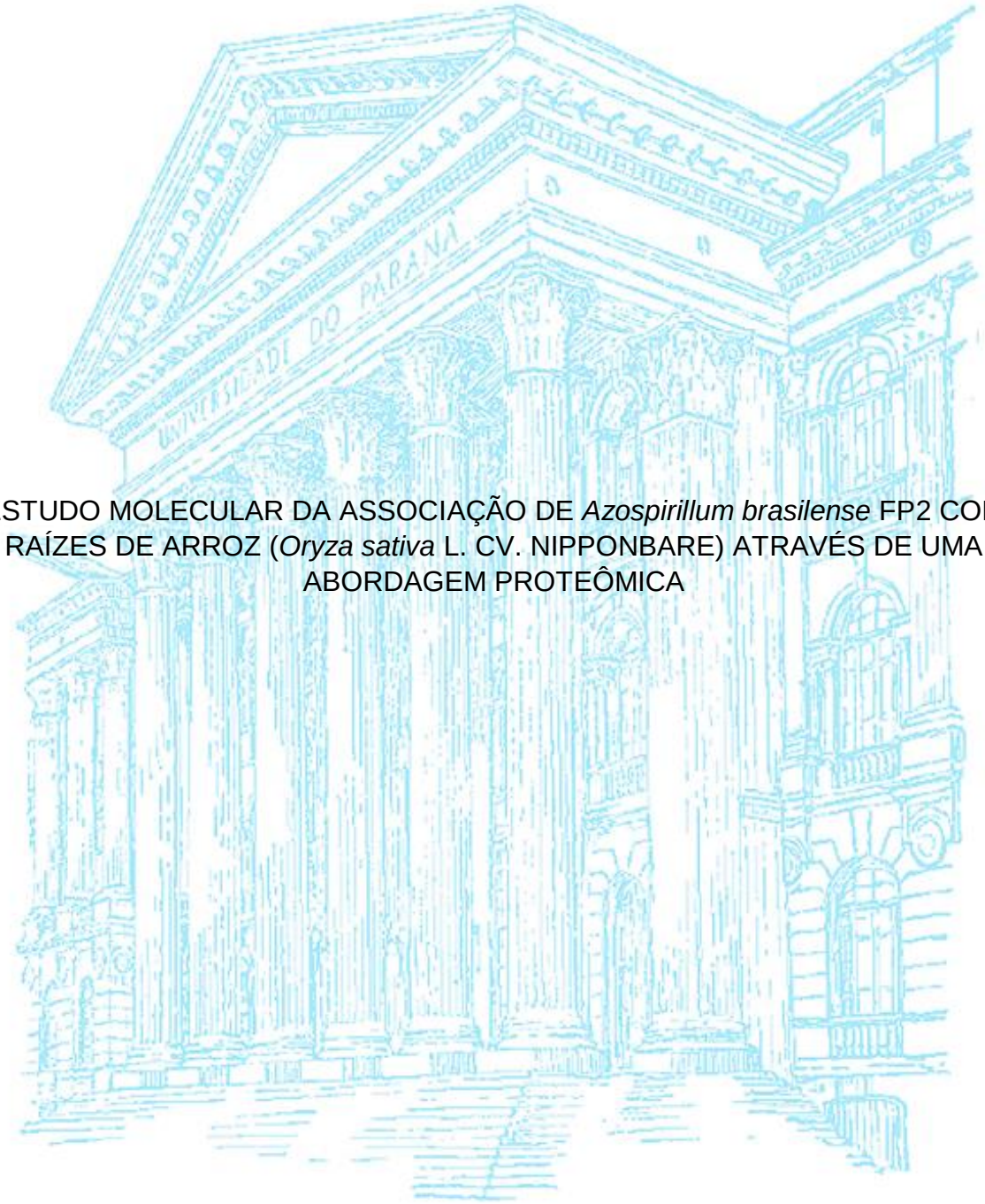
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALEX TRAMONTIN ALMEIDA

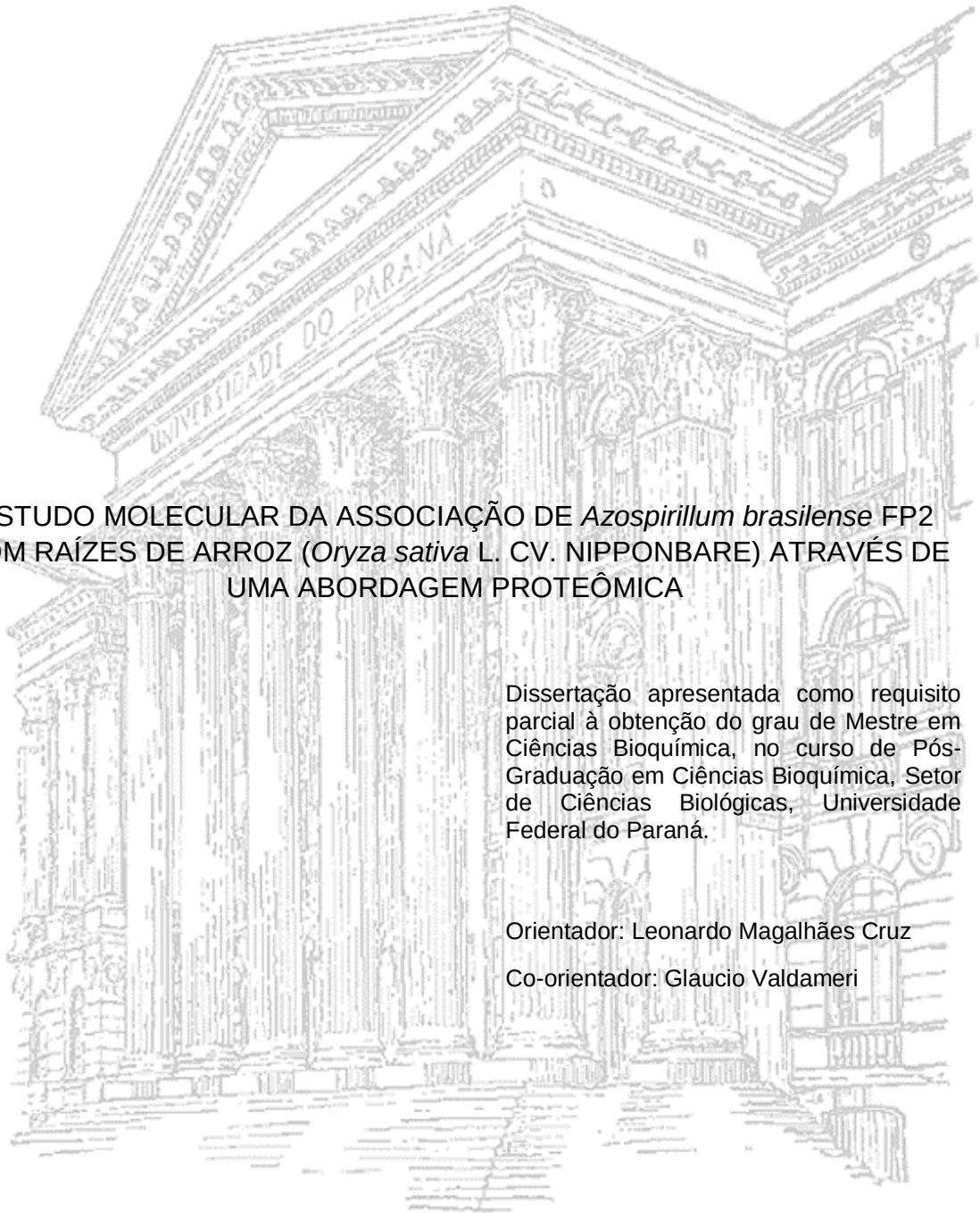


ESTUDO MOLECULAR DA ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* FP2 COM RAÍZES DE ARROZ (*Oryza sativa* L. CV. NIPPONBARE) ATRAVÉS DE UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

CURITIBA

2016

ALEX TRAMONTIN ALMEIDA



ESTUDO MOLECULAR DA ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* FP2 COM RAÍZES DE ARROZ (*Oryza sativa* L. CV. NIPPONBARE) ATRAVÉS DE UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Bioquímica, no curso de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Leonardo Magalhães Cruz

Co-orientador: Glaucio Valdameri

CURITIBA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

ALEX TRAMONTIN DE ALMEIDA

ESTUDO MOLECULAR DA ASSOCIAÇÃO ENTRE Azospirillum brasiliense FP2 E RAÍZES DE ARROZ (Oryza sativa L. cv. NIPPONBARE) ATRAVÉS DE UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA)

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz - Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof.ª Dr.ª Dayane Alberton
Departamento de Análises Clínicas – UFPR

Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo
Setor Litoral, UFPR

Curitiba, 22 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador e co-orientador, Leonardo Magalhães Cruz e Glaucio Valdameri, pelo tempo e oportunidade disponibilizados e por confiar a mim esse projeto.

Agradeço ao Dr. Gustavo Antônio de Souza da Universidade de Oslo – Noruega, por aceitar a colaboração e tornar esse trabalho possível.

Agradeço ao Professor Luciano F. Huergo, por entrar em contato com Dr. Gustavo, para conseguirmos a colaboração.

Agradeço a Dra. Vivian R. Moure pela ajuda com as análises no cromatógrafo gasoso.

Agradeço ao Professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza pela confiança e por ter comprado as sondas fluorescentes para a análise proteômica 2D-DIGE, apesar de não ter sido possível realizar por essa abordagem, foi possível implementar a técnica no laboratório.

Agradeço ao Dr. Daniel R. Lammel por ter conseguido as sementes de arroz cv. Nipponbare.

Agradeço ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio, ao programa de pós-graduação em Ciências Bioquímica e a Universidade Federal do Paraná e a todos os professores que de alguma forma contribuíram.

Agradeço as agências financiadoras CNPq, Capes, Fundação Araucária e INCT pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

Agradeço aos meus pais Márcia e Valdir, por dedicarem suas vidas por mim e nunca deixarem faltar nada e a minha irmã Aline.

Agradeço ao amor da minha vida Juliana Travensoli, por sempre estar ao meu lado, como namorada e amiga e sempre ter paciência comigo.

Agradeço a todos os amigos do laboratório que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho ou para meu crescimento pessoal especialmente para Adrian R. dos Santos, Rafaela Perez, Ana Paula e Esther Esteves.

Agradeço aos meus amigos externos ao laboratório que são muito importantes para mim e participaram dessa etapa em minha vida, Gianne Manosso, Tialin Barbosa, Daniel Sedorko, Gabriela Reichert, Milene Castro, Anamaria Cequinel.

“A ciência não só é compatível com a espiritualidade; é uma profunda fonte de espiritualidade. ”

Carl Sagan

RESUMO

O rápido aumento na população mundial seguido por um aumento de danos ao meio ambiente, traz como consequência uma produção insuficiente para alimentar toda a população. Dessa maneira é essencial que a produtividade agrícola aumente nos próximos anos, tentando reduzir os danos ao meio ambiente. O uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) como *A. brasilense* é uma alternativa e uma realidade na agricultura nos dias de hoje. Entretanto dados moleculares sobre a interação de *A. brasilense* ainda são escassos. Para entender os mecanismos moleculares envolvidos na interação de *A. brasilense* e arroz cv. Nipponbare, foi utilizada uma abordagem proteômica livre de gel por LC-MS/MS, além de outras abordagens para caracterizar aspectos específicos dessa interação. A análise proteômica foi realizada em raízes de arroz inoculadas e não inoculadas com *A. brasilense* FP2, a análise possibilitou identificar um total de 6.158 proteínas, sendo 5.157 proteínas do arroz e 1.001 proteínas de *A. brasilense.* A colonização pela bactéria nas raízes do arroz modulou a expressão de 171 proteínas, entre essas proteínas de controle do ciclo celular, receptor do tipo quinase e um sensor de Ca_2^+, essas proteínas estão ligadas a um aumento na proliferação e crescimento celular. *A. brasilense* FP2 desencadeou uma resposta sistêmica que pode conferir a planta um sistema imune mais robusto, adicionalmente *A. brasilense* FP2 expressou proteínas ligadas a quimiotaxia, motilidade, biofilme síntese de PHB, auxina e fixação de nitrogênio. Dessa maneira, esse trabalho possibilitou caracterizar aspectos na interação de *A. brasilense* e arroz que podem proporcionar um melhor entendimento e uso dessa PGPB.

Palavras chave – Análise proteômica, LC-MS/MS, arroz, *A. brasilense* FP2, *Oryza sativa,* PGPB, Nipponbare.

ABSTRACT

The rapid increase of the world's population followed by increase in environmental damage, results in insufficient production to feed the entire population. Therefore, it is essential that agricultural productivity be increased in the coming years, trying to reduce the environmental damage. Crop inoculation with plant growth promoting bacteria (PGPB), such as *A. brasilense,* is one alternative applied in agriculture nowadays. However, molecular knowledge of *A. brasilense* -plant interaction are still scarce. To understand the molecular mechanisms involved in *A. brasilense* and rice cv. Nipponbare interaction, gel free proteomic approach by LC-MS/MS, and other approaches to characterize specific aspects of this interaction was used. The proteomic analysis was performed on inoculated and non-inoculated rice roots with *A. brasilense* FP2. The analysis allowed us to identify a total of 6,158 proteins, including 5,157 rice proteins and 1,001 *A. brasilense* proteins. The bacteria colonizing rice roots were capable to modulate the expression of 171 proteins, such as cell cycle control proteins, kinase receptor and a type Ca_2^+ sensor. These proteins have been reported to increase cell proliferation and root growth. Taken together, the results showed that *A. brasilense* FP2 triggered a systemic response that can give the plant a more robust immune system. Additionally, *A. brasilense* FP2 expressed proteins related to bacterial chemotaxis, motility, biofilm formation, PHB synthesis, auxin and nitrogen fixation. Thus, this work made it possible to characterize molecular aspects of *A. brasilense* and rice interaction helping better understand the use of this PGPB in agriculture.

Keywords – Proteomic Analysis, LC-MS / MS, rice, *A. brasilense* FP2, *Oryza sativa*, PGPB, Nipponbare.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PRODUÇÃO MUNDIAL DE CEREAIS EM 2014.. 15
FIGURA 2 - OS BENEFÍCIOS DA INTERAÇÃO ENTRE PLANTA-BACTÉRIA. 17
FIGURA 3 – CONTAGEM DE *A. brasilense* FP2 POR CITOMETRIA DE FLUXO EM RAÍZES DE ARROZ CV. NIPPONBARE 3 e 7 DAI..... 35
FIGURA 4 - GRÁFICO DE DENSIDADE DE FSC-H POR SSC-H DAS CÉLULAS DE *A. brasilense* FP2 ASSOCIADAS A RIZOSFERA DE ARROZ CV. NIPPONBARE. 36
FIGURA 5 – TOTAL DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR LC-MS/MS E PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM RAIZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ INOCULADOS E NÃO INOCULADOS COM *A. brasilense* FP2.. 37
FIGURA 6 – VOLCANO PLOT DEMONSTRA A DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE EXPRESSÃO ($_{LOG2}$) E SUAS SIGNIFICANCIAS ESTÁTISTICAS APRESENTADAS EM [-LOG10(VALOR DE P)]..... 38
FIGURA 7 – CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A ONTOLOGIA DE GENES EXPRESSOS EM RAÍZES DE ARROZ INOCULADAS COM *A. brasilense* FP2.. 39
FIGURA 8 – COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO EM NÍVEL TRADUCIONAL (LC-MS/MS) E EM NÍVEL TRANSCRICIONAL (RT-qPCR). 41
FIGURA 9 – CORRELAÇÃO, OBTIDA POR REGRESSÃO LINEAR. 42
FIGURA 10 -MODELO PROPOSTO PARA A VIA DE SINALIZAÇÃO NO CONTROLE DA INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR (PC) E REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO.. 50
FIGURA 11 – ANÁLISE NO SOFTWARE MAPMAN PARA UMA VISÃO GERAL DE PROTEÍNAS DO ARROZ IDENTIFICADAS COMO RESPOSTA A ESTRESSE ABIÓTICO E BIÓTICO.. 52
FIGURA 12- RESPOSTA CELULAR CONTRA ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.. 53
FIGURA 13 – PRODUÇÃO DE ETILENO NO ARROZ INOCULADO COM *A. brasilense* FP2 OU *H. seropedicae* OU NA AUSÊNCIA DE INÓCULO EM 3 OU 7 DIAS.. 54
FIGURA 14 – ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE DE *A. brasilense* FP2 ASSOCIADO A RAIZES DE ARROZ CV. NIPPONBARE.. 59
FIGURA 15 – PRODUÇÃO DE PHB DE *A. brasilense* FP2 E MUTANTE *ΔPHAC1* EM CULTURA, 3 E 7 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO EM ARROZ.CV. NIPPONBARE. 62
FIGURA 16 – FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) DE *A. brasilense* FP2 EM CULTURA E INOCULADO EM ARROZ CV. NIPPONBARE.. 64
FIGURA 17- VIA BIOSINTÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO EM A. brasilense. 65
FIGURA 18 -MOTILIDADE, QUIMIOTAXIA E FORMAÇÃO DE BIOFILME NA SUPERFICIE DA RAIZ DA PLANTA.. 66

FIGURA 19 – POSSIVEIS EFEITOS OBSERVADOS EM ENSAIOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DA ASSOCIAÇÃO DE *A. BRASILENSE* FP2 A RAÍZES DE ARROZ CV. NIPPONBARE. 68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- OLIGONUCLEOTÍDEOS INCIADORES (*PRIMERS*) PARA QUANTIFICAÇÃO POR RT-qPCR, GENES SELECIONADOS PARA A VALIDAÇÃO DO PROTEOMA, GENES ALVOS PARA AS VIAS DA METIONINA E ESPERMIDINA E NORMALIZADORES PREVIAMENTE SELECIONADOS EM OUTROS TRABALHOS. 31
TABELA 2 GENES DO ARROZ COM A EXPRESSÃO REPRIMIDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE NÃO INOCULADO 43
TABELA 3 GENES DO ARROZ COM A EXPRESSÃO INDUZIDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE NÃO INOCULADO 45
TABELA 4- GENES DO ARROZ DE RESPOSTA A ESTRESSE BIÓTICO OU ABIÓTICO NA PRESENÇA DE *A. brasilense* FP2..... 55
TABELA 5 – PROTEÍNAS DO *A. brasilense* ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO 60
TABELA 7 - PROTEÍNAS DO *A. brasilense* ENVOLVIDAS EM REDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO..... 63
TABELA 8- PROTEÍNAS DO *A. brasilense* ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE AUXINA 65

LISTA DE TABELAS - ANEXO

TABELA - ANEXO 1 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COMO TRANSPORTADOR ABC DO A. brasilense..... 88

TABELA - ANEXO 2 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS DO A. brasilense, MOTILIDADE, QUIMIOTAXIA E BIOFILME 89

LISTA DE SIGLAS

BPCV - bactéria promotora do crescimento vegetal

FBN – fixação biológica do crescimento vegetal

PGPB - plant growth promoting bacteria

MS – Espectrômetro de massa

LC – Cromatografia liquida

m/z – Massa/ carga

TOF - *time of flight*

CID - *Collision-induced dissociation*

HCD - *high collision dissociation*

PHB – Polihidroxibutirato

ERO – espécies reativas de oxigênio

AIA- ácido indolacético;

DEPC- Dicarbonato de dietila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14

2.1. ORYZA SATIVA L. GRUPO JAPONICA CULTIVAR NIPPONBARE 14

2.2. BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL 15

2.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) 17

2.4. O GÊNERO AZOSPIRILLUM 19

2.5. ANÁLISE PROTEÔMICA 21

3. OBJETIVOS 23

3.1. OBJETIVO GERAL 23

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23

4. MATERIAL E MÉTODOS 24

4.1. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DA PLANTA 24

4.2. COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ POR *A. BRASILENSE* FP2 24

4.3. PESO SECO DAS RAÍZES E PARTES AÉREAS 25

4.4. PRODUÇÃO DE ETILENO 25

4.5. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ 26

4.6. ANÁLISE PROTEÔMICA 27

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO 28

4.8. QUANTIFICAÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) 29

4.9. MEDIDA DA ATIVIDADE DA NITROGENASE 29

4.10. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ, SÍNTESE DE CDNA E RT-QPCR 30

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 33

5.1. FLUXOGRAMA DO CULTIVO DE ARROZ INOCULADO COM *A. BRASILENSE* FP2 33

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34

6.1. COLONIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA RAIZ DO ARROZ POR *A. BRASILENSE* FP2 34

6.2. ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ INOCULADAS COM *A. BRASILENSE* FP2 POR LC-MS/MS 36

6.3. VALIDAÇÃO DE ANÁLISE PROTEÔMICA POR RT-QPCR 40

6.4. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS RAIZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ REPRIMIDAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE NÃO INOCULADO COM *A. BRASILENSE* FP2 43

6.5. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS RAIZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ INDUZIDAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE NÃO INOCULADO COM *A. BRASILENSE* FP2 44

6.6. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS RAIZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ INDUZIDAS OU REPRIMIDAS LIGADAS A ESTRESSE BIÓTICO OU ABIÓTICO 51

6.7. GENES DE *A. BRASILENSE* IDENTIFICADOS POR LC-MS/MS NAS AMOSTRAS DE RAIZES INOCULADAS 58

7. CONCLUSÕES 67

8. REFERÊNCIAS 69

ANEXOS 88

1. INTRODUÇÃO

O arroz, trigo e milho representam mais 50% das fontes de calorias para a população e consequentemente são consideradas as principais culturas agrícolas do mundo (*The Global Rice Science Partnership* - GRiSP, 2016). A produção mundial de arroz em 2014 foi cerca de 470 milhões de toneladas e o seu consumo pela população humana é responsável por 21% da energia diária *per capita* (Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz – IRRI, 2014). Considerando que o arroz é um importante alimento para a população humana, e a que a perspectiva que até 2050 o planeta será habitado por 9 bilhões de pessoas, torna-se essencial um aumento na produção, diminuição nos custos e utilização de técnicas de menor impacto ecológico desse cereal para atender a demanda global de forma sustentável (GODFRAY et al. 2012).

