the developmental stage or health status of the plant and other features (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). Thus, the study of signaling between plants and microbes is usually particular for each partnership and is an issue with much to be investigated. Nevertheless, some generalizations have been proposed, mainly to the most studied hormones related to plant defense: salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) (Derksen *et al.*, 2013). Usually, ET and JA act together inducing the expression of some genes, whereas SA and JA are mutually inhibitory for the expression of several other genes.

Furthermore, evidence indicate that pathogens and beneficial microbes can increase the defense mechanisms of the plant as a whole, since uninfected plant parts became more resistant when infection occurred elsewhere, not necessarily by the same microorganisms. However, the genes and biochemical pathways involved in a pathogenic or beneficial interaction are different (Pieterse *et al.*, 2014). The pathogen-induced systemic acquired resistance signaling (SAR) is characterized by increase of SA in systemic tissues (Spoel & Dong 2012), while the induced systemic resistance (ISR), triggered by the presence of beneficial microorganisms, is mediated mainly by JA and ET (Pieterse, 1998).

In addition to the hormones described above, other molecules can be involved in plant defenses, such as nitric oxide (NO) and auxins.

NO and H₂O₂ can regulate the hypersensitive cell death and, apparently, NO controls several plant defense genes leading to pathogen resistance (Bellin *et al.*, 2013). For example, it was verified a strong NO emission at the onset of hypersensitive disease resistance response (HR) during plant-bacteria interaction that did not lead to disease. Although information on the role of NO as signaling molecule in plant-microbe interaction is slowly becoming available, the mechanisms of NO perception and signaling are still largely unknown (Chen *et al.*, 2014).

Auxin has also been described as participating of the HR. However, in this case, increased resistance to pathogen was observed when auxin response was repressed (Navarro *et al.*, 2006). On the other hand, there are several studies showing indole-3-acetic-acid (IAA – an auxin) as a reciprocal signaling molecule in symbiotic plant-microbe interactions (Malhotra & Srivastava, 2009). Therefore, there is still much to be understood of the IAA role in the different relationships (Duca *et al.*, 2014).

In the present study, we chose two bacterial strains, *Burkholderia* sp. and *Pseudomonas* sp., previously isolated as positive to the acetylene reducing assay (ARA+) from the leaves of the epiphytic tank-bromeliad *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez (Bromeliaceae) (see chapter 1) to inoculate them separately into the tank of plants cultivated in greenhouse. We analyzed the endogenous content of the potential signaling molecules between plant and bacteria such as NO, SA, IAA and ET and followed the colonization of each bacterial strain by labeling both isolates with a green fluorescent protein (GFP). As both bacteria were isolated as nitrogen-fixing and the two genera are known as plant growth promoting bacteria, our hypothesis is that they would be beneficial to the bromeliad.

In addition, as described in chapter one, all the endophytic isolates were found only in the leaf base. This portion is endowed of trichomes (which absorb water and nutrients) and has no stomata; therefore, we suppose that bacteria would get into the plant by the trichomes.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganisms

Bacterial strains:

- 1) AN11 *Pseudomonas* sp. previously isolated from the exterior (epiphytic) of the middle portion of leaves of *G. monostachia* originated from the natural environment (see chapter 1) and tagged with pUTkan GFP plasmid (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000).
- 2) CV1 *Burkholderia* sp. previously isolated from interior (endophytic) of the basal portion of leaves of *G. monostachia* originated from greenhouse (see chapter 1) and marked with pHc60Tc GFP (Cheng & Walker, 1998).
- 3) *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (used as a control, as a bacterium not isolated from *G. monostachia*).

2.2 Plants

Plants of *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez var. *monostachia* obtained by *in vitro* propagation and cultivated in greenhouse (see chapter 1) were transferred to a growth chamber with a 12-h photoperiod ($200\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), air temperature of 28°C during the light period and 23°C during the darkness, relative humidity (RH) of 45% during the light period and 65% during the darkness. At least 15 days before the beginning of each experiment, the plants remained under these conditions

and received no fertilization. The plants used in all the experiments were in a transition phase between fast growing tank to mature vegetative tank (unpublished data). The tank volume was $1,9\text{mL}\pm 0,6$, plant diameter $23,7\text{cm}\pm 1,6$ and height $13,6\pm 1,5\text{cm}$ (Figure 8). The height was measured from the plant base to the apex of the highest leaf.

Figure 8 – Plant of *G. monostachia* of the developmental stage used in the experiments.

The leaves of the plants were separated in three different groups, according to the position within the tank rosette: younger (more internal), intermediate and older leaves (more external). The oldest leaves were discarded whereas younger and intermediate leaves were used in the experiments. The intermediate leaves were further divided in basal middle and apical portions, but the younger leaves, due to their reduced size, were not.

The endogenous content of NO, IAA and SA were analyzed in the younger leaves and in the basal and apical portions of the intermediate leaves; ET emission by the plants was investigated in the whole plants; the images with confocal microscope were made with the younger leaves and the estimation of population density was done with younger leaves and also with the three portions of intermediate leaves.

2.3 Bacteria tagging with GFP

Initially, the bacteria needed to become electrocompetent in order to receive the GFP-containing plasmid. The same procedure was carried out for AN11 *Pseudomonas* sp. and CV1 *Burkholderia* sp.:

One colony was inoculated in 10mL of the medium where the strain was previously isolated (NFb for AN11 *Pseudomonas* sp. or JNFb for CV1 *Burkholderia* sp.), increased by ammonium sulfate (Hartmann & Baldani 2006; Döbereiner *et al.*, 1995). The bacteria were incubated overnight at 30°C and 180 rpm.

After that, Erlenmeyers with 50mL of each medium were inoculated with the pre-inoculum starting from the optical density of 600nm (OD_{600}) = 0,1. The bacteria were grown until OD_{600} = 0.8.

The cultures were then placed in ice for 30 minutes, followed by a centrifugation of 5 minutes at 5000 rpm and 4°C. The supernatant was discarded and the cells were suspended in 50mL of cold ultra-pure sterile water. This centrifugation process was repeated three times and, after the last centrifugation, the cells were suspended in 50mL of cold glycerol at 10%. After a last centrifugation, the cells were suspended in 1mL of cold glycerol. Aliquots of 100µL were frozen and stored at -80°C.

The aliquots of bacteria were thawed and 2µL of the respective plasmids were added (pUTkan GFP to AN11 *Pseudomonas* sp. and pHC60Tc GFP to CV1 *Burkholderia* sp.). Then, the materials were transferred to sterile cuvettes (Bio-Rad Gene Pulser® 0.2cm electrode) and the electroporation was performed using the following parameters: 1,5V (voltage); 25µF (capacitance); 200Ω (pulse) with Bio-Rad Gene Pulser II electroporation apparatus (adapted from Green & Sambrook 2012).

Afterwards, 900µL of culture medium (NFb or JNFb) was added and the cells were recovered for 4 hours at 30°C. Then, the bacteria that

incorporated the plasmids were selected by exposing them to $50\mu\text{g mL}^{-1}$ of kanamycin for 3 days at 30°C and 180rpm, in case of AN11 *Pseudomonas* sp., or $10\mu\text{g mL}^{-1}$ tetracycline for 3 days at 30°C and 180rpm, in case of *Burkholderia* sp. The antibiotic resistant colonies were visualized under a fluorescence microscope to check the expression of GFP and were subjected to 16S rRNA sequencing to confirm their identity. Finally, the colonies were grown in liquid medium (NFb or JNFb) added of respective antibiotic and aliquots were stored with glycerol 20% at -80°C .

2.4 Inoculation of bacteria in *G. monostachia* plants

One colony was inoculated in 2mL of the medium where the strain was previously isolated. AN11 *Pseudomonas* sp. pUTkan GFP was grown in NFb medium supplemented with ammonium sulfate (Hartmann & Baldani 2006; Döbereiner *et al.*, 1995) and kanamycin ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) for 1 day at 30°C and 180rpm and CV1 *Burkholderia* sp. pHc60Tc GFP was grown in JNFb medium supplemented with ammonium sulfate (Hartmann & Baldani 2006; Döbereiner *et al.*, 1995) and tetracycline ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) for 2 days at 30°C and 180rpm.

Afterwards, the strains were transferred to Erlenmeyers with 50mL of the respective culture medium without the antibiotic. Both strains were incubated for 16h at 30°C and 180rpm.

Then, the cultures were submitted to centrifugation for 10min at 5000rpm and the cells were suspended in 50mL of sterile distilled water. The OD was checked and 2mL were inoculated into the plant tank.

2.5 Analysis of signaling molecules

For these experiments, besides a control with sterile distilled water, 3 different treatments were carried out: 1) *Burkholderia* sp. - strain isolated

from leaves of greenhouse; 2) *Pseudomonas* sp. - strain isolated from natural environment; and 3) *Agrobacterium* – strain of bacteria not isolated from *G. monostachia* and usually used as vector for plant transformation, tested here as a potential plant pathogen.