Para se elevar a produção desses cereais tem se aumentado a utilização de fertilizantes no solo. Esse elevado aumento na utilização de produtos químicos traz consequências como um aumento nos custos da produção e danos ao meio ambiente, como por exemplo poluição de rios e lençóis freáticos. Dessa forma tem sido proposto que a utilização de biofertilizantes como bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB, do inglês, *Plant Growth Promoting Bacteria*), capazes de fixar nitrogênio, solubilizar fosfatos, produzir hormônios vegetais, etc., constitui uma alternativa biotecnológica para contornar esses problemas, aumentando a produção e diminuindo os danos e custos (LUCY et al. 2004; GLICK, 2012). *Azospirillum brasilense* é um exemplo de PGPB que vem sendo empregado com sucesso em plantações de cereais em todo o mundo, promovendo um aumento na escala de 5 a 30% na produção em trigo e milho (OKON e LABANDERA-GONZALES, 1994). Algumas estirpes de *A. brasilense* podem promover o crescimento de folhas e raízes em arroz (ARGUISSAIN et al. 2013); entretanto, dados moleculares sobre a interação entre *A. brasilense* e arroz são escassos.

Nos últimos anos muitos esforços têm sido feitos para melhor entender os mecanismos relacionados com a promoção de crescimento vegetal induzida por PGPB (GLICK, 2012), contudo, poucos estudos em nível molecular foram realizados até a presente data. O proteoma é compreendido como o conjunto de proteínas expressas de um organismo em um estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica (GRAVES e HAYSTEAD, 2002) e a abordagem proteômica tem permitido estudos de larga escala da expressão proteica em determinada condição, assim possibilitando um melhor entendimento das respostas moleculares durante o processo

de interação planta-bactéria. Esse entendimento é de fundamental importância para uma melhor aceitação desses organismos como eficazes na prática agrícola (REED AND GLICK, 2004).

Nesse trabalho foi utilizada uma abordagem proteômica livre de gel para estudar os mecanismos moleculares complexos envolvidos durante a interação entre *A. brasilense* FP2 e arroz cv. Nipponbare. Nessa abordagem foi comparado o perfil de proteínas expressas de raízes de arroz não inoculadas e inoculadas com *A. brasilense* FP2 foi avaliado após 7 dias e a expressão e alguns genes codificadores para proteínas diferencialmente expressas identificadas foram também confirmadas por PCR quantitativo em tempo real. Outras abordagens foram utilizadas para caracterizar aspectos específicos desta interação, como dosagem de etileno produzido pela planta, quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio e produção de PHB em bactérias epifíticas, e atividade especifica da nitrogenase durante a interação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Oryza sativa* L. GRUPO JAPONICA CULTIVAR NIPPONBARE

O arroz (*Oryza sativa L.)* é o alimento básico para mais de 3 bilhões de pessoas, sendo o grão em segundo lugar com maior produção no mundo com 740 milhões de toneladas produzidas em 2014, ficando atrás apenas do milho (*Zea mays*) (*The Global Rice Science Partnership - GRiSP*, 2016) (FIGURA 1). Adicionalmente a sua importância agrícola, o arroz é uma planta modelo para estudos moleculares que podem ser estendidos para monocotiledôneas como milho, trigo, cevada e sorgo (GOFF, 2002).

O arroz Japonica cv. Nipponbare teve seu genoma completamente sequenciado em 2005 através do Projeto Internacional de Sequenciamento do Genoma do Arroz (IRGSP, do inglês *The International Rice Genome Sequencing Project*) (KAWAHARA et al. 2013), seguido pelo projeto de Anotação (RAP do inglês *Rice Annotation Project*) (OHYANAGI et al. 2016). Devido à sua fácil manipulação genética e os dados de sequenciamento do genoma inteiro, o cultivar Nipponbare é amplamente utilizado na pesquisa genômica funcional (HU et al. 2014), como pode ser evidenciado nos recentes trabalhos; análise comparativa de raízes de arroz inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (ALBERTON et al.2013), análise proteômica durante a germinação (YANG et al. 2017), avaliação da ativação

transcricional relacionada ao processo de arquitetura da planta (LU et al. 2013) e entre outros (DU et al. 2007; SHIONO et al. 2014; XU et al. 2015; ZHANG et al. 2014).

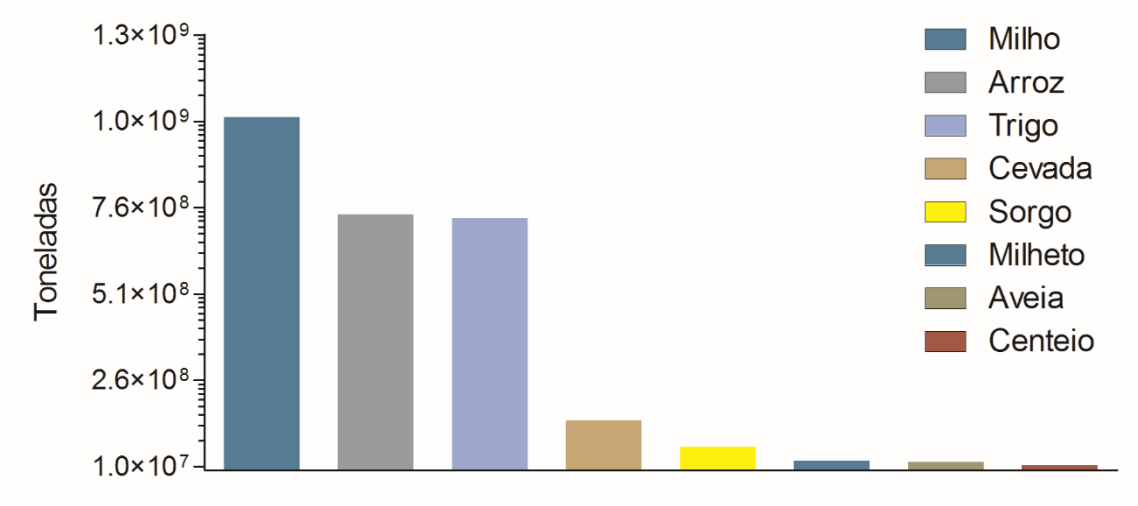


FIGURA 1- PRODUÇÃO MUNDIAL DE CEREAIS EM 2014. FONTE- FAO 2016.

2.2. BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

O solo está repleto de formas microscópicas de vida entre elas bactérias, fungos, protozoários e algas. Dessas, as bactérias são os microrganismos mais comuns no solo (em torno de 95%), podendo ser encontrados em torno de 10^8 a 10^9 células por grama de solo. Entretanto em áreas estressadas podem apresentar um número bem menor de células, em torno de 10^4 células por grama de solo (TIMMUSK et al., 2011; SCHOENBORN et al., 2004; GLICK, 2012). Dessa maneira, as bactérias não são encontradas uniformemente e dependem das condições desse solo. Tipicamente, as maiores concentrações de bactérias são encontradas ao redor de raízes de plantas (na rizosfera), isso devido a presença de nutrientes, incluindo açucares, amino ácidos, ácidos orgânicos e pequenas moléculas do exsudato das raízes das plantas (BADRI e VIVANCO, 2009 ; BADRI et al. 2009; BAIS et al. 2006).

As interações das bactérias com as plantas podem ser classificadas como neutra, prejudicial ou benéfica (LYNCH, 1990). A interação benéfica com bactérias promotoras do crescimento vegetal podem promover o crescimento por duas formas diferentes; i) diretamente facilitando a aquisição e disponibilidade de recursos ou modulando os níveis de hormônios da planta ou, ii) indiretamente inibindo patógenos, melhorando a saúde da planta e protegendo-a contra estresse abiótico (FIGURA 2). (GLICK, 1995; BABALOLA, 2010; MANTELIN e TOURAINE 2004; YANG et al. 2009; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Os mecanismos diretos de promoção do crescimento vegetal incluem: (i) Síntese de 1-aminociclopropano-1-carboxylato (ACC) -deaminase o qual promove a redução dos níveis de etileno nas raízes em desenvolvimento; (ii) produção de reguladores de crescimento da planta como auxinas, giberelinas e citocininas; (iii) fixação biológica de nitrogênio; (iv) solubilização de minerais como fósforos e outros nutrientes. Por outro lado, os mecanismos indiretos de promoção de crescimento vegetal relatados são o biocontrole por atividade antagonista e *Quorum sensing* (QS) de microrganismos fitopatógenos induzindo resistência sistêmica, (BASHAN e HOLGUIN 1997; AHMAD et al. 2008; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014). Via de regra, a combinação desses elementos faz da bactéria uma boa promotora de crescimento vegetal, e a visualização dos benefícios gerados pela interação planta-bactéria constituem a primeira etapa no estudo dos mecanismos bacterianos de promoção do crescimento vegetal (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

O termo rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR do inglês *plant growth promoting rhizobacteria*) foi usado primeiramente por Kloepper e Schroth (1978) para descrever bactérias que colonizam a rizosfera ou o interior dos tecidos das plantas podendo estimular o crescimento por diversos mecanismos e posteriormente generalizado para bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB, *plant growth promoting bacteria*). (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014). Desde então, pesquisadores visam compreender como estas bactérias realizam seus efeitos positivos, de modo a utilizar estes microrganismos para aumentar a produtividade e diminuir o impacto ambiental negativo decorrente da intensa utilização de fertilizantes, herbicidas e pesticidas (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Diferentes formulações de inoculantes contendo PGPB estão comercialmente disponíveis e podem ser aplicadas a diversas culturas (LUCY et al. 2004). Atualmente a utilização de inoculantes microbianos tem aumentado substancialmente, facilitado pela extensa e sistemática pesquisa que mostra sua eficiência e consistência (BERG 2009; THAKORE 2006; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

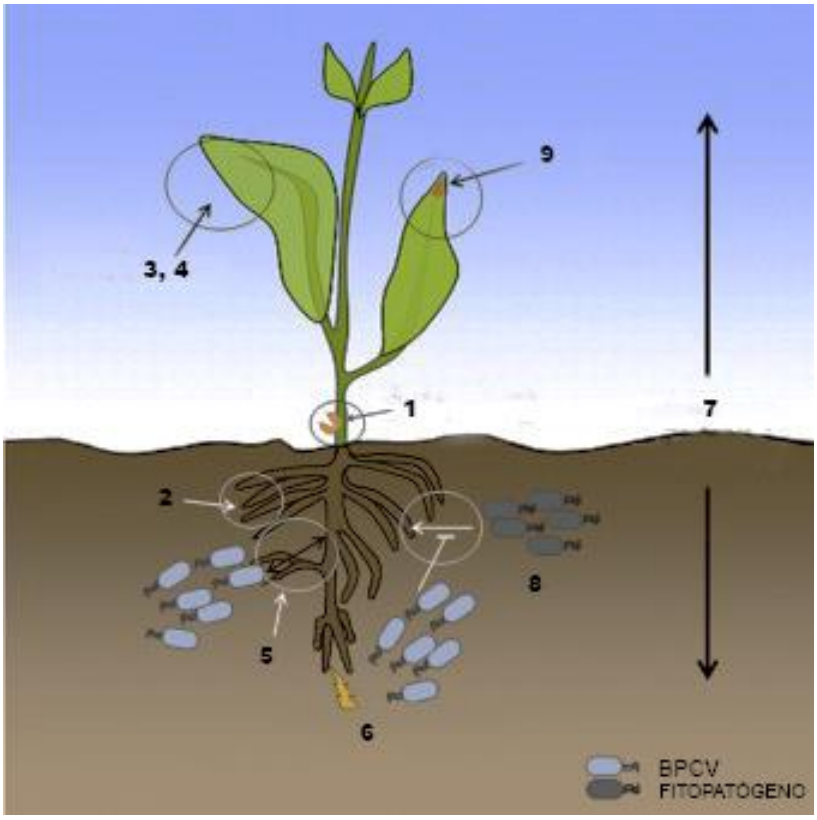


FIGURA 2 - OS BENEFÍCIOS DA INTERAÇÃO ENTRE PLANTA-BACTÉRIA INCLUEM: (1) AUMENTO NA TAXA DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES, (2) CRESCIMENTO DE RAIZ, (3) AUMENTO DE ÁREA FOLIAR, (4) AUMENTO TEOR DE CLOROFILA, (5) AUMENTO NA ABSORÇÃO DE NUTRIENTES, TEOR DE PROTEÍNAS, ATIVIDADE HIDRÁULICA, (6) TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ABIÓTICO, (7) AUMENTO COMPRIMENTO E PESO DE RAIZ E FOLHAS, (8) BIOCONTROLE E (9) ADIAMENTO DA SENESCÊNCIA VEGETAL. FONTE: MODIFICADO DE PÉREZ-MONTAÑO ET AL., 2014. COPYRIGHT © 2013 ELSEVIER GMBH. ALL RIGHTS RESERVED.

2.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN)

Ainda que o nitrogênio seja um dos elementos mais abundantes da Terra, é um elemento limitante no crescimento da maioria das plantas. Em consequência de sua indisponibilidade, as plantas conseguem utilizar o nitrogênio apenas em sua forma reduzida (SMIL, 1999; SOCOLOW, 1999; GRAHAM AND VANCE, 2000; VANCE, 2001). As plantas obtêm esse elemento de três principais formas: (i) através de fertilizantes comerciais em formar de amônia, nitrato ou ureia (ii) mineralização da matéria orgânica; e (iii) pela fixação do N_2 atmosférico realizada, principalmente por microrganismos diazotróficos associados a planta, que promovem a fixação biológica do nitrogênio (VANCE, 2001).

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) foi descrita pela primeira vez por Beijerinck em 1901 (BEIJERINCK, 1901), e é um processo realizado por um grupo especializado de procariotos. Esses organismos utilizam um complexo enzimático chamado de nitrogenase, para produzir a partir de N_2 atmosférico, amônio (NH_3),

forma de nitrogênio assimilável pelas plantas (POSTGATE e CANNON, 1981). A nitrogenase catalisa a seguinte reação estequiométrica:

$$N_2 + 8\ e^- + 8\ H^+ + 16\ MgATP \longrightarrow 2\ NH_4^+ + 16\ MgADP + 16\ Pi + H_2$$

Os microrganismos capazes de realizar o processo de FBN são denominados diazotrofos, e podem ser separados em dois grupos dependendo da interação com um hospedeiro vegetal: (i) diazotrofos de vida livre, não precisam estar associados a um hospedeiro para fixar N_2 atmosférico; e (ii) diazotrofos simbióticos que dependem do estabelecimento de uma interação com um hospedeiro vegetal, dessa maneira utilizam o exsudato vegetal como fonte de energia e excretam íons amônio produzidos diretamente dentro da célula vegetal (BURRIS,1991).

Aproximadamente 50 milhões de toneladas por ano de NH_4^+ são fixados por bactérias associadas às leguminosas de importância agrícola (GRAHAM e VANCE, 2003). Adicionalmente, 3 a 5 milhões de toneladas de amônio são produzidas por bactérias associadas a leguminosas em ecossistemas naturais (GRAHAM e VANCE, 2003).

Os maiores responsáveis por essa grande quantidade de N_2 fixado são os rizóbios, sendo capazes de se associar simbioticamente com leguminosas e promovendo a FBN. Essa interação entre rizobio-legume é possível devido ao reconhecimento de sinais moleculares específicos da planta e do microrganismo (SPAINK, 2000). O microrganismo invade os tecidos das raízes de leguminosas e promove a formação de estruturas especializadas, chamadas nódulos que criam um microambiente com disponibilidade de nutrientes e concentração de oxigênio controlada (BREWIN, 1998; KAMINSKI, 1998). Esse processo é extremamente regulado em diversos níveis e exige uma diferenciação e ajuste de metabolismo de ambos os organismos.

Em gramíneas não são encontradas estruturas simbióticas especializadas, como nódulos nas raízes (REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998), contudo, bactérias diazotróficas têm sido encontradas aderidas as raízes, bactérias descritas como epifíticas, ou mesmo colonizando o interior de tecidos de algumas gramíneas, como o arroz (BALDANI et al., 2000), cana-de-açúcar (NJOLOMA et al., 2006) e sorgo (JAMES et al., 1997), descritas como endofíticas. Dentre estas bactérias que fixam o nitrogênio e promovem o crescimento vegetal se encontram os generos *Azospirillum, Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum,* dentre diversos outros.

2.4. O GÊNERO *AZOSPIRILLUM*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos diazotróficos e capazes de crescer utilizando nitrogênio atmosférico como fonte única de nitrogênio, aeróbios, gram negativas de formato vibrióide possuindo flagelo polar ou peritricoso e encontradas nos mais diversos ambientes ao redor do mundo com uma temperatura ótima de crescimento que pode variar de 28 a 41ºC, dependendo da espécie (ECKERT et al., 2001; BALDANI e BALDANI, 2005). As fontes de carbono preferencialmente utilizadas por *Azospirillum* spp. são ácidos orgânicos como malato, lactato, succinato e piruvato. Carboidratos como D-frutose e D-glucose podem ser utilizados por algumas espécies (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). O metabolismo de nitrogênio é versátil, podendo ser utilizados como fonte de nitrogênio: nitrato, nitrito, amônio, aminoácidos e nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). *Azospirillum* spp. podem associar-se com raízes de diversas plantas de importância agrícola como o milho, trigo, sorgo e arroz (DÖBEREINER e DAY, 1976: DÖBEREINER, 1991; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; ECKERT et al., 2001). Algumas estirpes podem colonizar tanto a rizosfera como o interior de raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Estas bactérias podem ser aplicadas com sucesso mesmo a raízes de plantas que não possuem relatos de colonização por *Azospirillum* (BASHAN et al., 2004).

O gênero *Azospirillum* pertence a classe das Alfaproteobactérias e possui dezoito espécies descritas: *Azospirillum brasilense* (TARRAND et al. 1978), *Azospirillum lipoferum* (BEIJERINCK, 1925. TARRAND et al., 1978), *Azospirillum halopraeferans* (REINHOLD et al., 1987), *Azospirillum amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983. MAGALHÃES et al., 1984), *Azospirillum irakense* (KHAMMAS et al., 1991. KHAMMAS et al., 1989), *Azospirillum largimobile* (SKERMAN et al. 1983. DEKHIL et al., 1997), *Azospirillum doebereinerae* (ECKERT et al., 2001), *Azospirillum oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005), *Azospirillum canadense* (MEHNAZ et al. 2007), *Azospirillum fermentarium* (LIN et al. 2013), *Azospirillum formosense* (LIN et al. 2012), *Azospirillum humicireducens* (ZHOU et al. 2013), *Azospirillum melinis* (PENG et al. 2006), *Azospirillum picis* (LIN et al. 2009), *Azospirillum rugosum* (YOUNG et al. 2008), *Azospirillum thiophilum* (LAVRINENKO et al. 2010), *Azospirillum zeae* (MEHNAZ et al. 2007) e *Azospirillum largomobile* (SKERMAN et al. 1983; BEN DEKHIL et al. 1997). *A. brasilense* e *A. lipoferum* são as espécies mais bem estudada entre as bactérias

desse gênero (BALDANI e BALDANI, 2005), principalmente em relação aos seus efeitos promotores de crescimento vegetal.

Além de fixar nitrogênio, que pode ser assimilado pela planta, *Azospirillum* spp. apresentam outros mecanismos já descritos capazes de beneficiar as plantas durante a interação e promover seu crescimento, tais como a produção e modulação de hormônios vegetais (auxinas, etileno e giberelinas) (BASHAN et al., 2004). Tem sido relatado em vários estudos de inoculação com *Azospirillum* spp. um aumento significativo no rendimento da produção de grãos, com um acréscimo no conteúdo de fósforo, potássio e de nitrogênio total das plantas (BASHAN e HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004). Esse aumento na produção de grão com a inoculação de estirpes de *Azospirillum* spp. tem sido atribuído principalmente a um efeito geral no crescimento das raízes, dessa maneira, a planta consegue aumentar a capacidade de assimilação de nutrientes do solo (KAPULNIK et al., 1985; BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Os microrganismos pertencentes a este gênero são na maioria rizosféricos ou epifíticos, mas algumas estirpes podem colonizar também o interior de raízes (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Especula-se que a etapa inicial de adesão de *A. brasilense* ocorra por quimiotaxia mediada pelo flagelo, em seguida ocorre a etapa irreversível de adesão mediada por polissacarídeos da própria bactéria (ALEXANDRE, GREER e ZHULIN, 2000; ALEXANDRE, 2010). Alguns trabalhos mostram a variabilidade dos polissacarídeos de parede e sua influência na agregação celular, adsorção na raiz e sobrevivência da célula bacteriana (BURDMAN et al., 2001; LERNER et al., 2009). Em *Setaria viridis* a inoculação com *A. brasilense* sob condições adequadas pode fornecer nitrogênio por FBN suficiente para sustentar o crescimento robusto da planta (PANKIEVICZ et al. 2015). Em trigo foi observado um aumento de 30% da massa da raiz e 25% na massa total após 8 dias da inoculação com *A. brasilense,* além de promover uma notável mudança na expressão de genes com atividades transportadora, refletindo efeito direto na absorção de nutrientes, como nitrogênio (CAMILIOS-NETO et al. 2014).

As estirpes de *Azospirillum* spp. promotoras do crescimento vegetal tem grande potencial biotecnológico, através da produção de inoculantes comerciais, que têm sido testados e utilizados em centenas de milhares de hectares, principalmente na América Latina (FUENTES-RAMIREZ e CABALLEROMELLADO, 2005; HUNGRIA et al., 2010; HELMAN, BURDMAN e OKON, 2011). No Brasil, as estirpes de *A.*

brasilense AbV5 e AbV6 tem sido amplamente utilizada. Na safra 2012-2013 foram inoculadas aproximadamente 2,5 milhões de hectares de milho e trigo (fonte: ANPII).

Em um levantamento de ensaios conduzidos por 20 anos, Okon e Labandera-Gonzales (1994) relataram um aumento na produtividade, que foi atribuído à inoculação com *A. brasilense* , com aumentos estatisticamente significativos na ordem de 5% a 30%. Em outro levantamento realizado na Argentina, com 273 trabalhos de inoculação com *A. brasilense* em trigo (*Triticum aestivum* L.), em 76% dos casos houve aumento médio na produtividade de 256 kg/ha; em milho (*Zea mays* L.) 85% dos casos responderam positivamente, com um aumento médio na produtividade de 472 kg/ha (DÍAZ-ZORITA e FERNANDEZ CANIGIA, 2008).

2.5. ANÁLISE PROTEÔMICA

Com advento do sequenciamento de DNA em larga escala, nos últimos anos tem sido gerado uma quantidade imensa de dados de genomas dos mais variados organismos. No entanto, apenas o conhecimento genômico não é suficiente para uma compreensão completa acerca dos diversos mecanismos fisiológicos que operam nos organismos, não sendo possível observar eventuais modificações pós-traducionais ou controle da atividade gênica em resposta a condições ambientais específicas. Isto se deve ao fato de o genoma ser um repositório estático da informação genética, enquanto que estudos funcionais como a análise proteômica abarcam as respostas celulares às mais diversas situações que são extremamente dinâmicas (HONDERMARCK et al. 2008; FUKUZAKI 2013).

Em uma era de pós-genômica, uma abordagem proteômica de larga escala baseada em espectrometria de massas (MS) pode contribuir para o entendimento de funções genéticas para biologia (AEBERSOLD e MANN, 2003). Tais experimentos em larga escala envolvem análises de misturas complexas de proteínas derivadas a partir de culturas de células, tecidos lisados e/ou fluídos (COX e MANN, 2011 ; CRAVATT et al., 2007).

A habilidade em sequenciar e identificar peptídeos em uma mistura complexa por MS/MS tem evoluído significativamente nas últimas décadas, com recentes gerações de espectrômetros de massas mais sensíveis e rápidos e com maiores resoluções (DOMON e AEBERSOLD, 2006; MANN e KELLEHER, 2008).

Para analises proteômicas em larga escala, a abordagem aleatória (do inglês, *shotgun)* em sistema livre de gel têm substituído a abordagem convencional, baseada

em géis 2D, tornando-se atualmente a abordagem de escolha. (LINK et al.,1999 ; Mccormack et al., 1997). Em proteômica *shotgun*, essa mistura complexa de proteínas é enzimaticamente digerida, então os peptídeos são separados por cromatografia líquida (LC) e identificados por espectrometria de massas sequencial (AEBERSOLD e MANN, 2003).

.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

A análise do proteoma da interação das raízes de arroz *O. sativa* L. Nipponbare durante a interação com *A. brasilense* FP2.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Análise do perfil proteico de raízes de plântulas de arroz inoculadas e não inoculadas com *A. brasilense* FP2;

3.2.2. Análise dos genes diferencialmente expressos durante a colonização das raízes de plântulas de arroz por *A. brasilense* FP2;

3.2.3. Monitoramento da colonização de raízes de arroz por inoculação com *A. brasilense* FP2.

3.2.4. Avaliação da condição de estresse da planta por quantificação da produção de etileno.

3.2.5. Avaliação da produção de polihidroxibutirato (PHB), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e atividade da nitrogenase de *A. brasilense* FP2 durante a colonização de raízes de arroz.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DA PLANTA

Sementes de *Oryza sativa* Japonica cv. Nipponbare (Arroz) foram descascadas e tiveram sua superfície esterilizada com etanol 70% por 1 minuto, seguida por incubação em solução de hipoclorito de sódio 8% (v/v) contendo Triton X-100 0,1% por 30 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas 15 vezes em água Milli-Q estéril e incubado sobre agitação (120 rpm) por 16 horas em solução de 0,025% (v/v) de fungicida (Vitavax®) a 30°C, seguido por mais 4 horas de incubação sobre agitação (120 rpm) em água Milli-Q estéril. Então as sementes com a superfície desinfestadas foram geminadas protegidas da luz por 3 dias a 30°C em placas de agar-água 0,7% (m/v) estéril.

Após 3 dias de geminação, duas plântulas foram transferidas assepticamente para tubos de vidro contendo esferas de polipropileno (5,5g) e 25 mL de solução estéril de nutrientes Hoagland livre de carbono e nitrogênio (HOAGLAND e ARNON 1950), com a seguinte composição: 1mmol/L KH_2PO_4, 1mmol/L K_2HPO_4, 2mmol/L $MgSO_4.7H_2O$, 2mmol/L $CaCl_2.2H_2O$, 1mL/L solução de microelementos (H_3BO_3 2,86mol/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,81mol/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,22mol/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,08mol/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,02mol/L), e 1mL/·L solução de Fe-EDTA ($Na_2H_2EDTA.2H_2O$ 13,4mmol/Le $FeCl_3.6H_2O$ 6mol/L), pH 6,5−7,0.

As plantas foram cultivadas a 28°C com foto período de 14 horas dia e 10 horas noite, humidade entre 60-70% por 7 dias. *A. brasilense* FP2 foi cultivado em meio NFbHP-lactato (MACHADO et. Al., 1991) contendo 20mmol/L de NH_4Cl e os antibióticos Ácido nalidíxico (10 mg/L) e estreptomicina (50 mg/L) a 30°C em agitador a 120 rpm até D.O.600nm= 1,0 (aproximadamente 10^8 células/mL). Para inoculação com *A. brasilense,* as plântulas foram incubadas por 30 minutos em uma suspensão de bactérias (10^8 células/mL) na proporção de 1 mL de cultura para cada semente. Após inoculação as sementes foram transferidas para tubos de vidro contendo 25mL de solução Hoagland livre de carbono e nitrogênio por 3 e 7 dias.

4.2. COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ POR *A. BRASILENSE* FP2

A colonização das raízes por *A. brasilense* FP2 foi monitorada através de contagem de células por citometria de fluxo. A contagem de bactérias

epifíticas foi realizada 3 e 7 dias após a inoculação. Para realizar a contagem as plantas foram retiradas dos tubos de vidro e as raízes separadas da parte aérea. As raízes foram colocas em microtubos, pesadas e foi adicionado 1 mL de tampão PBS contendo 1mmol/L 1 EDTA e 0,01% Tween 20 (tampão nomeado como TBAC). Os microtubos foram vigorosamente agitados por 1 minuto e a suspensão de células foi recuperada em um microtubo novo. A suspensão de células foi diluída 10 vezes e a contagem realizada em citometro de fluxo BD Accuri™ C5 equipado com laser de excitação de 488nm. Para contagem das bactérias aderidas a raiz, 10µL de cada amostra foi adquirido. O número de células epifíticas foi expresso em número de células por grama de raiz (VALDAMERI et al., 2015).

4.3. PESO SECO DAS RAÍZES E PARTES AÉREAS

As plantas de arroz das condições controle e inoculadas com *A. brasilense* FP2 ou *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 por 3 ou 7, foram colocados em papel absorvente e secos em estufa a 50°C de dois a três dias, então o peso foi determinado em balança analítica.

4.4. PRODUÇÃO DE ETILENO

A produção de etileno foi determinada 3 e 7 dias após inoculação. Para avaliar a produção de etileno pela planta, 3 plântulas de arroz foram plantadas em cada tubo. Foram realizados dois experimentos independentes contendo 15 tubos em cada condição. Além do controle não inoculado e plantas inoculadas com *A. brasilense,* foi utilizado um controle inoculado com *H. seropedicae*, o qual é conhecido por diminuir a produção de etileno pela ação da enzima ACC deaminase (PEDROSA et al. 2011; ALBERTON et. al., 2013). Os tubos contendo as plantas nestas três condições foram tampados com SubaSeal® por 48 horas e a produção de etileno foi determinada por cromatografia gasosa (Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna Porapak N e detector FID) com coluna e o detector mantidos a 120 e 200°C, respectivamente. A produção de etileno foi expressa em nmol/g de raiz seca. A quantidade de etileno foi calculada utilizando um padrão externo de etileno (100 ppm) em nitrogênio gasoso.

4.5. EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ

A extração das proteínas foi baseada no método de extração com fenol e precipitação com acetato de amônio em metanol (MEYER et. Al. 1988). Sete dias após inoculação as raízes foram separadas da parte aérea e armazenadas em congelador a -80°C. Para a extração, 750mg de raízes de arroz inoculado com *A. brasilense* e não inoculado foram macerados em graal com pistilo pulverizadas com nitrogênio líquido. O pó macerado foi transferido para um frasco de vidro e adicionado 8mL do tampão de extração gelado (50mol/L Tris-HCl pH 8,5, 5mol/L EDTA, 100mol/L KCl, 30% (m/v) sacarose, 1% (m/v) DTT, 1mol/L PMSF). As amostras foram sonicadas por 10 vezes de 15 segundos com intervalos de 30 segundos no gelo e transferidas para um tubo de 50mL, no qual foi adicionado 8 mL de fenol saturado Tris-HCl pH 8,0 e incubado por 10 minutos no gelo com períodos de agitação em *vortex*. Os tubos foram centrifugados a 4500 *x g* por 30 minutos a 4°C, a fase fenólica foi transferida para tubos de 50mL novos e 8mL de fenol foi adicionado a fase aquosa, incubado por 10 minutos no gelo com períodos de agitação em *vortex*, centrifugado a 4500 *x g* por 30 minutos a 4°C e a fase fenólica foi recuperada no tubo contendo a primeira fase fenólica. O total da fase fenólica foi misturado com o mesmo volume de tampão de extração e incubado por 10 minutos em gelo com períodos de agitação em *vortex* e centrifugado a 4500 *x g* por 30 minutos a 4°C. A fase fenólica foi recuperada em um novo tubo de 50mL e as proteínas precipitadas durante a noite usando 3 vezes o volume de 100mmol/L de acetato de amônio em metanol a -20°C. No outro dia os tubos foram centrifugados a 4500 *x g* por 30 minutos a 4°C. O *pellet* foi transferido para microtubos de 1,5mL e então lavados três vezes com metanol e três vezes com acetona, 50% das proteínas foram dissolvidas em uma solução contendo 8mol/L de ureia, 30mmol/L de TRIS, 4% CHAPS (pH 8,5) e tiveram sua concentração determinada com Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD) de acordo com o as recomendações do fabricante. Os outros 50% foram centrifugadas, secas e encaminhadas para analise proteômica.

4.6. ANÁLISE PROTEÔMICA

A análise do proteoma de raízes de plântulas de arroz colonizadas e não colonizadas com *A. brasilense* FP2 foi realizada em colaboração com Dr. Gustavo Antônio de Souza da Universidade de Oslo – Noruega.

As amostras de proteínas de raízes de plântulas de arroz inoculados e não inoculadas com *A. brasilense* FP2 de uma quadruplicata biológica foram analisas em LC/MS-MS.

Para a digestão das proteínas em solução, 15µg de proteínas totais solubilizadas em 50 µL de 100mmol/L de bicarbonato de amônio pH 8,0 tiveram suas ligações dissulfeto reduzidas com 1µL de 1mmol/L de Ditiotreitol (DTT) a 57°C por 45 minutos. Grupos sulfidrilas livres foram alquiladas com 1µL de iodoacetamida (IAA) 5,5mmol/L por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. As proteínas reduzidas e alquiladas foram então digeridas com tripsina (Promega) na proporção de 1:50 a 37°C durante 12 horas e a reação foi parada com ácido trifluoroacético (TFA) em uma concentração final de 3% v/v. Os peptídeos foram dessalinizados por cromatografia em fase reversa usando micro colunas de resina C18. Após a dessalinização as amostras foram injetadas em LC-MS em uma triplicata técnica.

A análise de espectrometria de massa foi realizada usando um hibrido quadrupole-Orbitrap (QExactive) (ThermoElectron) acoplado a um sistema nano-LC Ultimate 3000 (Dionex). Os peptídeos foram separados em uma coluna analítica de 15cm com um diâmetro interno de 75µM e resina de fase reversa de 3µM (Dionex) com conexão Viper (Dionex). Foi utilizado um fluxo de 300nL/min em um sistema de solvente binário consistindo de solvente A (2% de acetonitrila, 0,095% de ácido fórmico em água) e solvente B (90% de acetonitrila, 0,095% de ácido fórmico em água) com um gradiente linear de 12-35% de acetonitrila por 120 minutos.

O espectrômetro de massas Q Exactive foi operado em modo de variação automática entre aquisição de MS e MS/MS, método top10. A busca de espectro MS (300 – 1750m/z) foi adquirida no Orbitrap com resolução de 70000, após uma acumulação de íons alvos de $1x10^6$ baseado em um valor de ACG (*Automatic Gain Control*) de um escaneamento prévio. A exclusão dinâmica foi fixada em 45 segundos. Os 10 íons diferentes mais intensos (>2.0 m/z) foram isolados sequencialmente e fragmentado por alta energia na célula de colisão

quadripolo (*higher-energy collisional dissociation*-HCD) com um tempo de injeção máximo de 120ms e 35000 de resolução. Tipicamente as condições do espectrômetro de massas foram as seguintes: voltagem do spray, 2kV; energia de colisão do HCD em 25%. A seleção de corte de íons foi fixada em $1x10^6$.

Para a identificação e quantificação dos peptídeos e proteínas os arquivos extraídos do LC-MS-MS foram processados usando software MaxQuant desenvolvido para trabalhar com dados adquiridos em equipamentos de alta resolução, auxiliado por um mecanismo para identificação de peptídeos Andromeda (COX e MANN. 2008, 2012). O MaxQuant usa o perfil completo de eluição cromatográfico, a distribuição dos isótopos e possíveis pares SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*) para determinar a massa precursora individual com alta precisão e rigor, o que é parte principal para o processo de identificação.

Os bancos de dados dos genomas utilizados para identificação das proteínas foram para o arroz (*O. sativa*) *The International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP)* versão 1.0 de 31 de março de 2015 e *A. brasilense* sp. 245 *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de 7 de abril de 2015.

As proteínas identificadas foram consideradas diferencialmente expressas quando os níveis de expressão eram $_{log2}$ <1,0 e com valor de *P* <0,05 de significância. A análise de genes ontólogos foi realizada no software *PANTHER Classification System* (MI et al. 2013).

4.7. QUANTIFICAÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO

Para avaliar a produção de polihidroxibutirato (PHB) em *A. brasilense* FP2 associado as raízes de arroz, as plantas foram inoculadas com *A. brasilense* FP2 selvagem e uma estirpe de *A. brasilense* (*ΔPhaC1*) deficiente em produzir PHB. Dessa maneira, a produção de PHB foi estimada por citometria de fluxo antes da inoculação (Bactéria em meio liquido), 3 e 7 dias após a inoculação. As raízes das plantas foram separadas das partes aérea e colocadas em um microtubo de 1,5 mL. Foi adicionado 1mL de tampão TBAC contendo 50% etanol. Os microtubos foram agitados em *vortex* por 1 minuto e o sobrenadante transferido para um novo microtubo, no qual foi adicionado 31,25µM de *Nile Red* (Sigma-Aldrich) e incubado por 1 minuto protegido da luz. Após esse período, os

microtubos foram centrifugados a 13,400 *x g* por 1 minuto e o *pellet* de células ressuspensos em 1mL de tampão TBAC. Após essa etapa, as amostras foram imediatamente analisadas em citometro de fluxo BD Accuri™ C5. A produção de PHB foi calculada a partir dos valores fluorescência do *NileRed* usando o canal FL2-H (ALVES et. al. 2016 submetido).