2.5.1 Endogenous NO content

The endogenous NO content was quantified by spectrofluorimetry. For this assay 0.1g of fresh tissue was fragmented into small and uniform pieces and NO emission by the tissues was estimated by using the fluorescent probe diaminorhodamine-4M (DAR4M) (Melo *et al.* 2016).

2.5.2 Endogenous IAA and SA content

The endogenous IAA and SA levels were determined by gas chromatography associated with selective ion monitoring mass spectrometry (GC-MS). Leaf samples (100 mg FW) were extracted as described in Rigui *et al.*, (2015). Two internal standards, [$^{13}\text{C}_6$]IAA (Cambridge Isotopes, Inc.) and [$^2\text{H}_6$]SA (Cambridge Isotopes, Inc.), were added in a concentration of $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$. For IAA and SA quantifications, aliquots were evaporated, resuspended in $25 \mu\text{L}$ pyridine followed by a 60 min derivatization at 92°C using $25 \mu\text{L}$ N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide (with 1% tert-Butyldimethylchlorosilane). Analysis was performed on a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (model GCMS-QP2010 SE, Shimadzu) in selective ion monitoring mode. The chromatograph was equipped with a fused-silica capillary column (30m, ID 0.25 mm, 0.50 μm thick internal film) DB-5 MS stationary phase using helium as the carrier gas at a flow rate of 4.5 mL min^{-1} in the following program: 2 min at 100°C , followed a ramp by 10°C

min⁻¹ to 140°C, 25°C min⁻¹ to 160°C, 35°C min⁻¹ to 250°C, 20°C min⁻¹ to 270°C and 30°C min⁻¹ to 300°C. The injector temperature was 250°C and the following MS operating parameters were used: ionization voltage, 70 eV (electron impact ionization); ion source temperature, 230°C; interface temperature, 260°C. Ions with a mass ratio/charge (m/z) of 244, 202 and 130 (corresponding to endogenous IAA); 250, 208 and 136 (corresponding to [¹³C₆]-IAA); 309, 195 and 209 (corresponding to endogenous SA); 315, 201 and 215 (corresponding to [²H₆]SA), were monitored. Endogenous concentrations were calculated based on extracted chromatograms at m/z 244 and 250 for IAA, 309 and 315 for SA.

2.5.3 Ethylene emission analysis

Immediately after the bromeliads were inoculated, they were transferred to 250mL sealed glass vessels and remained under the following conditions: 17 μmolm⁻²s⁻¹ of irradiance, with a 12-h photoperiod and air temperature of 25°C. Ten milliliters of air from the vessel were collected in each sampling time: 6h, 30h and 72h after inoculation for ET measurements. Immediately after the removal of 10mL of air from the vessels, another 10mL from the atmosphere were injected back. It was used a gas-tight syringe and the samples were injected into a Trace GC Ultra gas chromatograph (Thermo Electron) fitted with a flame-ionization detector according to (Freschi *et al.*, 2010b).

2.6 Monitoring the bacteria colonization

2.6.1 Confocal microscopy analysis

After 20h, 48h, 5 days and 10 days of the inoculation, the base of the younger leaves were visualized with confocal microscope Zeiss LSM 780-NLO (CEFAP, ICB-USP) according to the following parameters: objective

- LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr M27; dimensions - x: 1024, y: 1024, z: 27, 8-bit; laser – 488nm.

2.6.2 Estimation of external and internal bacterial population densities in different leaf groups and portions

After 5 days and 10 days of the inoculation, the leaves were collected for the estimation of external (epiphytic) and internal (endophytic) bacterial population densities in the different leaf groups and portions as described above. Afterwards, fresh mass measurements were taken from each group and portions (younger, intermediate apex, middle and base). In order to seal the endophytic bacteria inside the plant tissues, the cut areas were closed with paraffin and the same procedure described in chapter 1 – item 2.3 was performed to collect epiphytic and endophytic bacteria (the leaves were submitted to sonication to gather the epiphytic bacteria and after maceration the endophytic bacteria). The material collected was submitted to serial dilutions and then plated in the culture medium with antibiotic: NFb plus kanamycin for AN11 *Pseudomonas* sp. ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) or JNFb plus tetracycline ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) for CV1 *Burkholderia* sp. Two plates for each dilution tube were inoculated and maintained at 30°C for 3 days. Finally, the colony forming units (CFU) were counted.

2.7 Statistical Analysis

The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and the significant differences were compared using the Tukey's test at $p \leq 0,05$ using the JMP software. Data are shown as the average and standard deviation of at least 3 repetitions of the analyses.

3 Results

The endogenous content of NO was quantified 1h, 24h and 120h after the inoculation in the younger leaves and in the intermediate leaves divided into apex and base (Figure 9). It was verified significant increase in NO production one hour after the inoculation for all strains used when compared to the control, but they were spatially distinct, depending on the bacterial species. In younger leaves, NO increased significantly in response to *Pseudomonas* sp. and *Agrobacterium*, while *Burkholderia* sp. caused a significant NO increase in the base of intermediate leaves. There were not significant differences after 24h and 120h (data not shown).

Figure 9 – Nitric oxide (NO) levels quantified after 1h of the inoculation with three different bacteria: *Burkholderia* sp. (isolated from greenhouse plants), *Pseudomonas* sp. (isolated from environmental plants) and *Agrobacterium tumefaciens*. The analyses were performed in younger leaves and in the apex and base of intermediate leaves. Letters indicate significant differences between the three bacteria and the control (Tukey test, p < 0.05). Error bars means standard deviation.

The endogen SA levels were quantified 5 days after the inoculation. It was verified that only the intermediate leaves (both apical and basal

portions) of plants inoculated with *Agrobacterium* showed a significant increase of this hormone when compared to the control ($p < 0.05$) (Figure 10).

Figure 10 – Endogenous salicylic acid (SA) content after 5 days of the inoculation with the different bacteria: *Burkholderia* sp. (isolated from greenhouse plants), *Pseudomonas* sp. (isolated from environmental plants) and *Agrobacterium tumefaciens*. The bacteria were inoculated in different group of the leaves and different leaf portions. The analyses were performed in younger leaves and in the apex and base of intermediate leaves. Letters indicate significant differences between the three bacteria and the control (Tukey test, $p < 0.05$). Error bars means standard deviation.

The endogenous IAA content was also measured in the different groups and portions of leaves after 5 days of the inoculation, but no significant differences were observed among the treatments (Figure 11).

Figure 11 – Indol-3-acetic acid (IAA) endogenous content quantified after 5 days of the inoculation with the different bacteria: *Burkholderia* sp. (isolated from greenhouse plants), *Pseudomonas* sp. (isolated from environmental plants) and *Agrobacterium tumefaciens*. The analyses were performed in younger leaves and in the apex and base of intermediate leaves. Error bars means standard deviation.

The ET emitted by the whole plants was measured and no differences were observed among the treatments (Figure 12).

Figure 12 – Ethylene emitted by plants of *G. monostachia* after 6h, 30h and 72h of the inoculation with the different bacteria: *Burkholderia* sp. (isolated from greenhouse plants), *Pseudomonas* sp. (isolated from environmental plants) and *Agrobacterium tumefaciens*. The error bars represent standard deviation.

In addition to the investigation of some usually described signaling molecules between plant and bacteria, bacterial colonization was monitored throughout the leaf tissues with a confocal microscope. Both bacteria isolated from *G. monostachia* were marked with GFP to allow visualization. Interestingly, it was observed that the leaf trichomes, present mainly in the base of leaves, exhibit autofluorescence. The figures 13 and 14 show, respectively, AN11 *Pseudomonas* sp. (isolated from natural environment) and CV1 *Burkholderia* sp. (isolated from greenhouse cultivated plants) present in the leaf tissues. Images were obtained 20h, 48h, 5 days and 10 days after the inoculation.

Both bacteria followed a similar pattern of colonization: at 20h bacteria were already visualized inside the epidermis (Figure 13 NE2; Figure 14 GH2) and closer to the trichomes (Figure 13 NE3; Figure 14 GH3). At 48h it was possible to observe that there were bacteria entering the leaf tissues by the trichome (Figure 13 NE5; Figure 14 NE5) and those that entered still remained closer to the trichomes (Figure 13 NE6; Figure 14 GH6). After 5 days, the bacteria spread (Figure 13 NE8; Figure 14 CH8) and were found in the parenchymal tissue (Figure 13 NE9; Figure 14 CH9),

since the trichome was not visible in these layers of the image. Differences between the two species compared were only detected after 10 days of the inoculation. Only *Pseudomonas* sp. was still visualized in the parenchyma after 10 days (Figure 13 NE12) and it was also visualized near the vascular tissues (Figure 13 NE13). *Burkholderia* sp., on the other hand, was visualized only in the borderline between epidermis and parenchyma (Figure 14 GH12), but not in other layers of the parenchyma (Figure 6 GH13).