4.8. QUANTIFICAÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) de *A. brasilense* associados as raízes de arroz foram analisadas por citometria de fluxo usando uma sonda fluorescente, 2′,7′-Diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA; Sigma–Aldrich). Após entrada na célula, a DCFH-DA é clivada por esterases intracelulares em um derivado não fluorescente, tornando-se menos hidrofóbica e consequentemente aprisionada no interior da célula. Na presença de ERO, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esse composto é oxidado a um composto altamente fluorescente, 2',7'-dichlorofluorescina (DCF). A intensidade de fluorescência da DCF é então usada para monitorar os níveis de ERO intracelular (BASS et al.1983).

Os níveis de ERO foram monitorados na bactéria em meio de cultura liquido antes da inoculação na planta e 3 e 7 dias após a inoculação. As plantas foram retiradas dos tubos de vidro e as raízes separadas das partes aéreas. As raízes foram colocadas em um microtubo de 1,5mL e então adicionado 1 mL de tampão TBAC. Após 1 minuto de *vortex*, a suspensão de células foi recuperada em um novo microtubo e centrifugadas a 13,400 *x g* por 1 minuto. O *pellet* de células foi ressuspendido em 0.5 mL de tampão TBAC e incubado com 50µM de DCFH-DA durante 30 minutos no escuro. Após esse período de incubação com a sonda as amostras foram imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Os níveis relativos de ERO foram calculadas a partir dos valores da mediana de fluorescência usando canal FL1-H.

4.9. MEDIDA DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase do *A. brasilense* FP2 associado a raízes de arroz foi avaliada 3 e 7 dias após a inoculação através da redução de acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4) em cromatografia gasosa (Varian Star 3400 CX equipado

com uma coluna Porapak N e detector FID). Os tubos de vidro contendo as plantas não inoculadas e inoculadas com *A. brasilense* FP2 foram tampados com SubaSeal® e 5mL de acetileno foi injetado nos tubos. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 60 minutos e 0,5mL da fase gasosa de cada tubo foi injetado no equipamento. A produção de etileno pela nitrogenase foi avaliada e os valores da atividade foram apresentados em nmol/g de raiz seca.

4.10. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ, SÍNTESE DE cDNA E RT-qPCR

A análise do perfil proteico das raízes de plântulas de arroz inoculado e não inoculados com *A. brasilense* FP2 revelou as proteínas diferencialmente expressas. Para confirmar a expressão diferencial, o RNAm de alguns genes selecionados (Tabela 1) tiveram a sua transcrição quantificada por RT-qPCR. As raízes do arroz cv. Nipponbare foram imersas em solução para proteger o RNA de degradação por 24 horas e posteriormente armazenadas em congelador a -80°C. Após a extração de RNA total, através do reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific), o RNA foi tratado com DNase I (Ambion) para remoção de possível contaminação com DNA genômico. Posteriormente, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1µg de RNA total utilizando o kit *high-capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems – Life Technologies). Todas as etapas foram realizadas conforme orientação do fabricante.

As amostras de cDNA foram diluídas 1/60 em água comercial livre de RNAse/DNAse e armazenadas em congelador a -20°C. A amplificação do cDNA se deu através do kit *Power SYBR-Green PCR Master Mix* no equipamento *Step One Plus Real Time-PCR System* (Life Technologies). Três genes com expressão constitutiva (actina 1, β-tubulina e um gene hipotético) foram utilizados como normalizador interno para calcular a expressão relativa dos genes alvos (Tabela 1). O programa GeNorm foi utilizado para calcular o fator de normalização dos genes constitutivos (VANDESOMPELE et al., 2002 e 2009)

Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) foram desenhados no programa *Primer blast* (YE et al., 2012) e tiveram sua eficiência calculada através de uma curva de eficiência. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método descrito por Pfaffl (2001).

TABELA 1- OLIGONUCLEOTÍDEOS INCIADORES (*PRIMERS*) PARA QUANTIFICAÇÃO POR RT-qPCR, GENES SELECIONADOS PARA A VALIDAÇÃO DO PROTEOMA, GENES ALVOS PARA AS VIAS DA METIONINA E ESPERMIDINA E NORMALIZADORES PREVIAMENTE SELECIONADOS EM OUTROS TRABALHOS.

Descrição do gene (RAP-DB)	***Código RAP-DB***	***Abreviação***	***Sequencia***	***[nM] de cada primer***	***Eficiência (E) (Thresould 0.2)***	***R^2***	***Referência***
Genes selecionados para validação do proteoma							
RNA polymerase subunit, RPB6	Os07g0463100	Rpb6	F- 5'TAT GGT CGA GCT TGA AGG GG3' R- 5'TCC CCA GTC CTC ATA GCT TCC3'	100	2.049	0.9962	Esse trabalho
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III	Os03g0586600	NRPB6A	F- 5'GGC GAA ACC CTA GCG ATT GTA3' R- 5'TCA GCC CCT TCC TCA ATC TCA3'	200	1.846	0.9999	Esse trabalho
Centrin.	Os10g0389000	Cen1	F- 5'CAG GGA GAT GAT CGA AGC CG3' R- 5'AAC TTA ACC CGG CCC CAA AT3'	200	1.928	0.9948	Esse trabalho
Cytochrome b5 domain	Os10g0502500	CML8	F- 5'GAC GTC TCC CAG AGC AGA TTG3' R- 5'GCT CAA AGG ACA TCT TCG CC3'	100	1.969	0.9932	Esse trabalho
Similar to CROC-1-like	Os04g0684800	CROC-1-Like	F- 5'GCT CAA CAC CTA CGG ATT TAGG3' R- 5'GAG GCT GCT GAA CTT GGT TG3'	200	1,911	0.9915	Esse trabalho
Heat stress transcription factor A-1	Os03g0854500	HSFA1	F- 5'GAA GCA TAT CAA TCG GCG GC3' R- 5'CCT CGT GCA CAG AGT TGA GT3'	200	2.039	0.9413	Esse trabalho
1 Similar to Thioredoxin 1	Os04g0530600	TRX ms2	F- 5'AGG GCC AGG ACA CAT CCA TC3' R- 5'GCC CAG TAT CCA ACA AGG ACA3'	100	1.995	0.9917	Esse trabalho
Similar to DAG	Os09g0132600	sDAG-1	F- 5'CTC GCC CAG ATC GTT GGA AG3' R- 5'CGG ACC TTG GGC AAC TCT TTG3'	100	1.888	0.9912	Esse trabalho
NAD(P)-binding domain	Os02g0678400	Nnd-1	F- 5'GGT TCA AGG AGG AGG ACA CG3' R- 5'TGC GAG GAT TGG ATA GAT CGG3'	200	1.859	0,9916	Esse trabalho
Similar to Eukaryotic initiation factor 4A	Os02g0146600	EIF4A2	F- 5'ATC GAA TCG AGT CCG AGA CG3' R- 5'TTC CTG CCA TGG CTG AAG AG3'	400	1.869	0.9951	Esse trabalho
Nucleosporin 1-like	Os01g0856600	Nsp1-like	F- 5'GAG GCT GCT TCT GCA AGA GA3' R- 5'ACT CAG CAC CCT GAG TAG CA3'	800	1.898	0.9081	Esse trabalho
Beta-lactamase-like	Os01g0133500	Bla-like	F- 5'CTG CAG TAG CTG GGG GAG AA3' R- 5'TTC CTT GCC CTA CAC AGT GA3'	200	1.983	0.9943	Esse trabalho
IQ calmodulin-binding	Os02g0105500	Chib3H	F- 5'ATG GAG TGA GGT GTT TGC GG3' R- 5'GAG CCT CCT GGA GCC AAT AC3'	100	2.081	0.9746	Esse trabalho
Peptidase M3A and M3B	Os01g0902200	M3A/M3B	F- 5'CGC CAT CAA CAA GGC GTT TG3' R- 5'TAG GTG AGC CCG GTA GTT CA3'	200	1.869	0.9994	Esse trabalho

Genes normalizadores						
Actin 1	Os03t718100-01	Act	F 5'CAGCCACACTGTCCCCATCTA3'	200	1.892	ALBERTON et. al., 2013
			R 5'AGCAAGGTCGAGACGAAGGA3'			
Tubulin beta-2 chain (Beta-2 tubulin).	Os01t0805900-01	Tub	F 5'GCTGACCACACCTAGCTTTGG3'	200	1.895	ALBERTON et. al., 2013
			R 5'AGGGAACCTTAGGCAGCATGT3'			
Conserved hypothetical protein	Os06t0702800-01	Hypot	F 5'ATGGACTGAAAAGGCTGAGTTGA3'	200	1.882	ALBERTON et. al., 2013
			R 5'GCACCCTGATTGGTGGACTT3'			
			R 5'CTAGTTGGCCTTGGATCCAATGAC3'			

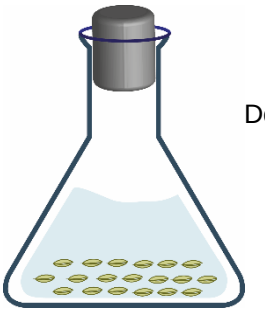
FONTE: O AUTOR (2016), ALBERTON et. al. (2013).

NOTA: R^2 CORRESPONDE AO COEFICIENTE DA CURVA OBTIDA UTILIZANDO OS VALORES DE CT (*THRESHOLD CYCLE*) DAS AMOSTRAS DE cDNA DILUÍDAS. A EFICIÊNCIA (E) FOI DETERMINADA ATRAVÉS DA SEGUINTE FÓRMULA, $E=10^{(-1/\text{COEFICIENTE ANGULAR})}$, ONDE A EFICIÊNCIA COM O VALOR DE 2 CORRESPONDE A 100%.

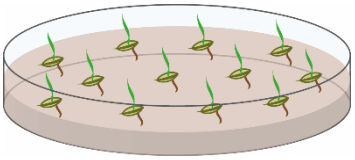
.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.1. FLUXOGRAMA DO CULTIVO DE ARROZ INOCULADO COM *A. brasilense* FP2

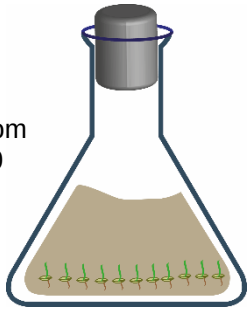


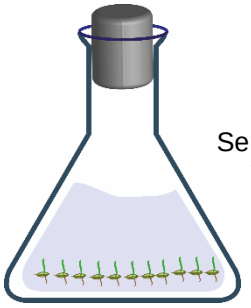
Desinfestação superficial das sementes de arroz
1 min - Álcool 70%
30 min - NaClO 6%
+ Triton X-100 0,1%
ON - Vitavax 0,025%



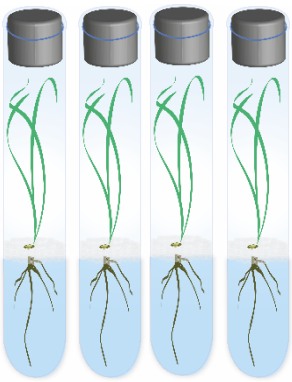
Germinação das sementes
Durante 3 dias
Agar-água 0,7%
No escuro, 30°C

Inoculação das sementes com
A. brasilense D.O.600 1,0
NFbHP-lactato 20mM NH_4Cl
Inoculação 30 minutos



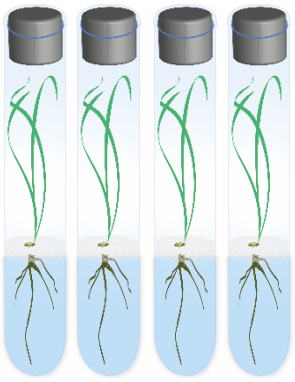


Sementes não inoculadas
Tratamento controle



3 e 7 dias a 28°C/25°C
Ciclo claro/escuro – 14/10h
60-70% umidade
Meio Hoagland s/ C e N

85% das plântulas foram destinadas para extração de proteínas e 15% para RNA



Foram realizados quatro experimentos independentes Contendo em média 100 tubos com sementes inoculadas com *A. brasilense* FP2 e 100 tubos com sementes não inoculadas

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. COLONIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA RAIZ DO ARROZ POR *A. brasilense* FP2

Nos experimentos de inoculação de plantas de arroz cv. Nipponbare com *A. brasilense* FP2, o sucesso da colonização e a estabilidade da população rizosférica da bactéria foi monitorada através da determinação do número de células de *A. brasilense* FP2 nas raízes por citometria de fluxo (VALDAMERI et al. 2015). A quantificação foi realizada em dois tempos diferentes, 3 e 7 dias após a inoculação (DAI) e o número de células foi normalizado pelo peso seco das raízes (Figura 3). O total de células de *A. brasilense* FP2 colonizando a superfície da raiz foi ~10^8 células por grama de raiz em ambos os dias testados, 3 e 7 dias após inoculação, sugerindo que a população de bactérias estava estabelecida aos 3 DAI e se manteve estável até, pelo menos, 7DAI. Foi verificado que a população de *A. brasilense* FP2 em arroz cv. Nipponbare pode se manter estável com esse número de células 20 DAI (VALDAMERI et al., 2015). A técnica de contagem de células por citometria de fluxo não discrimina entre células viáveis ou não. O número de células de *A. brasilense* FP2 por grama de raiz de arroz na ordem de grandeza de ~10^8, determinado por citometria de fluxo, pode corresponder a um valor de ~10^7 quando determinado pelo método clássico de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas. Isso pode ser explicado pela diferença entre os dois métodos, onde apenas bactérias viáveis são enumeradas em placas (VALDAMERI et. al., 2015). Em trigo, foi verificado que *A. brasilense* FP2 apresenta uma população relativamente estável, de 2 até 6 DAI, com ~10^7 UFC por grama de raiz, determinado pela técnica de contagem em placa (CAMILIOS-NETO et. al., 2014). Utilizando PCR quantitativo com iniciadores estirpe-específicos para *A. brasilense* FP2 e contagem em placa, foi verificado uma população estável da bactéria inoculada, entre ~10^7 e 10^8 células por grama de raiz em trigo, a partir dos 3 DAI e se mantendo estável até os 13 DAI, tanto em condições experimentais estéreis quanto não estéreis (STETS et al., 2015). Estes resultados mostram, através do monitoramento da população de *A. brasilense* FP2, utilizando diferentes técnicas e associada a diferentes plantas, que a bactéria é capaz de colonizar eficientemente as raízes das plantas associadas e

se manter com uma população estável, possivelmente por longos períodos, características altamente desejáveis para a aplicação biotecnológica de PGPB.

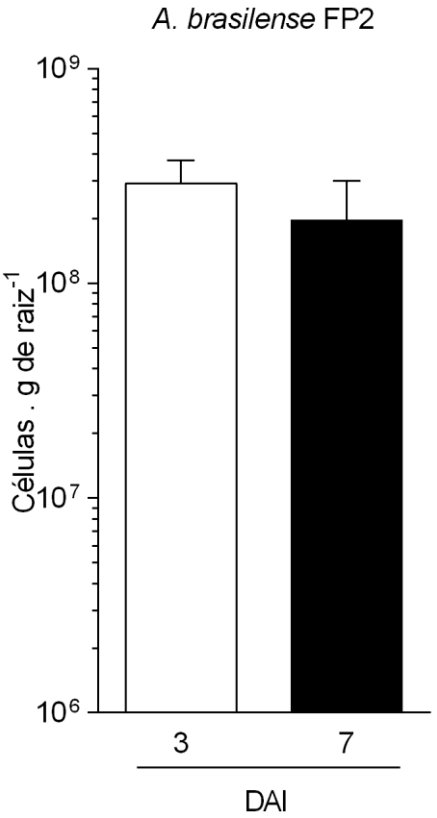


FIGURA 3 – CONTAGEM DE *A. brasilense FP2* POR CITOMETRIA DE FLUXO EM RAÍZES DE ARROZ CV. NIPPONBARE 3 e 7 DAI, OS VALORES CORRESPONDEM A MÉDIA DO PESO SECO DA RAIZ E AS BARRAS INDICAM ± ERRO DE UM EXPERIMENTO EM TRIPLICATA.
FONTE: O AUTOR (2016)
NOTA: DAI – DIAS APÓS A INOCULAÇÃO.

Além da obtenção do número de células, os resultados obtidos por citometria de fluxo possibilitam a extração de outras duas informações importantes, referentes ao tamanho e a complexidade celular. Na técnica de citometria de fluxo, um raio laser passa através de uma câmara até um fóton detector, que converte o sinal luminoso em sinal elétrico. Se uma célula passa pelo laser, a luz será espalhada em todas as direções, podendo também atingir o detector (FSC-H, do inglês, *Forward Light Scatter*) ou tomar uma direção ortogonal ao detector (SSC-H, do inglês, *Side Light Scatter*). Em ambos os casos, alterações nos padrões de espalhamento do laser são proporcionais a variações no tamanho e/ou complexidade celular (ex., deposição de grânulos). Como pode ser observado nos gráficos densidade de FSC-H por SSC-H (FIGURA 4), a população de células 7 DAI está deslocada para direita e para

cima, quando comparado com a população de células 3 DAI. Esse deslocamento no eixo FSC-H indica aumento no tamanho das células da população bacteriana, enquanto o deslocamento da observado no eixo SSC-H indica um aumento na complexidade celular, muitas vezes também chamada de granulosidade. A partir destes resultados, foi levantada a hipótese de que o aumento na granulosidade celular poderia estar relacionado com o acumulo de grânulos de polihidroxialcanoatos (PHA). Camilios-Neto et al. (2014) observaram, por microscopia eletrônica de transmissão, um acumulo de PHAs em *A. brasilense* FP2 durante a colonização em raízes de trigo (*Triticum aestivum*). PHAs são importantes em períodos de estresse ambiental ou baixa disponibilidade de carbono e em *A. brasilense* é reportado o acumulo desses materiais para auxiliar durante quimiotaxia, motilidade e proliferação celular (KADOURI et al. 2003).

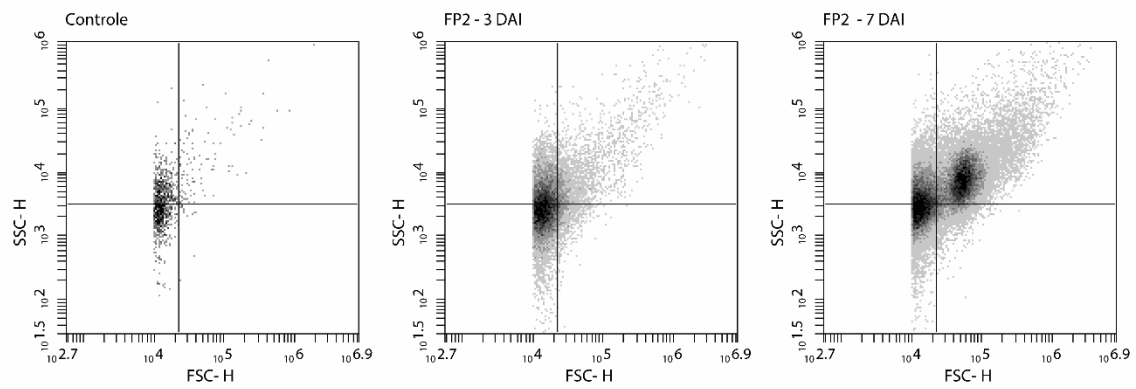


FIGURA 4 - GRÁFICO DE DENSIDADE DE FSC-H POR SSC-H DAS CÉLULAS DE *A. brasilense* FP2 ASSOCIADAS A RIZOSFERA DE ARROZ CV. NIPPONBARE O DESLOCAMENTO OBSERVADO PARA OS GRÁFICOS DE 3 E 7 DAI DEMONSTRAM UM AUMENTO NO TAMANHO E GRANULOSIDADE DAS CÉLULAS.
FONTE: O AUTOR (2016)
NOTA: DAI – DIAS APÓS A INOCULAÇÃO; SSC - *SIDE-SCATTERED LIGHT;* FSC - *FORWARD-SCATTERED LIGHT.*

6.2. ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ INOCULADAS E NÃO INOCULADAS COM *A. brasilense* FP2 POR LC-MS/MS

As alterações nos perfis de proteínas expressas da planta e da bactéria durante a associação entre arroz cv. Nipponbare e a PGPB *A. brasilense* FP2 foi estudada utilizando uma abordagem proteômica a partir das raízes de arroz após 7 DAI, comparado com raízes de plantas de arroz não inoculadas (controles). As análises proteômicas foram realizadas por LC-MS/MS a partir de quatro

replicatas experimentais independentes. Os peptídeos identificados foram mapeados com dois bancos de dados de referência: i) *Oryza sativa* ssp. japonica cv. Nipponbare - *Rice Annotation Project* (RAP) e ii) *A. brasilense* Sp245. Durante as análises foi possível identificar um total de 6.158 proteínas, sendo 5.157 (83,74%) proteínas do arroz e 1.001 (16,26%) proteínas de *A. brasilense.* Um total de 171 proteínas (2,8% do total de proteínas identificadas) do arroz foram identificadas como diferencialmente expressas para as plantas inoculadas em relação ao controle não inoculado, com valores de $P<0,05$ e com valores de expressão $_{log2} \geq 1,0$. Dentre o total de proteínas diferencialmente expressas, 137 proteínas (80,11%) estavam com valores de expressão aumentados e 34 proteínas (19,88%) com os valores de expressão diminuídos na condição inoculada (FIGURA 5).

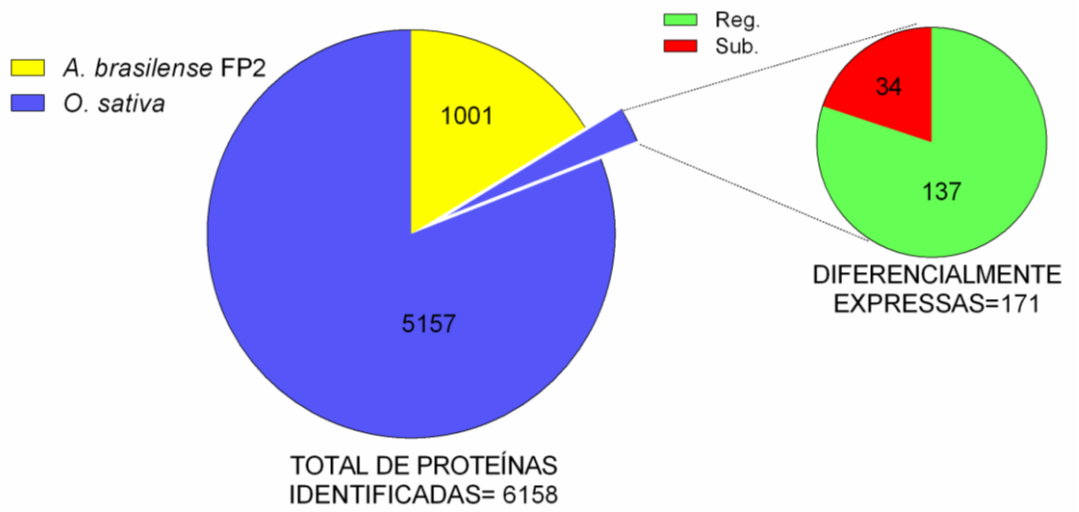


FIGURA 5 – TOTAL DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR LC-MS/MS E PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM RAIZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ INOCULADOS E NÃO INOCULADOS COM *A. brasilense* FP2. OS VALORES CORRESPONDEM A QUATRO REPLICATAS BIOLÓGICAS EM TRIPLICATAS TÉCNICA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS DUAS CONDIÇÕES. PROTEÍNAS DO ARROZ DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS SÃO DESTACADAS NO GRÁFICO MENOR E CORRESPONDEM A PROTEÍNAS COM VALOR DE EXPRESSÃO $_{LOG2}$≥1,0 E VALOR DE P<0,05.
FONTE: O AUTOR (2016)
NOTA: REG.: PROTEÍNAS DO ARROZ COM EXPRESSÃO AUMENTADA EM RELAÇÃO AO CONTROLE, SUB.: PROTEÍNAS DO ARROZ COM EXPRESSÃO DIMINUÍDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE.

A distribuição dos valores de expressão das proteínas identificadas do arroz e suas significâncias estatísticas são apresentados em um gráfico de dispersão do tipo *volcano plot,* que evidencia as proteínas com expressão aumentada em verde e proteínas com expressão diminuída em vermelho em relação ao controle não inoculado com *A. brasilense* FP2 (FIGURA 6). Para as proteínas identificadas do *A. brasilense* FP2, não foi possível determinar o subconjunto de proteínas diferencialmente expressas, devido a falta de um

controle onde a bactéria crescesse na ausência da planta. Entretanto, as proteínas identificadas na análise representam proteínas potenciais da bactéria, importantes durante o processo de colonização, podendo ser usadas como possíveis alvos de estudos mais detalhados.

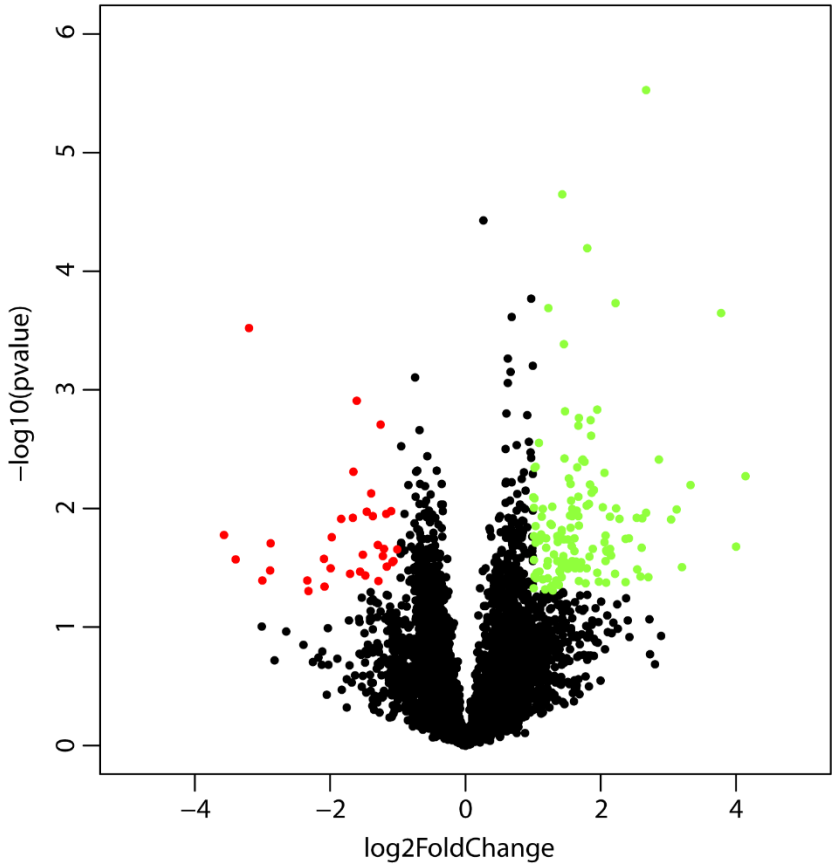


FIGURA 6 – VOLCANO PLOT DEMONSTRA A DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES DE EXPRESSÃO (LOG_2) E SUAS SIGNIFICANCIAS ESTÁTISTICAS APRESENTADAS EM [-LOG10(VALOR DE P)] PARA PROTEÍNAS IDENTIFICADAS DO ARROZ CV. NIPPONBARE NA ASSOCIAÇÃO COM A PGPB *A. brasilense* FP2. VALOR DE EXPRESSÃO $LOG_2 \geq 1,0$ E VALOR DE $P<0,05$ SÃO CONSIDERADOS DIFERENCIALMETE EXPRESSOS.
FONTE: O AUTOR (2016)
NOTA: (●) PROTEÍNAS DO ARROZ COM EXPRESSÃO AUMENTADA EM RELAÇÃO AO CONTROLE, (●) PROTEÍNAS DO ARROZ COM EXPRESSÃO DIMINUÍDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE.

Obter uma compreensão holística sobre um grande conjunto de dados, pode ser uma difícil tarefa. Dessa maneira, para facilitar o entendimento e contextualizar funcionalmente as proteínas identificadas durante a interação do arroz com *A. brasilense* FP2, as proteínas foram analisadas e classificadas de acordo com grupos funcionais no software *PANTHER Classification System* (MI et al. 2013). O software *PANTHER* foi desenvolvido para ser uma plataforma padronizada para anotação funcional de genes com vocabulários estruturados e controlados, em uma escala de genoma (MI; MURUGANUJAN; THOMAS, 2013).

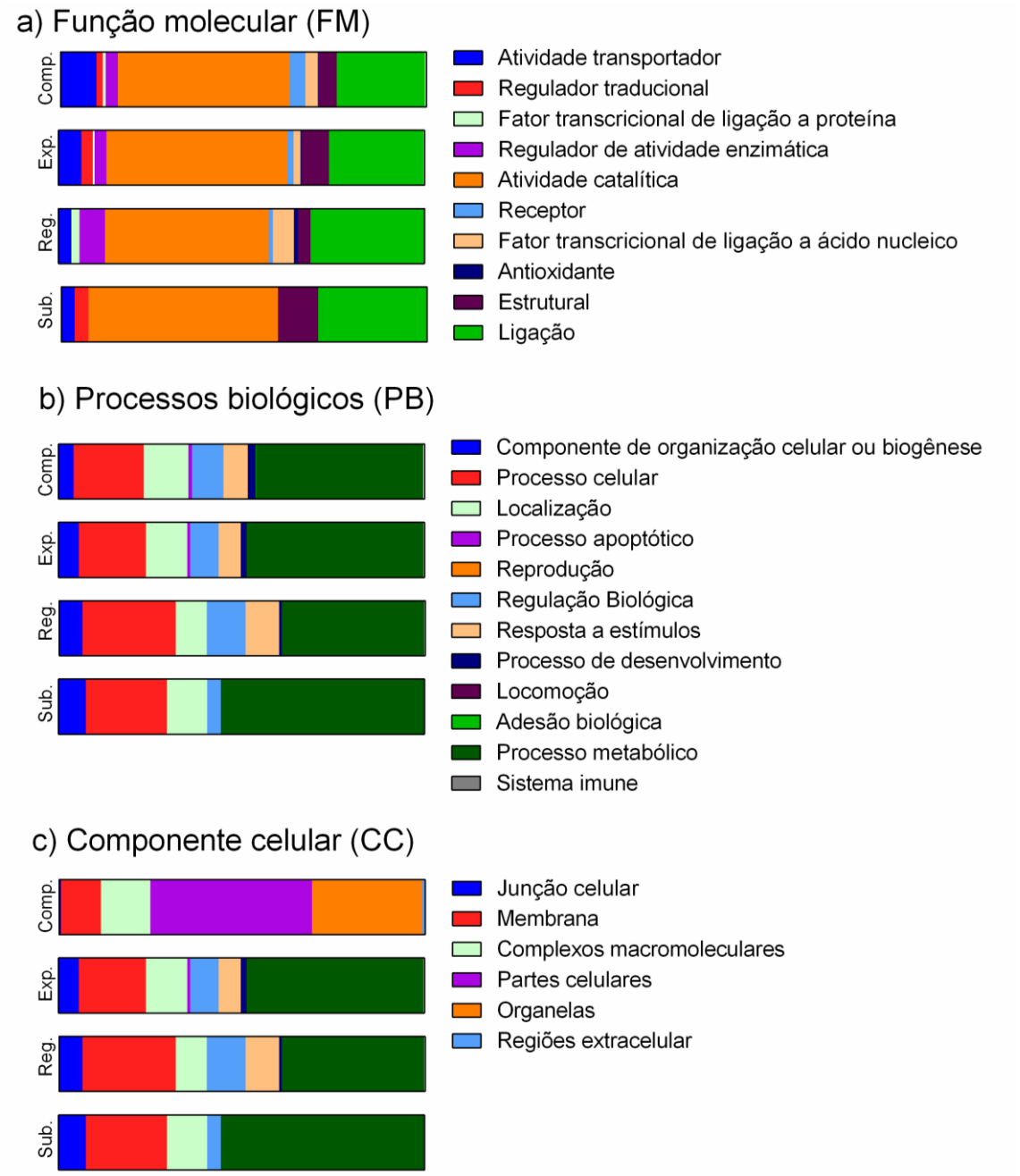


FIGURA 7 – CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A ONTOLOGIA DE GENES EXPRESSOS EM RAÍZES DE ARROZ INOCULADAS COM *A. brasilense* FP2. OS GENES FORAM IDENTIFICADOS NO GENOMA DE ARROZ A PARTIR DOS DADOS PROTEÔMICOS. A CLASSIFICAÇÃO FOI REALIZADA UTILIZANDO O SOFTWARE *PANTHER* EM TRÊS CATEGORIAS (A) FUNÇÃO MOLECULAR (FM), (B) PROCESSOS BIOLÓGICOS (PB) E (C) COMPONENTE CELULAR (CC).
FONTE: O AUTOR (2016)
NOTA: **COMP**.: TODAS AS PROTEÍNAS ANOTADAS DO ARROZ CV. NIPPONBARE NO BANCO DE DADOS DO *PANTHER* **EXP**.: PROTEÍNAS EXPRESSAS (INCLUI PROTEÍNAS COM O MESMO NÍVEL DE EXPRESSÃO, EXPRESSÃO AUMENTADA E EXPRESSÃO DIMINUÍDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE), **REG**. PROTEÍNAS COM A EXPRESSÃO AUMENTADA EM RELAÇÃO AO CONTROLE; **SUB**.: PROTEÍNAS COM EXPRESSÃO DIMINUÍDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE.

As proteínas foram classificadas em três categorias de ontologias para os genes: função molecular (FM), processos biológicos (PB) e componente

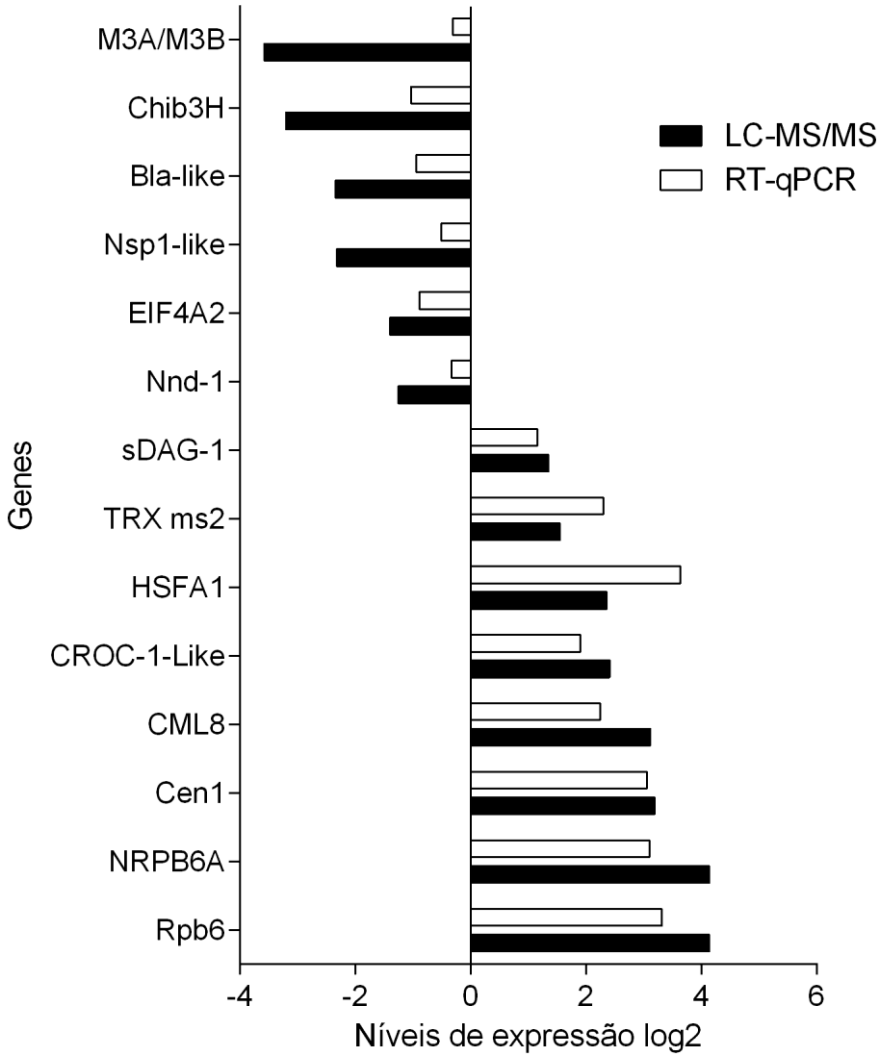
celular (CC) (FIGURA 7). Para determinar quais subcategorias estão com genes diferencialmente expressos com uma maior representação comparado a mesma subcategoria dos genes expressos, foi calculada a razão da porcentagem do número de genes na mesma categoria entre os genes expressos e os diferencialmente expressos, sendo considerado com uma maior representação aquelas subcategorias em que a porcentagem fossem >150%. As subcategorias com maior representação nos genes diferencialmente expressos são: (FIGURA 6-a) função molecular (i) fator transcricional de ligação a proteína (364%); (ii) fator transcricional de ligação a ácidos nucleicos (190%), (iii) atividade antioxidante (161%); (FIGURA 7-b) processo biológico (i) Processo celular (160%), (ii) Componente de organização celular ou biogênese (150%) (FIGURA 6-c) componente celular (i) organelas (183%).

6.3. VALIDAÇÃO DE ANÁLISE PROTEÔMICA POR RT-qPCR

Durante o cultivo do arroz para análise proteômica uma parcela das plantas foi reservada, imergidas em RNA *later* por 24 horas e armazenadas em congelador -80°C para a extração do RNA. O RNA preparado foi utilizado para confirmar os níveis de expressão de 14 genes identificados como diferencialmente expressos na análise proteômica por PCR quantitativo em tempo real. Os genes selecionados compreendem genes regulados positivamente e negativamente em relação ao controle (TABELA 1). Foram selecionados dois genes em cada faixa de expressão, por exemplo, dois em $_{log2}$~4,0 até $_{log2}$~-3, abrangendo toda a distribuição de expressão diferencial. As expressões desses genes foram normalizadas por 3 genes com a expressão constitutiva, usados como controle interno (TABELA 1). Os resultados foram obtidos a partir de uma quadruplicata biológica, executadas em triplicata técnica.

Como pode ser observado na figura 8 os valores para expressão a partir de RNAm mostraram uma tendência similar de expressão quando comparados com a expressão obtida a nível proteico. Entretanto, alguns valores de transcrição apresentavam valores diferentes dos obtidos na análise proteômica, por exemplo o gene M3A/M3B (FIGURA 8), que apresentou uma expressão proteica $_{log2}$= -3,57 e um valor de transcrição por RT-qPCR $_{log2}$=-0,3. A tradução de RNAm de genes individuais para as proteínas codificadas pode estar sendo regulada, produzindo discrepâncias entre o RNAm e os níveis de proteína. Essa

discrepância é relatada em alguns trabalhos que usam RT-qPCR para validar dados de proteômica, onde até 40% dos transcritos podem variar em relação a expressão proteica (YAN et al., 2006; CHEN, 2002; ; FEETHAM et al., 2004; MACKAY et al., 2004).



.

FIGURA 8 – COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO EM NÍVEL TRADUCIONAL (LC-MS/MS) E EM NÍVEL TRANSCRICIONAL (RT-qPCR) DE 14 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DURANTE A ASSOCIAÇÃO ENTRE PLANTAS DE ARROZ CV. NIPPONBARE E *A. brasilense* FP2. OS VALORES REPRESENTAM UMA MÉDIA DE QUATRO REPLICATAS BIOLÓGICAS ANÁLISADOS EM TRIPLICATAS TÉCNICAS. OS NÍVEIS DE RNAm FORAM NORMALIZADOS COM TRÊS GENES COM EXPRESSÃO CONSTITUTIVA (ACTINA 1, BETA-2-TUBULINA, CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN).
FONTE: O AUTOR (2016).