Figure 13 – Basal region of younger leaves of *G. monostachia* plants inoculated with *Pseudomonas* sp. pUTkan GFP (originated from leaves of natural environment) after 20h (NE1-NE3); 48h (NE4-NE6); 5 days (NE7-NE9) and 10 days (NE10-NE13). Images represent: composite view (NE1, NE4, NE7, NE10); closer view of trichomes showing bacteria inside the trichome and the epidermis (NE2, NE5); overall view showing the bacteria inside the epidermis and around the trichomes (NE3, NE6) and spreading out along the epidermis (NE8, NE11); bacteria inside the parenchymal tissue (NE9, NE12) and bacteria on the vessels walls (NE13).

Figure 14 – Basal region of younger leaves of *G. monostachia* plants inoculated with *Burkholderia* sp. pHc 60Tc GFP (originated from leaves of greenhouse) after 20h (GH1-GH3); 48h (GH4-GH6); 5 days (GH7-GH9) and 10 days (GH10-GH13). Images represent: composite view (GH1, GH4, GH7, GH10); closer view of trichomes showing bacteria inside the trichome and/or the epidermis (GH2, GH5); overall view showing the bacteria inside the epidermis and around the trichomes (GH3, GH6) and spreading out along the epidermis (GH8, GH11); bacteria inside the parenchymal tissue (GH9) and at 10 days it was seen bacteria only to the boundary between the epidermis and parenchyma (GH12), not being observed bacteria in the parenchyma (GH13).

The estimation of epiphytic and endophytic population density after 5 days and 10 days of the inoculation was carried out by counting the colony forming unities (CFU) in Petri-plates. With regard to *Pseudomonas* sp., it was possible to re-isolate bacteria from the younger leaves and from the middle and basal portions of the intermediate leaves, but they were not found in the apical portion of intermediate leaves (Figure 15). There were not significant differences between epiphytic and endophytic populations in younger leaves and in basal portion of intermediate leaves in both times of study (Figure 15). However, in the middle portion of intermediate leaves it was always verified a higher number of epiphytic than endophytic bacteria (Figure 15). There was a decrease in the population density along the time (Figure 15) with the exception of the epiphytic bacteria on the base (Figure 15).

Figure 15 – Estimative of the population density of AN11 *Pseudomonas* sp. pUTkan GFP by the number of colony forming unities (CFU) per gram of fresh weight (g^{-1}) after 5 and 10 days of the inoculation. The bacteria were re-isolated from younger leaves and from the apex, middle and base of intermediate leaves. Different capital letters represent

differences between times and different lowercase letters represent differences between epiphytic and endophytic bacteria (Tukey test, $p < 0.05$).

Unlike what was observed to *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. showed different patterns: after 10 days it was found in apex as endophytic; there were differences between epiphytic and endophytic populations in younger leaves and intermediate leaves. Additionally, endophytic population increased along the time and it became higher than epiphytic after 10 days (in the younger leaves and apex and base).

Figure 16 - Estimative of the population density of CV1 *Burkholderia* sp. pHc60Tc GFP by the number of colony forming unities (CFU) per gram of fresh weight (g⁻¹) after 5 and 10 days of the inoculation. The bacteria were re-isolated from younger leaves and from the apex, middle and base of intermediate leaves. Different capital letters represent differences between times and different lowercase letters represent differences between epiphytic and endophytic bacteria (Tukey test, $p < 0.05$).

4 Discussion

In this study, we analyzed the effects of the inoculation of *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. in the tank of *G. monostachia* plants. Since both bacterial strains used here were isolated from *G. monostachia* plants (in greenhouse or natural environmental conditions) and are capable of fixing atmospheric nitrogen, it was assumed that they would both be beneficial. We also inoculated *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 in order to have a comparison with a bacterium that has not been found in *G. monostachia* and might be a pathogen. As an attempt to differentiate between benefic and pathogenic strains, we investigated some plant-microbe signaling molecules since there are descriptions of differences between plant responses to pathogens and beneficial bacteria. For example, when plants of *Arabidopsis thaliana* were inoculated with a virulent or avirulent strain, it was verified a much higher increase in NO in the plants inoculated with the avirulent strain (Chen *et al.*, 2014). Furthermore, pathogenic bacteria usually trigger plant responses increasing SA (Spoel & Dong 2012), while beneficial microorganisms usually trigger JA and ET pathways (Pieterse *et al.*, 1998). However, according to our knowledge, the data available in the literature are specific for model plants, while no studies were found regarding signaling molecules in bromeliad-microbe interactions.

Since there is no information of pathogenic or beneficial bacteria for *G. monostachia*, we also carried out the inoculation of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 to have a comparison with a bacterium that has not been isolated from our plant of study and might be a potential pathogen. Interestingly, in apical and basal portions of intermediate leaves, only the inoculation of *A. tumefaciens* EHA105 resulted in an increase of SA and this is precisely the pathway that is usually triggered in response to potential pathogens (Pieterse *et al.*, 2014).

On the other hand, we were unable to identify increases in ET emission for the inoculated bacteria, which would be usually triggered in response to beneficial microbes.

However, as a general trend, we see an increase in NO production within one hour after the inoculation of all bacterial strains which means that this molecule is rapidly triggered in *G. monostachia* in response to microorganisms. Moreover, this increase was detected mainly in the younger leaves and in the basal portion of the intermediate leaves, precisely the regions that had direct contact with the bacterial inoculum. A NO increase shortly after the inoculation of bacteria is also described for *Arabidopsis thaliana*, however, in this case, the onset of the response is after three hours and continued to rise until twelve hours (Chen *et al.*, 2014).

It has been proposed that NO can modulate the expression of different genes including some involved in IAA homeostasis and signaling pathway (Vitor *et al.*, 2013). Here, although we verified an increase in the endogenous NO content, no differences were detected in endogenous IAA after five days. It is possible that, with a different time of study, differences in the levels of this plant hormone might appear. It was verified in *Arabidopsis thaliana* that both the inoculation of an avirulent strain of *Pseudomonas syringae* and NO fumigation reduced the levels of some transcripts of the IAA pathway (Vitor *et al.*, 2013). On the other hand, experiments with the inoculation of plant growth promoting bacteria in crop plants caused a substantial increase in IAA levels after fifteen days of the inoculation and an even more considerable increase after one month (Kurepin *et al.*, 2014). For epiphytic bromeliads is still missing information on the possible relevance of IAA signaling between plant and microbe.

In addition to the signaling molecules, we also studied the colonization dynamics of both *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. Our

results show that both strains have a similar pattern of colonization. With 20 hours after the inoculation there were already bacteria detected inside the epidermis and after 48 hours we showed that bacteria continued entering the plant tissues, apparently by layers around the center cells of the leaf trichomes. Diazotrophic bacteria inhabiting leaf trichomes were shown by *Baldotto et al.*, (2011). However, this study was made with pineapple plants, a terrestrial bromeliad and the inoculation was performed on the roots. After one to three days after the inoculation, they were able to see the bacteria inoculated on the trichomes. Thus, according to our knowledge studies monitoring the establishment of bacteria in bromeliad plants were performed only on terrestrial bromeliads, in which bacteria were inoculated in the roots. Here we show the first results of bacteria colonizing the plant by the tank leaves.

The *Pseudomonas* sp. population density reached large numbers in the first five days but do not spread well along the plant and it decreased through time. Although it was shown this strain colonizing the vessel walls (after 10 days), the plant seems to control this bacterial colonization and it was not detected *Pseudomonas* sp. at the apex.

On the other hand, the *Burkholderia* sp., specifically the bacterial strain which was isolated as endophytic from greenhouse grown plants seems to be the strain which best colonized *G. monostachia*, with a lower density at the onset but it was increased at the middle part and reached the apex after 10 days.

The fact that the epiphytic density of *Burkholderia* sp. population decreased on the base while the endophytic population in the other portions increased led us to believe that bacteria get into the plant by the basal portion and spread out. Precisely the base is the portion with the highest number of trichomes (*Freschi et al.*, 2010a) and the bacterial cells were

shown on the trichomes. So the bacteria entered the base and colonized the whole plant.

In conclusion, we showed that plants responded to the bacterial inoculation in short time with an increase in NO production. While *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 apparently triggered the SA pathway, this was not observed for *Pseudomonas* sp. or *Burkholderia* sp. Since SA is usually triggered after the infection of potential pathogens, this data indicate that both *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. may be beneficial to the plant. However, we were unable to verify differences in ET and IAA levels after the inoculation. In addition, there may be specific patterns of spatial compartmentalization of signaling molecules within leaf portions or leaf age. Furthermore, *Burkholderia* sp., isolated from leaves of plants grown in greenhouse showed the best potential to colonize *G. monostachia* leaves.

Discussão Geral

A maioria dos isolados das folhas de *G. monostachia* tanto do meio ambiente quanto da casa de vegetação foram identificados como pertencentes ao filo Proteobacteria, maior grupo bacteriano e o que inclui a maioria das espécies gram negativas (Brenner *et al.*, 2005). Também foram encontrados isolados gram positivos pertencentes ao filo Firmicutes e Actinobacteria. Muitos dos gêneros e famílias dos isolados no presente trabalho também são comumente encontrados em outras espécies vegetais e inclusive utilizados na agricultura como promotores de crescimento: família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* (Ferrara *et al.*, 2012; Venieraki *et al.*, 2014; Taulé *et al.*, 2012; Castro-González *et al.*, 2011). Outros gêneros identificados na presente pesquisa não são tão comumente encontrados como diazotróficos. Além disso, dois isolados provenientes das plantas da casa de vegetação pertencem ao gênero *Dyella*. Esse gênero é descrito na literatura em estudos com isolamento bacteriano de solos, da região da rizosfera e do interior de tecidos vegetais. Esses trabalhos relatam o isolamento em meios de cultura sem a presença de nitrogênio reduzido, mas não conseguiram comprovar com outros testes que as linhagens isoladas eram de fato fixadoras de nitrogênio. Portanto, as pesquisas relatadas na literatura não têm denominado linhagens pertencentes a esse gênero como diazotróficas (Xie & Yokota 2005; An *et al.*, 2005; Palaniappan *et al.*, 2010; Hardoim *et al.*, 2012). No presente estudo, além dos dois isolados caracterizados como pertencendo ao gênero *Dyella* crescerem em meio de cultura que não contém nitrogênio reduzido, ambos também reduziram acetileno a etileno, indicando que podem ser diazotróficos. Pretende-se agora verificar se o gene *nifH* está presente nesses isolados e em caso afirmativo eles poderão ser considerados como fixadores de nitrogênio.

Poucos trabalhos identificando gêneros de bactérias diazotróficas foram realizados com bromélias e em nossas buscas na literatura não encontramos nenhum estudo antecessor com *G. monostachia*. Sendo assim, foi difícil realizar uma comparação dos gêneros isolados no presente trabalho com outros em bromélias.

Tem sido destinado um interesse em especial para o estudo de bactérias endofíticas por se acreditar que elas tenham uma relação mais íntima com o hospedeiro, estando as bactérias mais protegidas do ambiente exterior e liberando compostos promotores de crescimento vegetal diretamente no interior dos tecidos (Hardoim *et al.*, 2008). No presente estudo foi encontrado um maior número de bactérias endofíticas nas plantas originadas da casa de vegetação em relação a bactérias epifíticas. Um padrão oposto, no entanto, foi verificado para as plantas provenientes do meio ambiente. Isso pode ser explicado, entre outros motivos, pelo fato de no meio ambiente existir um maior número de fatores que permitem as bactérias alcançarem as plantas como o vento, a chuva e a interação com animais. No entanto, para conseguir entrar e se estabelecer no interior dos tecidos é ainda mais difícil. Isso porque os vegetais exibem barreiras físicas como a presença de cera, cutícula, paredes celulares espessas e fechamento dos estômatos (Agrios 2005; Melotto *et al.*, 2006). Portanto, no meio ambiente foi encontrado um maior número de isolados no geral, sendo a maioria epifíticos; possivelmente porque exista um grande aporte de micro-organismos. Porém, nem todos conseguem se estabelecer na própria superfície externa. Além disso, existe ainda uma maior dificuldade para adentrar nos tecidos com sucesso na colonização da parte interna da planta.

Em ambos os locais de coleta, as bactérias endofíticas foram encontradas somente na base das folhas e assim aventou-se a hipótese que as bactérias penetrassem pela base foliar. Essa região é onde estão presentes a maior quantidade de tricomas foliares (Freschi *et al.*, 2010a)

que são as principais estruturas responsáveis pela absorção de água e nutrientes (Takahashi & Mercier 2011). Além disso, nessa região praticamente não há estômatos (Freschi *et al.*, 2010a), sendo assim, imaginou-se que as bactérias penetrariam nas folhas por meio dos tricomas foliares tendo sido possível comprovar com as imagens de microscopia confocal esse caminho de entrada. Ambas bactérias (*Pseudomonas* sp. – isolada de folhas do ambiente natural e *Burkholderia* sp. – isolada de folhas da casa de vegetação) foram visualizadas nas células dos tricomas em diferentes camadas das imagens do confocal, mostrando que realmente elas conseguem penetrar nos tecidos vegetais por meio dessas estruturas. Com 20 horas após a inoculação, as bactérias já foram visualizadas na epiderme e a partir de 5 dias (após a inoculação) estavam se espalhando para regiões mais distantes do tricoma, além de serem encontradas em camadas mais profundas, isto é, foram visualizadas no parênquima foliar. Aos 10 dias da inoculação, somente a bactéria *Pseudomonas* sp. foi visualizada nas paredes dos vasos condutores. Porém, não foi encontrada no ápice após a realização da estimativa populacional. *Pseudomonas* sp. mostrou uma elevada densidade populacional no início mas não conseguiu colonizar de forma eficiente a planta e a população diminuiu ao longo do tempo. Por outro lado, a *Burkholderia* sp., bactéria que foi isolada como endofítica das folhas das plantas da casa de vegetação, parece ter sido a que melhor colonizou os tecidos vegetais. De início, exibiu uma densidade populacional menor, mas que ao longo do tempo aumentou na porção mediana, chegando a alcançar o ápice foliar. O fato da população epifítica da *Burkholderia* sp. decair na base enquanto a endofítica aumentou pode levar a conclusão de que essa bactéria entrou pela base e colonizou as demais porções foliares. Justamente a porção basal é a que tem maior número de tricomas (Freschi *et al.*, 2010a) e as bactérias foram visualizadas

sobre e no interior das células dos tricomas. Assim, as bactérias entrariam pela base e colonizariam as demais regiões.

Para o estudo das moléculas sinalizadoras, além de um controle no qual as plantas receberam água destilada, foram inoculadas separadamente as bactérias *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. Além disso, uma terceira bactéria não isolada da *G. monostachia* foi inoculada, uma linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*.

Das moléculas sinalizadoras testadas, apenas o óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (SA) exibiram diferenças significativas entre os tratamentos. De uma maneira geral foi verificado que o NO é uma molécula sinalizadora importante após um curto prazo do contato com as bactérias. No caso do presente trabalho, um aumento de NO foi observado após 1 hora da inoculação, principalmente nas folhas jovens (justamente as folhas que tiveram um maior contato com o inoculante), mas também na base do grupo das folhas intermediárias (região que também teve contato direto com o inóculo por este escorrer das folhas jovens para a base das folhas intermediárias). Um aumento considerável de NO já foi demonstrado em inoculações com uma linhagem bacteriana avirulenta em plantas de *Arabidopsis thaliana* após poucas horas da inoculação e chegando a um aumento máximo após 12 horas (Chen *et al.*, 2014).

Quanto ao SA, molécula sinalizadora considerada importante nas respostas de defesa a patógenos (Spoel & Dong 2012), foi verificado no presente estudo que após 5 dias nas porções apical e basal das folhas intermediárias houve um aumento apenas nos tecidos inoculados com a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Justamente essa bactéria foi selecionada como um controle positivo, talvez representando um potencial patógeno. Porém, o teste realizado para emissão de etileno (ET) (hormônio descrito como sinalizador para bactérias benéficas a planta (Pieterse *et al.*, 1998) não mostrou diferenças entre os tratamentos. Assim, além do NO,

ainda não conseguimos identificar outras possíveis moléculas sinalizadoras para essas bactérias. A partir desta investigação, pôde-se ter uma ideia do tempo de duração após a inoculação no qual há uma modificação da quantidade das moléculas de NO e SA. Sendo assim, a partir dos resultados relatados, outros tempos podem ser estipulados para a continuidade desse estudo. Com relação ao NO, é interessante que seja realizado um teste com menos de 1 hora após a inoculação e também outros tempos como 4 horas. Já para o ácido-indol-3-acético (IAA) um teste com apenas 1 dia e um teste após um período mais longo como 15 dias nos parece pertinente. Além do ET também seria importante um estudo com o ácido jasmônico (JA), que é estudado como sinalizador juntamente com o ET no caso de colonização por bactérias benéficas (Pieterse *et al.*, 1998).

Como resultado do presente trabalho foi feita uma coleção de bactérias potencialmente diazotróficas, isoladas tanto da parte externa (epifíticas) quanto interna (endofíticas) de diferentes porções foliares (apical, mediana e basal) da bromélia *Guzmania monostachia*, tanto cultivada na casa de vegetação como presente no ambiente natural (no Ceará Brasil, em uma região que está sendo bastante afetada com desmatamento e crescimento da urbanização). Além disso, duas linhagens caracterizadas como *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. (gêneros conhecidos tanto como promotores de crescimento quanto como patogênicos) foram marcadas com gene de fluorescência, abrindo várias possibilidades de estudo de inoculação com essas bactérias. Nesta pesquisa, foi feito um acompanhamento da colonização com ambas as linhagens por até 10 dias. Obtivemos fortes indícios de que as bactérias penetram nos tecidos foliares por meio dos tricomas, já que imagens provenientes da microscopia confocal mostraram as bactérias marcadas com gene de fluorescência presentes nessas estruturas em diferentes camadas. Além disso, as bactérias foram observadas na epiderme e parênquima. Quanto

aos mecanismos de sinalização ainda outros experimentos precisam ser realizados com a *G. monostachia*, sendo que o presente trabalho obteve indícios de que o NO parece ser importante no início da relação planta-bactéria. Já o SA é uma via disparada somente para alguns micro-organismos. No caso da presente pesquisa, apenas a inoculação de *Agrobacterium* ocasionou um aumento de SA. Isso pode ser um indício dessa bactéria ser reconhecida pela planta como um patógeno. Ao contrário, as bactérias *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp., não ocasionaram um aumento da concentração dessa molécula na planta, o que pode indicar que essas bactérias não são reconhecidas como patógenos.