Apesar de os valores de alguns dos genes utilizados para a validação da análise proteômica apresentarem discrepância entre a expressão em nível de transcrição e expressão proteica, uma boa correlação entre as duas técnicas pode ser observada quando os 14 genes são analisados em conjunto utilizando

uma análise de regressão linear, onde é possível explorar e inferir a correlação existente entre duas variáveis independentes. Para os 14 genes analisados, verifica-se uma boa correlação entre as duas técnicas com R^2= 0,879 e valor de *p*<0,0001, indicando que 87,9% da correlação é explicada pelas variáveis do modelo (FIGURA 9). Dessa maneira, escolher genes que abranjam todos os níveis de expressão da análise proteômica pode ser uma boa estratégia para correlacionar duas técnicas em níveis de expressão diferentes (MURPHY et al., 2010). Apesar de existirem dificuldades em correlacionar os níveis de expressão da análise proteômica com RT-qPCR, a técnica é fiável e tem sido amplamente utilizada nos estudos de expressão gênica, uma vez que tem uma ampla faixa dinâmica de quantificação, alta sensibilidade e alta precisão (BUSTIN, 2000). Essa leve discrepância entre os valores obtidos na análise proteômica e em nível transcricional não é surpreendente, uma vez que os dois níveis de expressão nem sempre refletem um ao outro, devido, entre muitas possibilidades, modificações pós-traducionais, ou expressão com *splicing* alternativo (MURPHY et al., 2010 ; PRADET-BALADE et al., 2001).

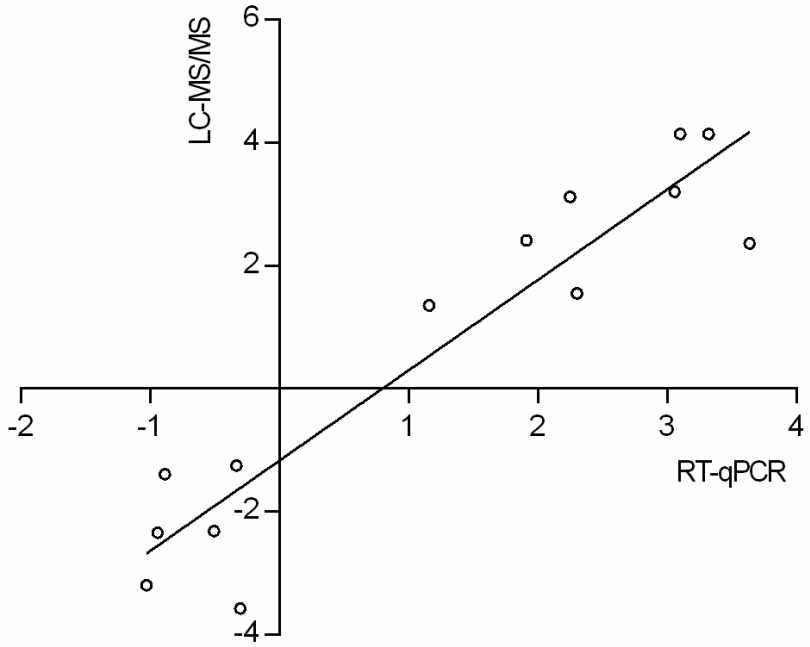


FIGURA 9 – CORRELAÇÃO, OBTIDA POR REGRESSÃO LINEAR, PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE RAÍZES DE ARROZ INOCULADO COM *A. brasilense* FP2 POR TÉCNICAS DE ANÁLISE PROTEÔMICA E POR RT-qPCR. A ANÁLISE DE CORRELAÇÃO FOI REALIZADA POR REGRESSÃO LINEAR PARA 14 GENES DE ARROZ IDENTIFICADOS COMO SENDO DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NAS DUAS TÉCNICAS. R^2= 0,879. P <0,0001. EQUAÇÃO DA RETA Y = 1,469*X - 1,171.
FONTE: O AUTOR (2016)

6.4. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS RAIZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ REPRIMIDAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE NÃO INOCULADO COM *A. brasilense* FP2

Foram consideradas como proteínas com expressão reprimida nas raízes de plântulas de arroz inoculado com *A brasilense* FP2 em relação ao controle não inoculado com *A brasilense* FP2, proteínas com valor $_{log2}$ -1,0 e valor de *P*<0,05, 34 proteínas foram identificadas (TABELA 2).

Entre as proteínas reprimidas foram identificadas quatro β-glucosidase pertencente à família GH5. Nessa família estão presente enzimas que modificam a parede celular (CANTAREL et al., 2009) (Os10g0370500, Os05g0346500, Os05g0247800, Os05g0248200), são frequentemente encontradas induzidos em plantas sob estresse salino, hídrico, ácido abscísico e ácido jasmônico, possivelmente GH5 mediam o remodelamento da parede celular, respondendo a estresses ambientais. (WANG et al., 2009) A supressão da expressão de uma β-glucosidase pertencente à família GH5 em frutos de tomate (*Solanum lycopersicon*) em estágio de maturação aumenta a firmeza do fruto, sugerindo um papel no amolecimento da fruta (OPASSIRI et al., 2007). A repressão desses genes na interação *Azospirillum*-arroz, podem indicar um aumento na firmeza da raiz e reduzir a permeabilidade da membrana, podendo reduzir os danos causados por estresses biótico e abióticos. *Azospirillum* pode estimular o crescimento de plantas mesmo sob estresses severos como seca (CREUS et al., 1996), salinidade (JOFRÉ et al.,1998; RAMADOSS et al., 2013), metais pesados (BELIMOV; DIETZ, 2000) e ácidos húmicos (BACILIO et al., 2003)

Foram identificadas duas peroxidases com a expressão reprimida em relação ao controle (Os11g0661400 e Os06g0695300), essas proteínas estão relacionadas a quantidade de ferro no interior das raízes, elas são encontradas induzidas quando há um excesso de ferro e repimidas quando há deficiência de ferro, sob condição de excesso de ferro os níveis de espécies reativas de oxigênios (ERO) aumentam (BASHIR et al., 2014).

TABELA 2 GENES DO ARROZ COM A EXPRESSÃO REPRIMIDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE NÃO INOCULADO

ID (RAP-DB)	FC ($_{Log2}$)	P value	Pep	Descrição RAP-DB
Os04g0620066	-1,011062	0,022067	5	Similar to MRP-like ABC transporter
Os10g0370500	-1,0685148	0,027841	9	Glycoside hydrolase, catalytic core domain containing protein/Cellulase containing protein
Os12g0534100	-1,080982	0,028371	1	Conserved hypothetical protein.
Os11g0661400	-1,0991363	0,010561	2	ATPase, AAA-type, core domain containing protein.

Os03g0368300	-1,1643723	0,030904	8	Similar to Peroxidase 1
Os01g0788400	-1,1689666	0,011081	3	Similar to Pectinesterase (EC 3.1.1.11)
Os12g0554800	-1,2024682	0,021959	1	Similar to Polygalacturonase-like protein.
Os12g0554800	-1,2187822	0,025198	9	Similar to DEAD box RNA helicase1.
Os02g0678400	-1,2529183	0,001975	7	NAD(P)-binding domain containing protein.
Os04g0404800	-1,2847258	0,040899	7	Similar to H0502B11.5 protein.
Os10g0163340	-1,2933528	0,020275	15	Similar to Cytosolic aldolase.
Os06g0695300	-1,3691991	0,011679	7	Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial family protein.
Os02g0146600	-1,3946816	0,007445	26	Similar to Eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) (eIF-4A).
Os02g0589400	-1,4623626	0,010682	4	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.
Os11g0276300	-1,4797097	0,036966	3	ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase
Os03g0186900	-1,5202007	0,024557	2	Radc1/ Eukaryotic aspartyl protease family protein, expressed.
Os01g0868600	-1,5574195	0,03404	2	Hypothetical conserved gene.
Os01g0810800	-1,6092051	0,001234	2	Hypothetical conserved gene.
Os12g0560700	-1,6531608	0,004905	4	Similar to PROLIFERA protein/DNA replication licensing factor MCM7/geneMCM7.
Os05g0451300	-1,665163	0,012043	3	Conserved hypothetical protein.
Os03g0323800	-1,7090357	0,035714	3	Similar to ISP42-like protein
Os01g0125800	-1,8354118	0,012304	4	Actin-interacting, WD40-repeat protein, Actin turnover
Os05g0565000	-1,9779624	0,017561	12	Similar to 60S ribosomal protein L18a-1.
Os02g0510200	-1,9926187	0,031853	2	Similar to Acetolactate synthase
Os05g0346500	-2,085739	0,045753	2	Glycoside hydrolase, family 85 domain containing protein.
Os12g0443500	-2,092157	0,02675	25	Similar to UDP-glucose 6-dehydrogenase
Os01g0856600	-2,3187324	0,049609	6	Nsp1-like, C-terminal family protein.
Os01g0133500	-2,3405109	0,040515	2	Similar to predicted protein
Os05g0247800	-2,8787198	0,019717	7	Glycoside hydrolase, family 18 protein.
Os05g0248200	-2,8869914	0,033331	6	Glycoside hydrolase, family 18 protein.
Os01g0140500	-2,9993656	0,040587	6	Similar to 60S ribosomal protein L26B.
Os02g0105500	-3,1969007	0,000302	4	IQ calmodulin-binding region domain containing protein.
Os11g0701800	-3,3991629	0,026881	10	Chitinase III OsChib3H-a)H-
Os01g0902200	-3,5728333	0,016718	2	Peptidase M3A and M3B, thimet/oligopeptidase F domain containing protein.

FONTE: O AUTOR (2016)

6.5. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS RAIZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ INDUZIDAS EM RELAÇÃO AO CONTROLE NÃO INOCULADO COM *A. brasilense* FP2

Foram consideradas como proteínas com expressão induzida nas raízes de plântulas de arroz inoculado com *A brasilense* FP2 em relação ao controle não inoculado com *A brasilense* FP2, proteínas com valor $_{log2}$>1,0 e valor de *P*<0,05, 137 proteínas foram identificadas (TABELA 3).

Entre as proteínas induzidas, foram identificadas sete proteínas relacionadas ao ciclo celular (Os04g0488000, Os08g0344100, Os10g0389000, Os05g0509400, Os05g0143400, Os01g0144600 e Os01g0256400).

A progressão do ciclo celular de plantas é regulada em diversos pontos, sendo a maioria desses pontos ativado por uma classe especial de proteínas serina-treonina quinase, são funcionalmente definidas como necessitando de uma ligação para ativar sua atividade com uma proteína reguladora conhecida como ciclina e portanto, sendo chamadas de cinases dependentes de ciclina (*cyclin-dependent quinases* – CDK) (DEWITTE e MURRAY, 2003). Dentre as proteínas induzidas encontrada, pertencentes ao ciclo celular, duas CDKs que regulam o ciclo celular em G2 foram identificadas, com expressão $_{log2}$ 1,61. Essa proteína induzida poderia regular a progressão do ciclo de G2 para M mais rapidamente aumentando a proliferação celular. O aumento de CDK em G2 aumenta a proliferação e tamanho celular em arroz (UMEDA et al., 1999), arabidopsis (VLIEGHE et al., 2004) e alfafa (MÉSZÁROS et al., 2000). Esse aumento na expressão de CDK-G2 pode ser manifestado em resposta hormonal como, citocininas, auxinas e ácido abscísico ou a respostas ambientais (MÉSZÁROS et al., 2000). Em trigo colonizado por *A. brasilense* FP2 diversos genes de controle ao ciclo celular foram identificados regulados e em uma análise em citometro de fluxo, foi demonstrado um aumento das células da raiz em fase S, indicando altos níveis de DNA em processo de replicação (CAMILIOS-NETO et al. (2014).

TABELA 3 GENES DO ARROZ COM A EXPRESSÃO INDUZIDA EM RELAÇÃO AO CONTROLE NÃO INOCULADO

Loc	FC ($_{Log2}$)	P value	Pep	Descrição RAP-DB
Os07g0463100	4,139687134	0,00537682	2	RNA polymerase subunit, RPB6
Os03g0586600	4,139687134	0,00537682	2	Similar to DNA-DIRECTED RNA POLYMERASES I, II, AND III, RPABC6
Os05g0489800	4,001827118	0,0209804	3	Centromeric histone 3
Os10g0512800	3,781084996	0,000224925	2	Similar to predicted protein.
Os02g0833400	3,325814751	0,00636798	5	Conserved hypothetical protein
Os10g0389000	3,199883779	0,0313716	2	Centrin.
Os10g0502500	3,12044319	0,0102021	3	Cytochrome b5 domain containing protein/Probable calcium-binding protein CML8.
Os02g0567000	3,042098838	0,012355	3	Conserved hypothetical protein.
Os06g0703800	2,858429434	0,00388886	4	Conserved hypothetical protein.
Os01g0885000	2,706607354	0,0379165	2	Similar to Cytochrome c
Os09g0473966	2,669245629	2,96E-06	2	Hypothetical conserved gene.
Os01g0256400	2,667322232	0,0108444	2	Similar to Dynein light chain 1 protein DLC-1
Os01g0326300	2,608975887	0,0121651	6	Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial family protein.
Os02g0235900	2,601056411	0,0214751	3	Oxygen oxidoreductase covalent FAD-binding site domain containing protein.
Os05g0486700	2,586044618	0,0375972	6	Oxygen oxidoreductase covalent FAD-binding site domain containing protein.

Os01g0263600	2,542534003	0,0326977	4	U5 snRNP-associated 102 kDa protein (U5-102 kDa protein).
Os01g0938200	2,533863771	0,01194	7	Similar to RNA-binding protein BRUNOL5
Os04g0684800	2,413892338	0,0179526	4	Similar to CROC-1-like protein
Os10g0490100	2,365518421	0,0418898	2	Virulence factor, pectin lyase fold family protein/Ripening-related protein 3
Os03g0854500	2,365438695	0,0180062	3	Heat stress transcription factor A-1/Similar to Heat shock transcription factor 31 (Fragment).Transcriptiona
Os05g0154900	2,27232505	0,0122875	3	Conserved hypothetical protein.
Os04g0692900	2,225688502	0,0100221	2	WIYLD domain domain containing protein.
Os05g0188600	2,221888216	0,00018511	1	Hypothetical conserved gene.
Os04g0509200	2,213427265	0,0355333	2	Similar to OSIGBa0157K09-H0214G12.1 protein.
Os03g0358100	2,157190344	0,0248407	3	Similar to Glutathione peroxidase.
Os08g0546100	2,140035908	0,024192	2	Similar to protein binding protein/ Putative BAG domain containing protein
Os03g0381200	2,136458191	0,0117638	1	Similar to Capping protein beta 3 subunit
Os05g0114600	2,135016474	0,0219395	2	Conserved hypothetical protein.
Os01g0641100	2,090080753	0,0231473	6	Similar to HD domain containing protein.
Os05g0568900	2,082696107	0,0226786	4	Similar to Protease Do-like 1, chloroplast precursor (EC 3.4.21.-).
Os02g0158600	2,07892904	0,0421076	2	Conserved hypothetical protein.
Os10g0496900	2,069856855	0,0277602	4	NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase, Chlorophyll synthesis
Os02g0702800	2,068365309	0,0169159	3	Similar to Syntaxin 22 (AtSYP22) (AtVAM3).
Os09g0407200	2,058642025	0,0193577	2	Similar to DNA repair protein RAD23.
Os05g0304400	2,054114237	0,00504041	20	Similar to GDP dissociation inhibitor protein OsGDI2.
Os01g0835600	2,031853997	0,00976142	2	AT hook, DNA-binding, conserved site domain
Os08g0522600	1,969388461	0,0414425	3	Similar to Chaperone protein dnaJ 10 (AtJ10) (AtDjC10).
Os05g0331200	1,9518819	0,0349042	2	Similar to External rotenone-insensitive NADPH dehydrogenase.
Os03g0124200	1,945417428	0,00146922	4	Similar to Pto-like protein quinase F
Os09g0567366	1,899372183	0,00700379	1	Similar to Aldo-keto reductase/ oxidoreductase.
Os04g0531900	1,881822437	0,0219382	3	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR domain containing protein.
Os10g0324900	1,866897014	0,00739809	3	chromo domain-containing protein LHP1/ Similar to Chromdomain-containing protein (Fragment).
Os03g0355400	1,860010657	0,00244257	3	WD40 repeat-like domain containing protein
Os03g0214900	1,847729489	0,0018071	2	Conserved hypothetical protein.
Os04g0610600	1,844075368	0,00630467	2	Similar to Cor14b protein precursor.
Os06g0213900	1,833202697	0,02555	2	Conserved hypothetical protein.
Os05g0143400	1,823954449	0,00915122	2	Similar to SLD5.
Os01g0706000	1,796857482	6,37E-05	2	Similar to RNA polymerase II transcriptional coactivator KELP
Os01g0767100	1,795565252	0,0320213	5	Similar to Lysosomal Pro-X carboxypeptidase.
Os04g0659500	1,790486024	0,00948081	6	Similar to OSIGBa0132E09-OSIGBa0108L24.16 Protein phosphatase 2C domain containing
Os01g0269000	1,771840041	0,0429641	2	Similar to Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase.
Os01g0600300	1,75917353	0,00406036	1	Conserved hypothetical protein.
Os05g0526800	1,733681053	0,00385895	2	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase family protein.
Os12g0565300	1,727997234	0,00391482	1	Similar to Calmodulin-binding protein MPCBP.
Os07g0456400	1,709550568	0,0283884	3	LUC7 related family protein
Os10g0441800	1,691010887	0,0318916	4	Similar to RAB5B.
Os01g0144600	1,679473831	0,0139221	2	Conserved hypothetical protein.