Conclusões

- Há bactérias fixadoras de nitrogênio tanto na superfície como no interior dos tecidos foliares de *G. monostachia*. Algumas das bactérias encontradas são comumente descritas na literatura como fixadoras de nitrogênio: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* e família Enterobacteriaceae. Além disso, outros gêneros com menor número de relatos como sendo fixadores foram também detectados: *Brevundimonas*, *Micrococcus*, *Microbacterium*. E por fim o gênero *Dyella* que ainda não foi comprovada a sua capacidade de fixação de nitrogênio, mas o presente trabalho sugere essa possibilidade (por ambas linhagens isoladas pertencentes a esse gênero terem reduzido acetileno a etileno);
- Há uma maior diversidade de bactérias diazotróficas nas plantas do ambiente natural em relação à casa de vegetação;
- A base das folhas parece ser a região de maior concentração de bactérias diazotróficas endofíticas: os isolados endofíticos originados tanto das folhas da casa de vegetação quanto do meio ambiente foram obtidos somente da base foliar;
- Ambas bactérias inoculadas (*Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp.) mostraram-se como endofíticas. Ambas foram visualizadas nas camadas celulares ao redor das células centrais dos tricomas, na epiderme e com o passar do tempo também no parênquima;
- Até os dez dias, a bactéria *Burkholderia* sp., isolada da casa de vegetação como endofítica, mostrou melhor potencial de colonização da planta. Apesar de aos cinco dias exibir uma menor densidade populacional em relação à bactéria *Pseudomonas* sp., a população endofítica de *Burkholderia* aumentou ao longo do tempo e após dez dias alcançou o ápice foliar;

- O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora em *G. monostachia* com ação de curto prazo. Com apenas 1h, foram verificados aumentos significativos nas folhas jovens e na base das folhas intermediárias em resposta às bactérias inoculadas;
- Somente a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* acarretou em um aumento dos níveis de ácido salicílico (SA), o que indica que apenas ela foi reconhecida como potencial patógeno;
- Há uma divisão espacial entre diferentes porções foliares e grupos foliares na sinalização em resposta à infecção bacteriana;
- A inoculação das diferentes bactérias não acarretou em alteração dos níveis dos hormônios etileno (ET) e ácido-indol-3-acético (IAA).

Perspectivas

O presente estudo abriu possibilidades para a continuação e realização de outros trabalhos. Primeiramente foi feita uma coleção de bactérias isoladas como diazotróficas pelo ensaio de redução do acetileno a etileno e mais testes para confirmar a característica de fixadores de nitrogênio como a pesquisa da presença do gene *nifH* podem ser feitos com esses isolados. Seria bastante interessante se esse gene for confirmado em um ou nos dois isolados de *Dyella* sp., bactéria essa que cresce em meios de cultura sem a presença de nitrogênio reduzido e no presente estudo reduziu acetileno a etileno, porém, ainda não foi descrita na literatura sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Além disso, podem ser feitas ainda muitas pesquisas explorando o potencial para uso biotecnológico desses isolados como produção de antibióticos e fitormônios.

Quanto à inoculação, é interessante que se prossiga a análise da colonização e estimativa da população de *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. (os dois isolados que foram marcados com gene de fluorescência) por um tempo maior que os 10 dias para acompanhar se realmente as bactérias conseguem se estabelecer no interior dos tecidos foliares em longo prazo. E se isso ocorrer é interessante investigar os efeitos resultantes da inoculação ao longo do tempo para a planta. Podem ser realizadas medidas como crescimento, massa fresca e seca, conteúdo de água, potencial hídrico e também a quantificação dos teores de clorofilas e carotenoides. Cabe ressaltar que, para a avaliação da promoção do crescimento, precisa-se prever um tempo mais longo de estudo, talvez meses considerando a taxa lenta de desenvolvimento das bromélias.

Quanto à questão de contribuição de nitrogênio fixado, seria interessante primeiro se fazer uma análise de proporção de C/N e de

abundância natural de ^{15}N nos tecidos foliares. Se houver indícios de diferenças nesses valores entre plantas inoculadas e não inoculadas, pode-se aferir que as bactérias inoculadas estão fixando nitrogênio enquanto presentes nos tecidos foliares. Isso conduziria a estudos com as plantas em câmaras de atmosfera enriquecida com ^{15}N . Também poderia ser realizada uma transformação bacteriana com um gene de fluorescência de modo que a bactéria expressasse a fluorescência apenas se estiver fixando nitrogênio. Esses experimentos comprovariam que as bactérias fixam nitrogênio nos tecidos foliares.

Com a comprovação de que as bactérias contribuem com a nutrição nitrogenada, seria interessante então pesquisar se haveria uma influência no grau de expressão do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) realizado pelas plantas de *G. monostachia*. Uma vez que outros trabalhos mostraram que a nutrição nitrogenada interfere negativamente na expressão do CAM, seria provável que a expressão do CAM fosse reduzida com a inoculação das bactérias fixadoras de nitrogênio.

Se for verificado que as bactérias inoculadas no presente estudo realmente permanecem por longo prazo nos tecidos foliares, seria interessante também se fazer uma pesquisa das moléculas sinalizadoras com um tempo prolongado. Como, por exemplo, o ácido-indol-3-acético (IAA) que tem sido encontrado em elevadas concentrações endógenas em plantas terrícolas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento a partir de 15 dias após a inoculação. Porém, no caso das bromélias epífitas com tanque (plantas com raízes bastante reduzidas) ainda nada se sabe sobre esse efeito.

Com relação às outras moléculas sinalizadoras, apesar de não terem sido verificadas diferenças na emissão de etileno (ET), seria pertinente também mensurar o ácido jasmônico (JA), que é o outro fitormônio que

costuma atuar junto com o etileno na via de sinalização das plantas em resposta a colonização de micro-organismos benéficos.

Quanto ao óxido nítrico (NO), dentre os tempos investigados neste estudo, foi visto um aumento significativo após a inoculação bacteriana com apenas 1h. Seria, então, relevante a realização de ensaios com tempos menores (30min por exemplo) e maiores (4h por exemplo). Com o objetivo de se ter um maior indício da quantidade de NO produzida pela planta em resposta às bactérias poderia ser aplicado inibidores da síntese de NO nas bactérias previamente à inoculação.

Outro ponto a ser destacado é que foi feita uma tentativa de isolamento de bactérias diazotróficas das plantas cultivadas *in vitro* (dados não mostrados) e consideradas assépticas. Do extrato resultante após a maceração dessas plantas, foi observado crescimento bacteriano. Contudo, as tentativas de repique não foram bem sucedidas e, portanto, não foi possível o cultivo dessas bactérias. Seria interessante a realização de uma pesquisa do genoma bacteriano presente nessas plantas e a averiguação da existência dessas mesmas espécies nos indivíduos adultos.

Foram relatadas acima algumas das possibilidades para o prosseguimento da presente pesquisa. Porém, ainda falta muito para se conhecer sobre a interação de bactérias diazotróficas, e também de outros micro-organismos, com as bromélias epífitas.

Resumo

As bromélias habitam os mais diferentes ambientes sendo que muitas são encontradas como epífitas. Essas últimas estão sujeitas a condições de disponibilidade de água e nutrientes com intermitência. Elas conseguem sobreviver a essas circunstâncias por serem dotadas de diversas adaptações morfológicas e fisiológicas. A bromélia tanque *Guzmania monostachia* tem sido bastante estudada por possuir uma grande plasticidade fotossintética, porém, pouco é conhecido a respeito de outras possíveis adaptações como a interação com micro-organismos. Sendo assim, o presente trabalho isolou bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) tanto da parte externa (epifíticas) quanto da parte interna (endofíticas) de diferentes porções (ápice, mediana e base) de folhas coletadas tanto no ambiente natural quanto na casa de vegetação. As bactérias foram selecionadas por meio do ensaio de redução de acetileno (ARA) e também pelo uso de quatro diferentes meios de cultura que não contém fonte de nitrogênio reduzido. As linhagens isoladas foram identificadas por meio do gene 16sRNA. Dois isolados *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. foram escolhidos para serem marcados com um gene de fluorescência verde (GFP) e foram então inoculados (separadamente) em plantas de *G. monostachia* cultivadas em casa de vegetação. A colonização dos tecidos foliares foi monitorada com auxílio de um microscópio confocal. Além disso, foram estimadas as densidades populacionais epifíticas e endofíticas em diferentes grupos foliares (jovens e intermediários) e as folhas do grupo intermediário por serem maiores e totalmente expandidas foram divididas em porções (apical, mediana e basal). Também foram pesquisadas as seguintes moléculas descritas como importantes na interação entre planta e micro-organismo: óxido nítrico (NO), ácido salicílico (SA), etileno (ET) e ácido-indol-3-acético (IAA). Como resultados, a maioria das linhagens bacterianas foram

classificadas como pertencentes ao grupo Proteobacteria, mas também foram encontrados isolados gram positivos pertencentes aos grupos Actinobacteria e Firmicutes. As bactérias endofíticas foram isoladas somente da porção basal foliar (tanto das folhas originadas do meio ambiente quanto das folhas originadas da casa de vegetação). Cabe ressaltar que após a inoculação de ambas bactérias marcadas com GFP, foi observado elas no interior dos tricomas foliares (estruturas presentes principalmente na base foliar). Após 20 horas da inoculação, ambas bactérias já foram visualizadas no interior da epiderme das folhas. Após 5 dias as bactérias foram se espalhando para regiões mais distantes do tricoma e também foram observadas no parênquima. Após 10 dias a bactéria *Pseudomonas* sp. foi encontrada nas paredes dos vasos condutores. Foram re-isoladas bactérias epifíticas e endofíticas da mediana e da base foliar, mas não da porção apical. Após 10 dias as bactérias foram isoladas como endofíticas somente da base. Essa porção não apresentou diferenças nas populações epifíticas e endofíticas. O NO aumentou nas folhas jovens e na base das intermediárias em um curto período de tempo após a inoculação. Aparentemente, ambas as bactérias não dispararam a via do SA. De acordo com os resultados aqui presentes, ambas as bactérias não pareceram ser prejudiciais à *G. monostachia*. Além disso, o presente trabalho mostra fortes evidências de que as bactérias entram nos tecidos foliares por meio dos tricomas na base foliar e permanecem nessa porção, que é precisamente a mais importante para absorção de nutrientes.

Palavras-chave: bactérias fixadoras de nitrogênio; bromélias; sinalização planta-micro-organismo; GFP.

Abstract

Bromeliads inhabit different environments and many are found as epiphytes. These plants are often subjected to periods of water and nutrient shortage. For their survival, epiphytic bromeliads are endowed with different morphological and physiological adaptations. *Guzmania monostachia* is a tank-bromeliad that has been extensively studied because of its great photosynthetic plasticity. However, little is known about other possible survival adaptations, such as beneficial interactions with microorganisms. Here, we isolated nitrogen fixing (diazotrophic) bacteria from both the outside (epiphytic) and the inside (endophytic) of different leaf portions (apex, middle and base), collected in natural environment and in greenhouse-cultivated plants. The bacteria were selected using the acetylene reduction assay (ARA) and four different media that do not contain reduced nitrogen source. The strains were identified by 16S rRNA. Two isolates, *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. has been chosen to be tagged with green fluorescent protein (GFP) and then inoculated in *G. monostachia* plants cultivated in greenhouse. The colonization of the leaf tissues was monitored with the aid of confocal microscopy and also we estimate the external and internal bacterial population densities in different leaf groups (younger and expanded) and portions (apex, middle and base). In addition, we studied some important molecules in plant-microbe interactions: nitric oxide (NO), salicylic acid (SA), ethylene (ET) and indol-3-acetic acid (IAA). As a result, most of the isolated strains belong to the Proteobacteria group, but gram positive strains were also found belonging to the Firmicutes and Actinobacteria group. The endophytic bacteria were isolated only from the basal portion (both from leaves of natural environment and from leaves of greenhouse cultivated plants). Interestingly, after the inoculation of both bacteria tagged with GFP they

were visualized entering by trichomes present mainly in the basal portion. Twenty hours after the inoculation, the bacteria were visualized inside the epidermis of the leaves. After five days, the bacteria were detected in the parenchyma and, ten days after the inoculation *Pseudomonas* sp. was found on the vessels walls. It was possible to re-isolate epiphytic and endophytic bacteria from the base and middle portions, but not from the apex. After 10 days the endophytic bacteria were found only in the base. The base did not show differences between epiphytic and endophytic populations. NO increased in a short time after the inoculation in the younger leaves and in the basal portion of intermediate leaves. Apparently, the SA pathway was not triggered by any of the bacteria used. According to these results, the bacteria tested do not seem to be harmful to the plant. Furthermore, we strongly suggest that they enter through the trichomes on the leaf base and remain in this portion, which is precisely the most important for the absorption of nutrients.

Key words: Nitrogen-fixing-bacteria; Bromeliad; plant-microbe signaling molecules; GFP.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ARA – ensaio de redução do acetileno. Do inglês: *acetylene reduction assay*.

ARA+ - positivo para o ensaio de redução do acetileno. Do inglês: *acetylene reduction assay positive*.

ATP – adenosina trifosfato. Do inglês: *adenosine triphosphate*.

AU – unidades arbitrárias. Do inglês: *arbitrary units*.

CAM – metabolismo ácido das crassuláceas. Do inglês: *crassulacean acid metabolism*.

CFU – unidades formadoras de colônias. Do inglês: *colony forming units*.

DW – peso seco. Do inglês: *dry weight*.

ET – etileno. Do inglês: *ethylene*.

endo – endofíticos. Do inglês: *endophytic*.

epi – epifíticos. Do inglês: *epiphytic*.

FW – peso fresco. Do inglês: *fresh weight*.

GC-MS – cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas. Do inglês: *gas chromatography–mass spectrometry*.

GFP – proteína fluorescente verde. Do inglês: *green fluorescent protein*.

GH – casa de vegetação. Do inglês: *greenhouse*.

HR – resposta hipersensível. Do inglês: *hypersensitive disease resistance response*.

IAA – ácido-indol-3-acético. Do inglês: *indole-3-acetic acid*.

ISR – resistência sistêmica induzida. Do inglês: *induced systemic resistance*.

JA – ácido jasmônico. Do inglês: *jasmonic acid*.

JNFb – Johanna Döbereiner Novo Fábio Pedrosa (meio de cultura).

kb – unidade equivalente a 1000 pares de bases. Do inglês: *kilobase*.

LGD – Meio LG modificado por Campêlo & Döbereiner (meio de cultura).

LGI – Meio LG modificado por J. Ivo Baldani (meio de cultura).

MDH - malato desidrogenase. Do inglês: *malate dehydrogenase*.

NE – ambiente natural. Do inglês: *natural environment*.

NFb – Novo Fábio Pedrosa (meio de cultura).

NO – óxido nítrico. Do inglês: *nitric oxide*.

OD – densidade óptica. Do inglês: *optical density*.

PCR – reação em cadeia da polimerase. Do inglês: *polymerase chain reaction*.

PEPC – fosfoenolpiruvato carboxilase. Do inglês: *phosphoenolpyruvate carboxylase*.

RH – umidade relativa. Do inglês: *relative humidity*.

SA – ácido salicílico. Do inglês: *salicylic acid*.

SAR – resistência sistêmica adquirida. Do inglês: *systemic acquired resistance signaling*.

Referências Bibliográficas

- Abreu-Tarazi M. F.; Navarrete, A. A.; Andreote, F. D.; Almeida, C. V.; Tsai, S. M.; Almeida, M. (2010). Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. *World J Microbiol Biotechnol* **26**:555–560.
- Agrios G.N. (2005). *Plant Pathology*. 5th edition. Elsevier Academic Press: USA 948p.
- Ambrosini A.; Beneduzi A.; Stefanski T.; Pinheiro F.G.; Vargas L.K.; Passaglia L. M. P. (2012). Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant and Soil* **356**:245–264.
- Amenta M.; Molina-Favero C.; Creus C. M.; Lamattina L. (2015). Nitric Oxide in *Azospirillum* and related bacteria: production and effects. *In: Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols*. Springer International Publishing Switzerland, 2015.
- An D. S., Im W. T.; Yang H. C.; Yang D. C.; Lee S. T. (2005). *Dyella koreensis* sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:1625–1628.
- Anandham R.; Kwon S. W.; Indira Gandhi P.; Kim S. J.; Weon H.Y.; Kim Y.S.; Sa T.M.; Kim Y.K.; Jee H.J. (2011). *Dyella thiooxydans* sp. nov., a facultatively chemolithotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from rhizosphere soil of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**:392–398.
- Andrews J. H.; Harris R. F. (2000). The Ecology and Biogeography of Microorganisms on Plant Surfaces. *Annu Rev Phytopathol* **38**:145–180.
- Arasimowicz-Jelonek M.; Floryszak-Wieczorek J. (2014). Nitric oxide: An effective weapon of the plant or the pathogen? *Molecular Plant Pathology* **15**(4):406–416.
- Araújo W. L.; Marcon J.; Maccheroni W.; Van Elsas J. D.; Van Vuurde J. W.L.; Azevedo J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(10):4906–4914.
- Arora D. P.; Hossain S.; Xu Y.; Boon E. M. (2015). Nitric Oxide Regulation of Bacterial Biofilms. *Biochemistry* **54**:3717–3728.