Os03g0199100	1,676304711	0,00172077	2	Protein of unknown function DUF677 family protein.
Os04g0611267	1,673112338	0,0409909	1	Similar to OSIGBa0152L12.11 protein.
Os05g0509400	1,67221874	0,00793588	2	Similar to DNA binding protein-like.
Os03g0374100	1,667933453	0,00200476	3	Hepatocellular carcinoma-associated antigen 59 family protein
Os05g0595300	1,667747425	0,0116632	3	Similar to CONSTANS-like protein
Os11g0137100	1,650978332	0,00451276	1	Similar to Epa4p.
Os03g0722100	1,644450743	0,0104409	2	SANT, eukarya domain containing protein.
Os04g0487300	1,632342315	0,027955	2	Similar to DNA-directed RNA polymerases II 24 kDa polypeptide.
Os08g0178300	1,623652151	0,0320999	1	Hypothetical conserved gene
Os05g0440800	1,617901894	0,0298592	2	Serine/threonine protein quinase domain containing protein.
Os04g0488000	1,614729452	0,0178513	1	Similar to PITSLRE serine/threonine-protein quinase CDC2L1
Os01g0818300	1,613849141	0,0229623	1	K Homology domain containing protein.
Os09g0516200	1,58195531	0,0278451	3	bZIP DNA-binding protein, Disease resistance, Vascular development
Os04g0224900	1,577191665	0,0115924	2	FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase domain containing protein.
Os07g0568600	1,577025568	0,0100609	4	Similar to calcium-dependent protein quinase, isoform AK1.
Os06g0150400	1,570697295	0,020736	2	Conserved hypothetical protein.
Os06g0147800	1,558854622	0,00856149	1	Similar to Mitogen-activated protein quinase quinase 2.
Os10g0422000	1,555237042	0,0146391	2	Conserved hypothetical protein.
Os02g0639700	1,554811835	0,00625017	2	Region of unknown function DUF1771 domain containing protein.
Os04g0530600	1,551200899	0,0300301	3	Similar to Thioredoxin 1 (TRX-1) (Thioredoxin M).
Os01g0781000	1,544274679	0,0115342	3	Vacuolar protein sorting-associated, VPS28 family protein
Os12g0536000	1,52715014	0,00557507	1	Similar to 2,3-biphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase-related
Os03g0119500	1,515755927	0,0182758	3	Similar to Callose synthase 1 catalytic subunit.
Os02g0203700	1,511035467	0,0321741	2	Similar to Testis expressed sequence 13A protein
Os02g0185300	1,491416159	0,0289553	6	Cytochrome P450 family protein.
Os03g0185700	1,469235646	0,0285498	2	Transferase family protein.
Os02g0192700	1,467810538	0,00151237	5	Similar to Thioredoxin peroxidase.
Os01g0273000	1,464767652	0,00378732	1	Similar to 26 proteasome complex subunit DSS1
Os08g0344100	1,457190334	0,0312711	1	Similar to Histone deacetylase.
Os01g0828100	1,454087653	0,000410319	1	Similar to Cinnamoyl-CoA reductase.
Os03g0748900	1,452466552	0,0182591	1	Aldo/keto reductase domain containing protein.
Os08g0424700	1,448078285	0,0252857	2	NB-ARC domain containing protein.
Os06g0217600	1,427944079	2,24E-05	2	Similar to kinesin motor protein-related.
Os08g0296900	1,424761672	0,0378062	2	Similar to Heat shock protein 70.
Os02g0103800	1,423266805	0,0157898	1	Similar to Ferredoxin NADP+ reductase
Os12g0137500	1,423243551	0,01527	10	Similar to Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 271 (Fragment).
Os06g0588900	1,41988176	0,0306259	4	CT11-RanBPM domain containing protein.
Os06g0489500	1,398744331	0,0343792	5	CMP/dCMP deaminase
Os03g0310500	1,391482597	0,0338387	2	CAP, conserved site domain containing protein.
Os07g0592300	1,378540365	0,0441368	2	Frigida-like family protein.
Os01g0257300	1,367176049	0,0177513	2	Similar to FPF1.
Os01g0871500	1,364910494	0,0191702	1	TGF-beta receptor, type I/II extracellular region family protein.
Os02g0806400	1,358077288	0,0171737	1	Hypothetical conserved gene.

Os09g0132600	1,353944809	0,0278778	7	Similar to DAG protein.
Os09g0515800	1,339029352	0,0406319	2	RabGAP/TBC domain containing protein.
Os04g0602100	1,305700447	0,0245236	2	Plant ascorbate peroxidase domain containing protein.
Os01g0851600	1,29025016	0,0492171	1	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase
Os05g0494900	1,284121202	0,00965515	2	SH2 motif domain containing protein.
Os05g0370600	1,279623312	0,044655	4	C2 calcium-dependent membrane targeting domain
Os01g0901200	1,273148874	0,0137856	2	Similar to RecA protein
OS01G0676900	1,26066839	0,0134626	1	Hypothetical conserved gene.
Os03g0101800	1,257990916	0,0460211	1	Protein of unknown function Cys-rich family protein
Os01g0102900	1,222376525	0,000204549	1	Light regulated Lir1 family protein.
Os01g0636400	1,215167941	0,0388378	2	Alpha/beta hydrolase family protein.
Os02g0697200	1,214161397	0,0278517	2	Conserved hypothetical protein.
Os03g0811100	1,206082468	0,0301984	1	Similar to Magnesium-chelatase subunit chlD, chloroplast precursor
Os06g0150100	1,194578631	0,0215362	2	Conserved hypothetical protein.
Os04g0534400	1,190439508	0,0178574	3	PapD-like domain containing protein.
Os05g0171300	1,176583746	0,0479277	2	Similar to Plastidial ADP-glucose transporter.
Os10g0159700	1,146022008	0,0394675	6	Heat shock protein Hsp20 domain containing protein.
Os01g0754500	1,142311414	0,0100592	1	Protein of unknown function DUF1421 family protein.
Os01g0328500	1,130289356	0,0117354	3	Bucentaur or craniofacial development family protein.
Os02g0754100	1,117313905	0,0166028	1	Similar to S1 self-incompatibility locus-linked pollen G211 protein/DIS3-like exonuclease 2.
Os01g0507900	1,093811264	0,034178	2	Similar to NClpP3
Os03g0831100	1,090416253	0,0187263	2	Armadillo-like helical domain containing protein.
Os05g0510700	1,084878599	0,00280887	4	Similar to BSD domain containing protein.
Os07g0633100	1,054223847	0,034837	1	Similar to Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 4.
Os07g0236800	1,044623475	0,0386449	5	Snf7 family protein.
Os04g0648900	1,038859929	0,0194568	2	Snf7 family protein.
Os01g0233000	1,036451531	0,00444479	12	DREPP plasma membrane polypeptide family protein/Salt stress root protein RS1.
Os09g0480700	1,03634523	0,0140686	1	Similar to Transcription factor Hap5a-like protein
Os03g0370250	1,023648821	0,00453222	4	Protein of unknown function DUF573 family protein
Os01g0957000	1,022359912	0,0370533	1	ATP-NAD quinase, PpnK-type, all-beta domain containing protein.
Os08g0242700	1,020180728	0,00824519	4	Similar to uridylyltransferase-related.
Os01g0850900	1,019655863	0,0375728	10	SOUL haem-binding protein domain containing protein.
Os11g0456300	1,009025693	0,00990563	9	Similar to SKP1-like protein 1A
Os12g0431300	1,008816412	0,0171991	2	Six-bladed beta-propeller, TolB-like domain containing protein.
Os05g0506800	1,008381239	0,0272622	1	Hypothetical conserved gene.
Os03g0225600	1,00776336	0,0470613	1	Conserved oligomeric complex COG6 family protein.
Os02g0593700	1,005883149	0,00808278	6	Similar to TA4 protein

FONTE: O AUTOR (2016)

A proteína OsRAA1 (Os01g0257300) foi detectada induzida, com $\log_2$ 1,36. OsRAA1 pertence a uma família de proteínas que possivelmente é regulada por auxina, FPF1 (GE et al., 2004). A proteína RAA1 foi primeiramente estudada como fator de florescimento em mostarda (KANIA et al., 1997 ;

MELZER et al., 1999). É também indicado que RAA1 pode estar envolvido em vias de sinalização dependentes de giberelinas (KANIA et al., 1997). Está envolvido no florescimento em *Arabidopsis*, mas não em arroz (KANIA et al., 1997; Ge et al., 2004). Há alguns trabalhos envolvendo arquitetura e desenvolvimento de raízes e folhas mediados por RAA1. Em arroz com a indução da expressão de OsRAA1, resultou em folhas mais longas e filamentos que aparecem em fases tardias de desenvolvimento (GE et al., 2004). A expressão aumentada de OsRAA1 é sempre encontrada em células com o crescimento rápido como, primórdios de raiz lateral, raízes adventícias jovens, raízes laterais, meristema e na zona de divisão do ápice da raiz. Células desses tecidos estão sempre em divisão e elongação, desempenhando um papel associado a auxina (BOERJAN et al., 1995 ; JOHN et al., 1995; CASIMIRO 2001).

Foram identificadas duas proteínas induzidas e que talvez possam estar relacionadas, *RAD23* e *proteossomo 26s* (Os09g0407200, Os01g0273000) com expressão diferencial $_{log2}$ 2,0 e $_{log2}$ 1,5 respectivamente. *RAD23* é uma proteína que promove o reparo de DNA por excisão. *RAD23* possui um domínio tipo ubiquitina que pode interagir através da porção N-terminal com *proteossomo26s* (CHEN et al., 2001). Tem sido relatado que esse complexo desempenha várias funções como reparo no DNA, progressão do ciclo celular, morfologia e resposta a estresse (BERTOLAET et al., 2001). Em *Arabidopsis* mutações em *RAD23* que impossibilitam sua interação com *proteossomo26s* produzem plantas com uma baixa estatura (FARMER et al., 2010).

Um receptor quinase (Os03g0124200) foi identificado induzido $_{log2}$ 1,95, essa proteína apresenta 91% de similaridade (número do acesso NCBI XM_004985849.3) com At5g24010. At5g24010 possui uma região extracelular e podendo se ligar a carboidrato, tem sido proposto diversas funções para esses receptores, coordenando crescimento celular, comunicação célula-célula e remodelamento da parede celular durante o estágio vegetativo e reprodutivo de desenvolvimento, talvez em vias de respostas a estresse abiótico e biótico. Na figura 10 é possível observar um modelo proposto de como essa proteínas poderia regular o crescimento radicular (GUO et al., 2009; Lindner et al., 2012; BOISSON-DERNIER et al., 2011).

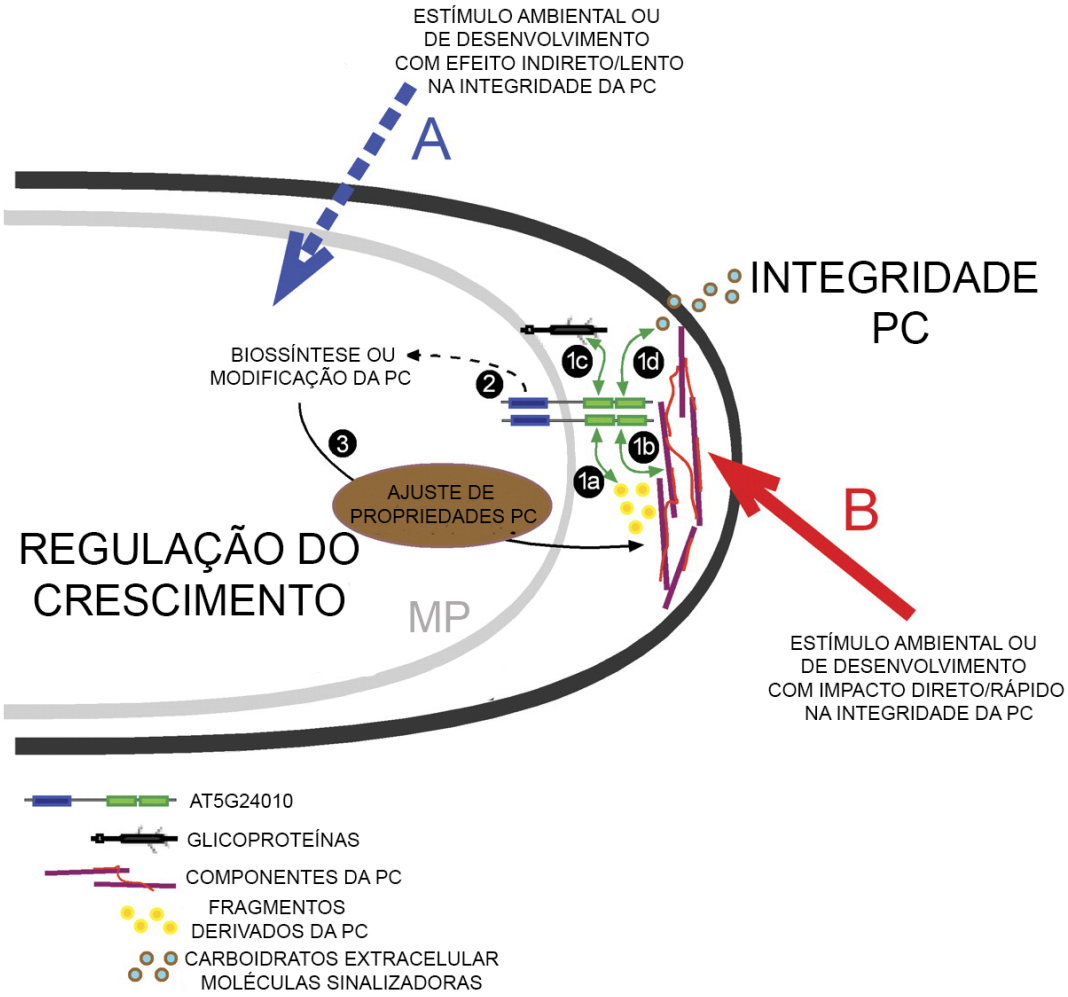


FIGURA 10 -MODELO PROPOSTO PARA A VIA DE SINALIZAÇÃO NO CONTROLE DA INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR (PC) E REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO. (1a) AT5G24010 PODE LIGAR CARBOIDRATO DERIVADO DA DEGRADAÇÃO DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR; (1b) COMPONENTES DA PAREDE CELULAR RICOS EM CARBOIDRATOS; (1c) GLICOPROTEÍNAS NA MEMBRANA PLASMÁTICA (MP), (1d) OU SINALIZADORES MOLECULARES RICOS EM CARBOIDRATOS DERIVADOS DAS CÉLULAS VIZINHAS; (2) ESSA INFORMAÇÃO É PROCESSADA NO CITOPLASMA E RETRANSMITIDA PARA O APOPLASTO DIRETA OU INDIRETAMENTE PARA A REGULAÇÃO DE; (3) SÍNTESE, SECREÇÃO, OU ATIVIDADE BIOSINTÉTICA E/OU MODIFICAR ENZIMAS PARA AJUSTAR A COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR PARA O CRESCIMENTO OU RESPOSTA A SINALIZAÇÃO MOLECULAR DO AMBIENTE CELULAR. (A) POR UM LADO A VIGILÂNCIA DE AT5G24010 PODERIA OCORRER POR UM AJUSTE FINO INDIRETO INDUZINDO MUDANÇAS NA PAREDE CELULAR POR VIAS AMBIENTAIS OU DE DESENVOLVIMENTO COMO BRASSINOSTERÓIDES OU OUTRAS SINALIZAÇÕES MOLECULARES; (B) POR OUTRO LADO, AT5G24010 PODERIA DIRETAMENTE SENTIR ALTERAÇÕES DA PAREDE CELULAR POR VIAS AMBIENTAIS OU DE DESENVOLVIMENTO PARA AJUSTAR PROPRIEDADES DA PAREDE CELULAR.
FONTE: MODIFICADO DE BOISSON-DERNIER et al. (2011).

Foi identificada uma proteína da família das calmodulinas (CaM), OsCML8 (Os10g0389000) com a expressão induzida $_{log2}$ 3.2. Em plantas proteínas calmodulinas são sensores de concentração intracelular de Ca^{2+}, que respondem a um estimulo externo provocando alterações fisiológicas (SANDERS et al., 2002; BOONBURAPONG; BUABOOCHA, 2007). A presença

de *A. brasilense* FP2 poderia ser sensoriada por OsCML8 e causar algumas das alterações fisiológicas de resposta a estresse biótico e abiótico na planta. Proteínas CaM que ligam Ca^{2+} sinalizam estímulos ambientais, aspectos do desenvolvimento e transmitem sinal para diversas enzimas alvos e proteínas sinais, incluindo enzimas metabólicas, fatores transcricionais, canais de íons proteínas quinases/fosfatase e proteínas estruturais (BOUCHÉ et al., 2005 ; KIM et al., 2009 ; SNEDDEN; FROMM 2001).

6.6. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NAS RAIZES DE PLÂNTULAS DE ARROZ INDUZIDAS OU REPRIMIDAS LIGADAS A ESTRESSE BIÓTICO OU ABIÓTICO

Essa categoria de proteínas foi classificada pelo programa de computador MapMan (USADEL et al., 2009) e são proteínas da planta ligadas a estresse biótico e abiótico em resposta a inoculação com *A. brasilense* FP2. Das proteínas identificadas como diferencialmente expressas, 46 delas foram relacionadas a algum tipo de estimulo a estresse na planta, 12 reprimidas e 34 induzidas (FIGURA 11). Entre estes, há genes relacionados: a sinalização por hormônios, de parede celular, proteólise, proteínas PR, de sinalização, de choque térmico, metabólitos secundários, fatores de transcrição, estado redox, fenilpropanoides e peroxidases. Todos os genes encontrados nessa categoria estão descritos na tabela 4.

Após um ataque de algum patógeno é possível observar na planta um rápido aumento na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) (APOSTOL et al., 1989). Foram identificadas 7 proteínas induzidas relacionadas a estresse oxidativo como peroxidases e tiorredoxinas (TRX). Uma ascorbato peroxidase (APX) encontrada induzida é uma proteção indispensável contra danos por peroxido de hidrogênio e hidroxilas em cloroplastos e outros constituintes celulares (ASADA, 1992). Glutationa peroxidase (GPX) induzida. GPX é normalmente encontrada induzida como defesa antioxidante em resposta a estresse ambiental (FOYER et al., 1997). A expressão de TRX, APX e GPX podem conferir resistência a diversos fatores ambientais para a planta como, salinidade, seca, radiação, estresse hídrico, patógeno e deficiência ou excesso de minerais (ASHRAF, 2009). Em *Arabidopsis* a redução da expressão de peroxidases deixou a planta mais suscetível ao ataque de *Pseudomonas*

syringae (DAUDI, et al. 2012), e tornaram-se mais suscetíveis a patógenos como fungos, vírus ou bactérias, quando estavam sensibilizados por estresse oxidativo (BINDSCHEDLER et al., 2006). Essas proteínas participam de um ciclo antioxidante conhecido como ciclo Ascorbato - Glutationa e envolvem APX, GPX, TRX entre outras enzimas e desempenham um importante papel no estado redox nas plantas (FIGURA 12).