- Azevedo J. L.; Maccheroni Jr W.; Pereira J. O. Araújo W. E. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. **3**(1): 40-65.
- Baldani J. I.; Baldani L. D. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **77**(3):549-579.
- Baldani J. I.; Caruso L.; Baldani V. L. D; Goe S. R.; Döbereiner J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants *Soil Biol Biochem.*; **29**(516):911-922.
- Baldotto L. E. B., Baldotto M. A., Canellas L. P., Bressan-Smith R, Olivares F. L. (2010). Growth Promotion of pineapple ‘Vitória’ by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization *R. Bras. Ci. Solo.* **34**:1593-1600.
- Baldotto L.E.B; Olivares; F. L; Bressan-Smith R. (2011). Structural interaction between gfp-labeled diazotrophic endophytic bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology* **42**:114–125.
- Bellin D.; Asai S.; Delledonne M.; Yoshioka H. (2013). Nitric oxide as a mediator for defense responses. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **26**:271–7.
- Benzing D. H. (2000). *Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation*. Cambridge, United Kingdom: University Press, Cambridge.
- Benzing D. H.; Seemann J.; Renfrow A. (1978). The foliar epidermis in Tillandsioideae (Bromeliaceae) and its role in habitat selection. *American Journal of Botany*. **65**(3): 359-365.
- Bhattacharjee R. B; Singh A; Mukhopadhyay S. N. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology Biotechnology*. **80**: 199-209.
- Boddey R. M.; Jantalia C. P.; Zotarelli L.; Okito A.; Alves B. J. R.; Urquiaga S. (2008). Techniques for the quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. In: Dakora FD, Chimphango SBM, Valentine AJ, Wlmerich C, Newton WE. *Biological nitrogen fixation: Towards poverty alleviation through sustainable agriculture*. Current plant sciences and biotechnology in agriculture 42. Springer, New York.

- Brenner D. J.; Krieg N. R.; Staley J. T. (eds 2005). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., vol. 2, parts A, B and C, Springer-Verlag, New York, NY.
- Brighigna L.; Montaini P.; Favilli F.; Trejo A. C. (1992). Role of the nitrogen-fixing bacterial microflora in the epiphytism of tillandsia (BROMELIACEAE). *American Journal of Botany* **79**:723–727.
- Canuto E. L.; Salles J. F.; Oliveira A. L. M.; Perin L.; Reis V. M.; Baldani J. I. (2003). Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia*; **37**(2): 67-72.
- Carvalho T. L.; Pires E.; Saraiva R.; Vargas L.; Bomfim A. C. J.; Ballesteros H.; Baldani J. I.; Ferreira P. C.; Hemerly A. S. (2014). Nitrogen fixation in grasses - gluconacetobacter activates genes in sugarcane. *BMC Proceedings* **8**(Suppl 4): O20.
- Carvalho T. L. G.; Ferreira P. C. G.; Hemerly A. S. (2011). Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. *Tropical Plant Biol.* **4**:31–41.
- Cassán F.; Vanderleyden J.; Spaepen S. (2014). Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation* **33**:440–459.
- Castro-González R.; Martínez-Aguilar L.; Ramirez-Trujillo A.; Estrada-de los Santos P.; Caballero-Mellado J. (2011). High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. *Plant Soil* **345**:155–169.
- Chen J.; Vandelle E.; Bellin D.; Delledonne M. (2014). Detection and function of nitric oxide during the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: Where there's a will there's a way. *Nitric Oxide* **43**:81–88.
- Cheng H. P.; Walker G. C. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **180**:5183–5191.
- Chowdhury S. P.; Schmid M.; Hartmann A.; Tripathi A. K. (2007). Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar Desert, India. *Microbial Ecology* **54**:82–90.
- Clarridge J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for

- identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**(4):840–862.
- Creus C. M.; Graziano M.; Casanovas E. M.; Pereyra M. A.; Simontacchi M.; Puntarulo S.; Barassi C. A.; Lamattina L. (2005). Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* **221**:297–303.
- Cushman J. C.; Borland A. M. (2002). Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment*. **25**: 295–310.
- Derksen H.; Rampitsch C.; Daayf F. (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Science* **207**:79–87.
- Dobbelaere, S.; Vanderleyden J.; Yaacov O (2003). Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **22**(2): 107-149.
- Döbereiner J.; Baldani V. L. D.; Baldani J. I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa; 1995. 60 p.
- Duca D.; Lorv J.; Patten C. L.; Rose D.; Glick B. R. (2014). Indole-3-acetic-acid in plant-microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek* **106**: 85-125.
- EMBRAPA. Embrapa e UFPR desenvolvem primeiro inoculante para milho e trigo. Imprensa, notícias, agosto de 2009 [homepage on the internet]. Disponível em: <www.embrapa.br>. [2009 out 8].
- Ferrara F. I. S.; Oliveira Z. M.; Gonzales H. H. S.; Floh E. I. S.; Barbosa H.R. (2012). Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil* **353**:409–417.
- Freschi L.; Takahashi C. A.; Cambui C. A.; Semprebom T.R.; Cruz A. B., Mioto P. T.; de Melo Versieux L.; Calvente A.; Latansio-Aidar S. R., Aidar M. P. M., Mercier H. (2010a). Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology* **167**:526–533.
- Freschi L.; Rodrigues M.A.; Domingues D.S.; Purgatto E.; Sluys M. Van; Magalhaes J. R.; Kaiser W. M.; Mercier H. (2010b). Nitric Oxide Mediates the Hormonal Control of Crassulacean Acid Metabolism Expression in Young Pineapple Plants. *Plant physiology* **152**:1971–1985.

- Gaby J. C.; Buckley D. H. (2012). A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS ONE* **7**
- Galloway J. N.; Dentener F. J.; Capone D. G.; Boyer E. W.; Howarth R. W.; Seitzinger S. P.; Asner G. P.; Cleveland C. C.; Green P. A.; Holland E. A.; Karl D. M.; Michaels A. F.; Porter J. H.; Townsend A. R.; Vorosmarty C. J. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*; **70**: 153–226.
- Giongo A.; Beneduzi A.; Gano K.; Vargas L. K.; Utz L.; Passaglia L. M. P. (2013). Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea*. *Biota Neotrop.* **13**:80–85.
- Givnish T. (2005). A Review of: “Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation.” *Systematic Biology* **54**:340–344.
- Givnish T. J.; Barfuss M. H. J.; Ee B. Van; Riina R.; Schulte K.; Horres R.; Gonsiska P.A.; Jabaily R.S.; Crayn D.M.; Smith J.A.C.; Winter K.; Brown G.K.; Evans T.M.; Holst B.K.; Luther H.; Till W.; Zizka G.; Berry P.E.; Sytsma K.J. (2014). Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **71**:55–78.
- Givnish T.J.; Barfuss M. H. J.; van Ee B.; Riina R.; Schulte K.; Horres R.; Gonsiska P. A.; Jabaily R. S.; Crayn D. M.; Smith J. A. C.; Winter K.; Brown G. K.; Evans T. M.; Holst B.K.; Luther H.; Till W.; Zizka G.; Berry P. E.; Sytsma K. J. (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* **98**:1-24.
- Glazebrook J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**:205–227.
- Goffredi S. K.; Kantor A. H.; Woodside W.T. (2011). Aquatic Microbial Habitats Within a Neotropical Rainforest: Bromeliads and pH-Associated Trends in Bacterial Diversity and Composition. *Microbial Ecology* **61**:529–542.
- Gonçalves A. Z.; Hoffmann F. L.; Mercier H.; Mazzafera P.; Romero G. Q. (2014). Phyllosphere bacteria improve animal contribution to plant nutrition. *Biotropica* **46**(2):170–174.
- González R.; Laudat T.; Arzola M.; Méndez R.; Marrero P.; Pulido L. E.; Dibut B.; Lorenzo J. C. (2011). Effect of *Azotobacter chroococcum* on

- in vitro pineapple plants growth during acclimatization. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant. **47**:387–390.
- Green M. R.; Sambrook J. (2012). Molecular cloning: a laboratory manual 4th edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 3v.
- Gtari M.; Ghodhbane-Gtari F.; Nouioui I.; Beauchemin N.; Tisa L. S. (2012). Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. Archives of Microbiology **194**:3–11.
- Hallmann J.; Quadt-Hallmann A.; Mahaffee W. F.; Kloepper J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology.; **43**(10): 895-914.
- Hardoim P. R.; Hardoim C. C. P.; van Overbeek L. S., van Elsas J. D. (2012). Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. PLoS ONE **7**
- Hardoim P. R.; van Overbeek L. S.; Elsas J. D. van (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology **16**:463–471.
- Hartmann; Baldani J. I. (2006). The Genus *Azospirillum*. In: Prokaryotes **5**:115–140.
- Hasan H. (2005). Nitrogen: Understanding the elements of the periodic table. New York: The Rosen Publishing Group; 2005. 48 p.
- Kiba T.; Kudo T.; Kojima M.; Sakakibara H. (2011). Hormonal control of nitrogen acquisition: Roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. Journal of Experimental Botany **62**(4):1399–1409.
- Kumar V.; Gera R. (2013). Isolation of a multi-trait plant growth promoting *Brevundimonas* sp. and its effect on the growth of Bt-cotton. **4**:97–101.
- Kurepin L. V.; Park J.M.; Lazarovits G.; Bernards M. A. (2014). *Burkholderia phytofirmans*-induced shoot and root growth promotion is associated with endogenous changes in plant growth hormone levels. Plant Growth Regulation **75**:199–207.
- Leme E. M. C.; Marigo L. C. (1993). Bromélias na natureza. Rio de Janeiro: Marigo, Comunicação visual. 1993.

- Lima E.; Boddey R. M.; Döbereiner, J. (1987). Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. *Soil Biology Biochemistry*; **19**(2): 165-170.
- Liu W.; Li L.; Khan M. A.; Zhu F. (2012). Popular molecular markers in bacteria. *Molecular Genetics Microbiology and Virology* **27**(3):103–107.
- Lodewyckx C.; Vangronsveld J.; Porteous F.; Moore E. R. (2002). Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **21**(6): 583-606.
- Malhotra M.; Srivastava S. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology* **45**:73–80.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Stahl, D. A.; Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms*. 13th edition. Pearson. 1152p.
- Matiz A.; Miotto P.T.; Mayorga A.Y.; Freschi L.; Mercier H. (2013). CAM Photosynthesis in Bromeliads and Agaves : What Can We Learn from These Plants? In: Zvy Dubinsky, *Photosynthesis*, Croatia: InTech. 2:91–134.
- Melo N. K. G.; Bianchetti R. E.; Lira B. S.; Oliveira P. M. R.; Zuccarelli R.; Dias D. L. O.; Demarco D.; Peres L. E. P; Rossi M.; Freschi L. (2016). Nitric oxide, ethylene and auxin crosstalk mediates greening and plastid development in deetiolating tomato seedlings. *Plant Physiology* first published on February 2016. doi: 10.1104/pp. 16. 00023.
- Melotto M.; Underwood W.; Koczan J.; Nomura K.; He S.Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* **126**:969–980.
- Navarro L.; Dunoyer P.; Jay F.; Arnold B.; Dharmasiri N.; Estelle M.; Voinnet O.; Jones J. D. G. (2006). A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* **312**, 436-439.
- Ortíz-Castro R.; Contreras-Cornejo H.A.; Macías-Rodríguez L.; López-Bucio J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant signaling & behavior* **4**(8):701–712.
- Palaniappan P.; Chauhan P. S.; Saravanan V. S.; Anandham R.; Tongmin Sa. (2010). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biology and Fertility of Soils* **46**(8):807–816.

- Palma-Silva C.; Fay M. F. (2015). Bromeliaceae in focus. *Botanical Journal of the Linnean Society* **179**:215–217.
- Pariona-Llanos R.; Ferrara, F. I; Soto- Gonzales H. H., Barbosa H. R. (2010). Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. *European Journal of Soil Biology* **46**:387–393.
- Pel, M. J. C; Pieterse C. M. J. (2012). Microbial recognition and evasion of host immunity. *Journal of Experimental Botany* **63**:695–709.
- Pereira P. N.; Purgatto E.; Mercier H. (2013). Spatial division of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrate reductase activity and its regulation by cytokinins in CAM-induced leaves of *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology* **170**:1067–1074.
- Pieterse C. M. J. (1998). A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. *The Plant cell* **10**:1571–1580.
- Pieterse C. M. J.; Zamioudis C.; Berendsen R. L.; Weller D. M.; van Wees S. C. M.; Bakker P. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual review of phytopathology* **52**:347-75.
- Postgate J. (1998). Nitrogen Fixation. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1998. 112 p.
- Pozo M. J.; Van Loon L. C.; Pieterse C. M. J. (2004). Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**:211–222.
- Puente M. E.; Bashan Y. (1994). The desert epiphyte *Tillandsia recurvata* harbours the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri*. *Canadian Journal of Botany* **72**:406–408.
- Puri A.; Padda K. P.; Chanway C. P. (2015). Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth? *Soil Biology and Biochemistry* **89**:210–216.
- Rigui A. P.; Gaspar M.; Oliveira V. F.; Purgatto E.; Carvalho M. A. M. (2015). Endogenous hormone concentrations correlate with fructan metabolism throughout the phenological cycle in *Chrysolaena obovata*. *Ann. Bot.* **115**:1163–1175.
- Röszer T. (2012). Nitric Oxide is a Bioproduct in Prokaryotes 19–46. *In: The Biology of Subcellular Nitric Oxide*. Springer.

- Ryan R. P.; Germaine K; Franks A; Ryan D. J.; Dowling D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. **278**: 1-9.
- Santos, F. L. A; Medeiros, E. M.; Souza M. J. (2012). Contexto Hidroclimático do enclave úmido do maciço de Baturité – Ceará: potencialidades e limitações ao uso da terra. Revista Geonorte ed especial 2 **2(5)**:1056–1065.
- Schlesinger WH; Bernhardt ES. (2013). Biogeochemistry: An analysis of global change. 3rd ed. Elsevier Inc; 2013.
- Schmidt G.; Zotz G. (2001). Ecophysiological consequences of differences in plant size: in situ carbon gain and water relations of the epiphytic bromeliad, *Vriesea sanguinolenta*. Plant, Cell and Environment **24**: 101 - 111.
- Schmidt M.; Balsanelli E.; Faoro H., Cruz L.M.; Wassem R., de Baura V., Weiss V.; Yates M.G.; Madeira H.M.F.; Pereira-Ferrari L.; Fungaro M.H.P.; de Paula F.M.; Pereira L.F.P.; Vieira L.G.E.; Olivares F.L.; Pedrosa F.O.; de Souza E.M.; Monteiro R. (2012). The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. BMC Microbiology **12**:98.
- Seefeldt L. C.; Hoffman B. M.; Dean, D. R. (2009). Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. Annu. Rev. Biochem. **78**:701–22.
- Silvera K., Neubig K. M., Whitten W. M., Williams N. H., Winter K., Cushman J. C. (2010). Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum. Functional Plant Biology.; **37**:995–1010.
- Siqueira Filho; Tabarelli M. (2006). Bromeliad species of the Atlantic forest of north-east Brazil: losses of critical populations of endemic species. Oryx **40**(2):218–224.
- Spence C.; Bais H. (2015). Role of plant growth regulators as chemical signals in plant-microbe interactions: a double edged sword. Current opinion in plant biology **27**:52–58.
- Spoel S.H.; Dong X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. Nature reviews Immunology **12**:89–100.
- Takahashi C.A.; Mercier H. (2011). Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: characterization of a spatial and functional division. Journal of plant physiology **168**:1208–1216.

- Taulé C.; Mareque C.; Barlocco C.; Hackembruch F.; Reis V.M.; Sicardi M.; Battistoni F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* **356**:35–49.
- Thuler D.S.; Floh E.I.S.; Handro W.; Barbosa H.R. (2003). *Beijerinckia derxii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. *Journal of Applied Microbiology* **95**:799–806.
- Tolker-nielsen T.I.M.; Brinch U.C.; Ragas P.C.; Andersen J.B.O.; Jacobsen C.S. (2000). Development and Dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. *Journal of Bacteriology* **182**:6482–6489.
- Vendan R.T.; Yu Y.J.; Lee S.H.; Rhee Y.H. (2010). Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *Journal of Microbiology* **48**(5):559–565.
- Venieraki A.; Dimou M.; Vezyri E.; Vamvakas A.; Katinaki P.A.; Chatzipavlidis I.; Tampakaki A.; Katinakis P. (2014). The nitrogen-fixation island insertion site is conserved in diazotrophic *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas* sp. isolated from distal and close geographical regions. *PLoS ONE* **9**:1-8.
- Vitor S.C.; Duarte G.T.; Saviani E.E.; Vincentz M.G.A.; Oliveira H.C.; Salgado I. (2013). Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal activity of nitric oxide during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. *Planta* **238**:475–486.
- Weber O. B.; Baldani V. L. D.; Teixeira K. R. S.; Kirchhof G., Baldani J. I.; Dobereiner J. (1999). Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil*. **210**: 103–113.
- Weber O. B.; Correia D.; Rocha M. W., Alvez G. C.; Oliveira E. M; Sá E. G. (2003). Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. *Pesq. agropec. bras.* 2003; **38**(12): 1419-1426.
- Xie C.H.; Yokota A. (2005). *Dyella japonica* gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**:753–756.
- Yin C.; Hulbert S.H.; Schroeder K.L.; Mavrodi O.; Mavrodi D.; Dhingra

- A.; Schillinger W.F.; Paulitz T.C. (2013). Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* **79**(23):7428–7438.
- Zakhia F.; Jeder H.; Willems A.; Gillis M.; Dreyfus B.; De Lajudie P. (2006). Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology* **51**:375–393.
- Zotz G.; Hietz P. (2001). The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of Experimental Botany* **52**(364):2067–2078.
- Zotz G.; Hietz P.; Schmidt G. (2001). Small plants, large plants: the importance of plant size for the physiological ecology of vascular epiphytes. *Journal of experimental botany* **52**(363):2051–2056.