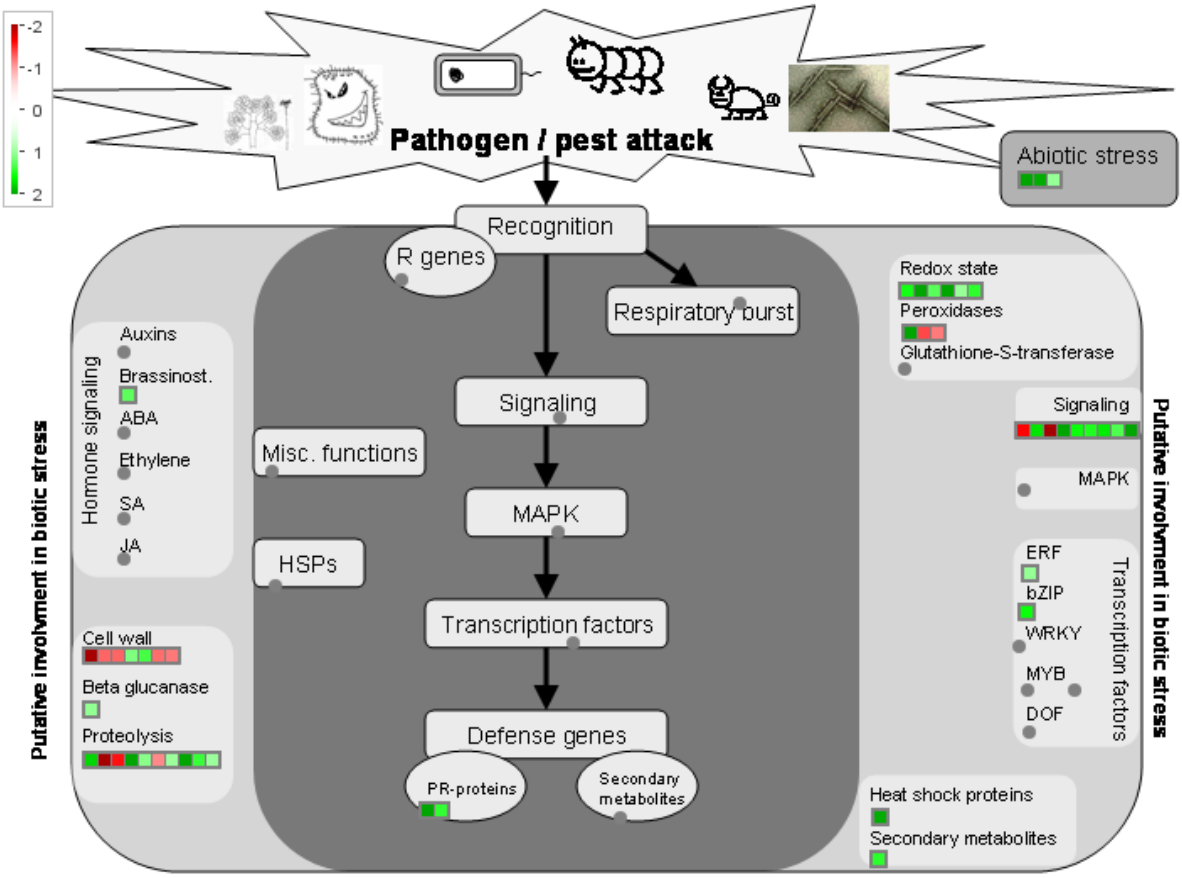


FIGURA 11 – ANALISE NO SOFTWARE MAPMAN PARA UMA VISÃO GERAL DE PROTEÍNAS DO ARROZ IDENTIFICADAS COMO RESPOSTA A ESTRESSE ABIÓTICO E BIÓTICO. AS EXPRESSÕES DAS PROTEÍNAS ESTÃO REPRESENTADAS COMO INDUZIDAS (CAIXAS VERDES) OU REPRIMIDAS (CAIXAS VERMELHAS).
FONTE: O AUTOR (2016)
NOTA: ANÁLISE REALIZADA UTILIZANDO SOFTWARE MAPMAN (USADEL et al., 2009)

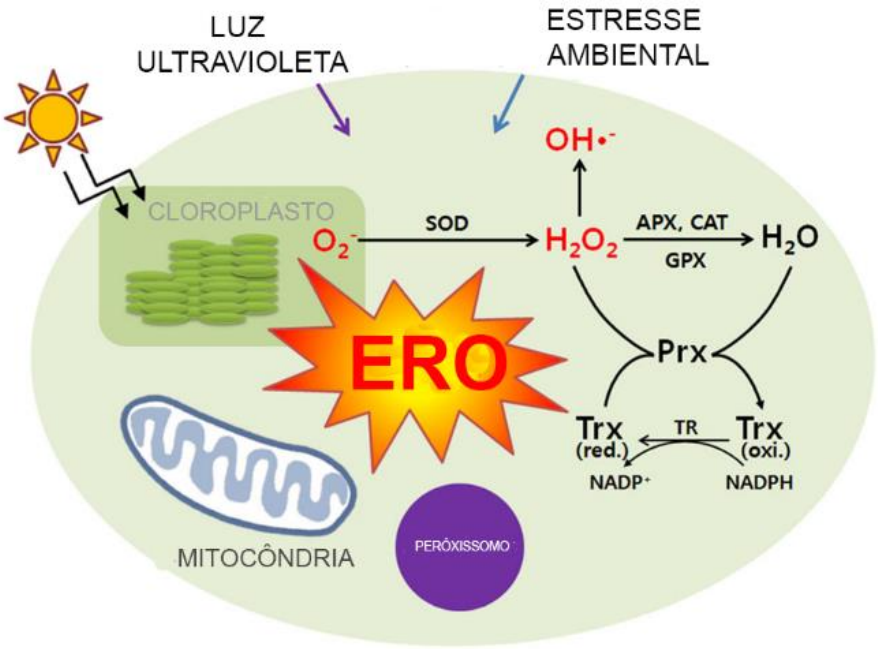


FIGURA 12- RESPOSTA CELULAR CONTRA ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO. DURANTE A VARIEDADE DE CONDIÇÕES DE ESTRESSE (ESTRESSES AMBIENTAIS, ABIÓTICOS E BIÓTICOS), ERO PODEM SER GERADOS. NO INÍCIO DA REAÇÃO, AS ERO PRIMÁRIO SÃO ANÍONS SUPERÓXIDOS (O^{2-}), A ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE CONVERTE A PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) QUE É DETOXIFICADA PELA CATALASE (CAT), ASCORBATO PEROXIDASE (APX), GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) E PEROXIREDOXINA (PRX). UMA VEZ QUE ANIONS SUPERÓXIDOS ESTÃO NA PRESENÇA DESSAS ENZIMAS A FORMAÇÃO DE H_2O_2 É INEVITÁVEL. H_2O_2 PODE FACILMENTE PERMEAR A MEMBRANA DO PEROXISSOMO, SENDO UMS IMPORTANTE ETAPA NA PROTEÇÃO DA CÉLULA CONTRA DANOS POR ERO. OS SINAIS REDOX IRÃO SER TRANSMITIDOS PARA O NÚCLEO E PODEM REGULAR O DESENVOLVIMENTO DA PLANTA.
FONTE: MODIFICADO DE CHI et al. (2013)
NOTA: DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NAS RAÍZES DE ARROZ APX, GPX E TRX APARECEM NESSA VIA.

Como pode ser observado *A brasilense* FP2 desencadeia uma resposta de defesa no arroz, diversas proteínas relacionadas a estresses ambientais estão moduladas, isso de certa maneira pode melhorar o sistema imunológico induzido uma resistência sistêmica na planta frente a esses estresses. *A. brasilense* protege a planta contra patógenos como *Rhizoctonia* spp e *Pseudomonas syringae,* tolerância contra alta salinidade, seca, etc. (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; GLICK; BASHAN, 1997; GLICK et al., 1998; RUSSO et al., 2008; TILAK; KRISHNA MURTI., 1981).

Um dos primeiros eventos detectáveis na planta durante uma interação planta-patógeno é o rápido aumento na biossíntese de etileno. Etileno é um hormônio gasoso de resposta a estresse e pode ativar defesas na planta contra, bactérias, vírus e fungos (ECKER; DAVIS, 1987). Entretanto o aumento na concentração de etileno nos tecidos da planta é tóxico e pode causar inibição no

crescimento da raiz (ABELES et al., 1992). Algumas bactérias como *Herbaspirillum seropedicae* possuem uma enzima chamada de ACC-deaminase que podem diminuir os níveis de etileno diminuindo a concentração de ACC na planta (ALBERTON et al., 2013; GLICK et al., 1998), entretanto *A. brasilense* FP2 não possui ACC deaminase. Dessa maneira foram medidos os níveis de etileno produzido pela planta em 3 e 7 dias inoculados com *A. brasilense, H. seropedicae* como um controle negativo onde a produção de etileno fosse menor (ALBERTON et al., 2013) e um controle sem inoculo. Como pode ser observado *A. brasilense* FP2 não altera os níveis de etileno na planta comparando com as plantas não inoculadas e *H. seropedicae* apresenta uma diminuição nos níveis de etileno, como mostrado por Alberton et al., (2013).

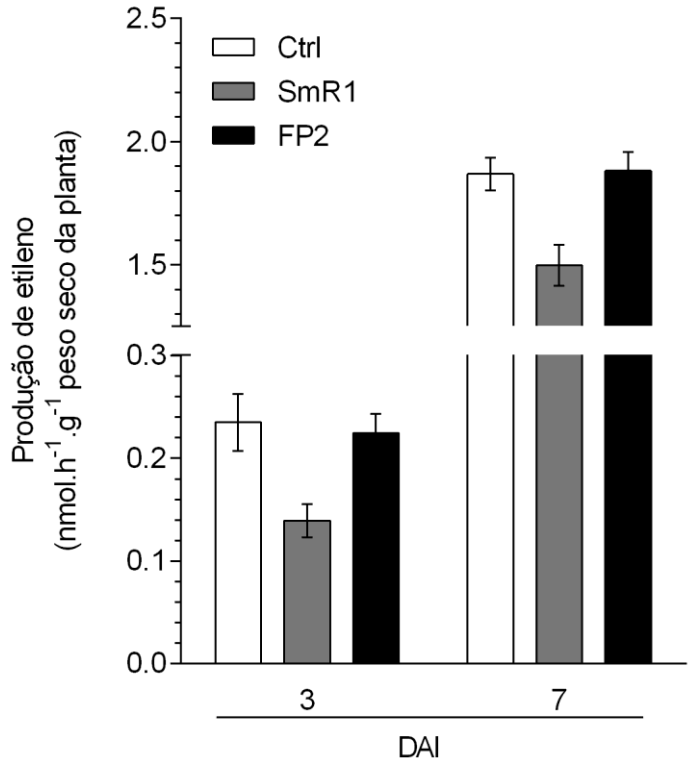


FIGURA 13 – PRODUÇÃO DE ETILENO NO ARROZ INOCULADO COM *A. brasilense* FP2 OU *H. seropedicae* OU NA AUSÊNCIA DE INÓCULO EM 3 OU 7 DIAS. OS VALORES SÃO REFERENTES A TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES COM QUINZE REPLICATAS.
FONTE: O AUTOR (2016).
Nota: Ctrl- Controle Não Inoculado; SmR1- *H. seropedicae* SmR1*;* FP2- *A. brasilense* FP2; DAI- DIAS APÓS A INOCULAÇÃO.

TABELA 4- GENES DO ARROZ DE RESPOSTA A ESTRESSE BIÓTICO OU ABIÓTICO NA PRESENÇA DE *A. brasilense* FP2

ID (RAP-DB)	Log2	Pep	Descrição RAP-DB	Tipo estresse/resistência	Referencia
			Estresse abiótico		
Os08g0546100	2,140036	2	Similar to protein binding protein/ Putatie BAG domain containing protein	Potencial resistência a metais pesados	Chakrabarty et al. (2009); Dubey et al. (2010)
Os08g0522600	1,969388	3	Similar to Chaperone protein dnaJ 10.	Choque térmico	Derevyanchuk et al. (2015)
Os01g0233000	1,036452	12	DREPP plasma membrane polypeptide family protein	Salinidade, alumínio e Na_2CO_3	Kumar et al. (2015); Wang et al. (2014); Yu et al. (2013)
			Sinalização de hormônio Brassinosteróide		
Os01g0851600	1,29025	1	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase	Oxidativo, baixa temperatura	Cao et al. (2005); Wingler (2011)
			Parede celular		
Os12g0443500	-2,09216	25	Similar to UDP-glucose 6-dehydrogenase	Herbívoia,	Buffon (2015)
Os02g0678400	-1,25292	7	NAD(P)-binding domain containing protein.	-	-
Os01g0754500	1,142311	1	Protein of unknown function DUF1421 family protein.	Doença, sem função conhecida	Wu et al. (2016)
Os07g0592300	1,37854	2	Frigida-like Family protein.	-	-
Os12g0554800	-1,20247	1	Similar to Polygalacturonase-like protein.	Modificação parede celular	Zhang et al. (2007)
Os01g0788400	-1,16897	3	Similar to Pectinesterase	Seca	Wang et al. (2011)
			β-glucanase		
Os07g0633100	1,054224	1	Similar to Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 4	Doença	Tripathy (2013)
			Proteólise		
Os01g0767100	1,795565	5	Similar to Lysosomal Pro-X carboxypeptidase.	Insetos e patógenos	Ryan (1990)
Os01g0902200	-3,57283	2	Peptidase M3A and M3B, thimet	Choque térmico	Jung; An (2012)
Os01g0868600	-1,55742	2	Hypothetical conserved gene.	Doença bacteriana	Jung et al. (2014)
Os05g0568900	2,082696	4	Similar to Protease Do-like 1	Bactéria, seca, hídrico	Kottapalli et al. (2007 e Schuhmann et al. (2012 e Wang et al. (2011)
Os01g0507900	1,093811	2	Similar to NClpP3 (ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP3).	-	-
Os11g0661400	-1,09914	2	ATPase, AAA-type, core domain containing protein.	-	-
Os02g0593700	1,005883	6	Similar to TA4 protein.	-	-
Os04g0684800	2,413892	4	Similar to CROC-1-like protein	-	-
Os06g0588900	1,419882	4	CT11-RanBPM domain containing protein.	-	-
Os11g0456300	1,009026	9	Similar to SKP1-like protein 1A.	-	-

			PR-proteínas		
Os01g0835600	2,031854	2	AT hook, DNA-binding, conserved site domain containing protein.	Doença	Ralph et al. (2007)
Os08g0424700	1,448078	2	NB-ARC domain containing protein.	Resistencia a doença brusone (*Pyricularia grisea*)	Van Ooijen et al. (2008); Sallaud et al. (2003)
			Estado oxidativo		
Os04g0530600	1,551201	3	Similar to Thioredoxin 1.	ERO	
Os10g0502500	3,120443	3	Cytochrome b5 domain containing protein.	ERO	
Os04g0602100	1,3057	2	Ascorbate peroxidase domain containing protein.	ERO	Zhang et al. (2012)
Os03g0358100	2,15719	3	Similar to Glutathione peroxidase.	ERO	Gao et al. (2014)
Os01g0850900	1,019656	10	SOUL haem-binding protein domain containing protein.	ERO, frio	Shen et al. (2014)
Os02g0192700	1,467811	5	Similar to Thioredoxin peroxidase.	ERO, seca, frio	Fang, Y. et al. (2015 e Umate (2010 e Wang et al. (2015)
Os01g0326300	2,608976	6	Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial family protein.	ERO	Fang, H. et al. (2015)
Os06g0695300	-1,3692	7	Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial family protein.	ERO	Fang, H. et al. (2015)
Os03g0368300	-1,16437	8	Similar to Peroxidase 1	ERO, excesso de ferro	Bashir et al. (2014)
			Sinalizadores		
Os01g0810800	-1,60921	2	Hypothetical conserved gene.	-	-
Os12g0565300	1,727997	1	Similar to Calmodulin-binding protein MPCBP.	-	-
Os02g0105500	-3,1969	4	IQ calmodulin-binding region domain containing protein	-	-
Os10g0389000	3,199884	2	Centrin.	-	-
Os07g0568600	1,577026	4	Similar to calcium-dependent protein quinase, isoform AK1	-	-
Os02g0203700	1,511035	2	Similar to Testis expressed sequence 13A protein.	-	-
Os10g0441800	1,691011	4	Similar to RAB5B.	-	-
Os09g0515800	1,339029	2	RabGAP/TBC domain containing protein.	-	-
Os05g0304400	2,054114	20	Similar to GDP dissociation inhibitor	-	-
			Elemento responsivo a etileno		
Os04g0648900	1,03886	2	Snf7 Family protein.	-	-
			Fator de transcrição bZIP		
Os09g0516200	1,577192	2	bZIP DNA-binding protein, Similar to Transcription factor RF2a.	Doença	Jakoby et al. (2002)

Choque termico					
Os08g0522600	1,969388	3	Similar to Chaperone protein dnaJ 10 (AtJ10) (AtDjC10).	Choque térmico	Derevyanchuk et al. (2015)
Fenilpropanóides					
Os03g0185700	1,469236	2	Transferase Family protein.	Defesa	Widjaja et al. (2009)

FONTE: O AUTOR (2016)

6.7. GENES DE *A. brasilense* IDENTIFICADOS POR LC-MS/MS NAS AMOSTRAS DE RAIZES INOCULADAS

Durante a análise proteômica do arroz foram possíveis identificar 1001 proteínas de *A. brasilense,* dentre elas, envolvidas na FBN, síntese de PHB, quimiotaxia, transporte, montagem de flagelo, biossíntese de exopolisacarídeos (EPS), lipopolisacarídeos (LPS), auxina, etc.

Os genes identificados envolvidos no metabolismo de nitrogênio são da montagem da nitrogenase, reguladores da FBN, reguladores transcricionais e transportadores (TABELA 5). A partir destes resultados, ensaios para medir a atividade da nitrogenase por redução de acetileno foram realizados, com o objetivo de confirmar se o *A. brasilense* FP2 colonizando as raízes de arroz estava fixando nitrogênio em 3 e 7 DAI (plantas não inoculadas com *A. brasilense* FP2 foram utilizadas como controle). (FIGURA 14) foi possível observar que em 3 DAI *A. brasilense* FP2, está fixando nitrogênio aumentando em 7 DAI. *In vitro* a variabilidade da atividade da nitrogenase de *Azospirillum* pode variar de 0 a 155 nmol de C_2H_4 mg proteina^{-1} h^{-1}, quando medida a partir de culturas puras de *A. lipoferum e A. brasilense* obtidos de solos de diferentes regiões (HAN e NEW,1998). Em outro estudo essa variação de atividade da nitrogenase foi de 17,6 a 49,6 nmol de C_2H_4 mg proteina^{-1} h^{-1} (MASCARUA-ESPARZA et al., 1988), torna-se difícil comparar tais resultados, levando em consideração as diferenças nas técnicas empregadas. Outras proteínas associadas ao metabolismo de nitrogênio foram identificadas na análise proteômica do *A. brasilense,* são proteínas que regulam a ativação dos genes *nif, glnZ, glnB, ntrC, ntrX, amtB e glnA*.

Os genes *nifHDK* genes estruturas do complexo da nitrogenase (MERRICK et al.,1982) e estão sujeitos a ativação pela proteína NifA juntamente com o fator σ^{54} da RNApolimerase (DIXON; KHAN, 2004). Em *A. brasilense* NifA é expressa constitutivamente na forma inativa e precisa de sua ativação pela GlnB uma proteína do tipo PII (ARAÚJO et al., 2004; ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH,1996). GlnB é sintetizada em altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio e em baixos níveis sob condições de excesso de nitrogênio (DE ZAMAROCZY et al., 1990; DE ZAMAROCZY et al.,1993; HUERGO et al., 2003). Outra proteína do tipo PII importante na regulação da nitrogenase em *A.*

brasilense é GlnZ. A expressão do gene GlnZ é monocistrônica e controlada pela proteína NtrC, sendo aumentada em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998, 1999). GlnZ e GlnB estão relacionadas com o transporte de íons amônio pelo complexo PII-AmtB (DE ZAMAROCZY, 1998; HUERGO et al., 2007) e regulação pós-traducional da nitrogenase em resposta à amônia (HUERGO et al., 2005; 2007; KLASSEN et al., 2005), sendo que GlnB sensoria o rápido aumento na concentração de amônio enquanto GlnZ é principalmente responsável por sinalizar o retorno a condições de depleção de amônio (KLASSEN et al., 2005).

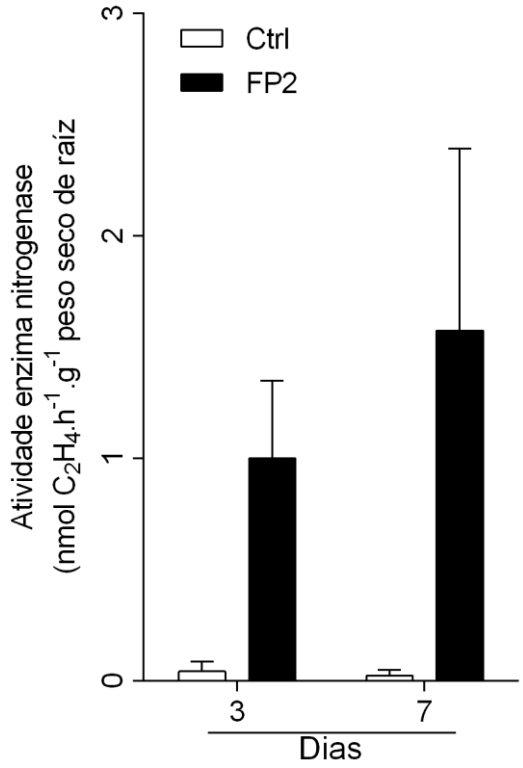


FIGURA 14 – ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE DE *A. brasilense* FP2 ASSOCIADO A RAIZES DE ARROZ CV. NIPPONBARE. OS RESULTADOS REPRESENTAM UM ENSAIO REALIZADOS COM 15 REPLICATAS, OS VALORES OBTIDOS EM nmol DE ETILENO EM 60 MINUTOS FOI NORMALIZADO PELO PESO SECO DE CADA PLANTA.
FONTE: O AUTOR (2016).

As proteínas NarX e NarL identificadas em *A. brasilense* aderido à raiz do arroz são dois componentes regulatórios requeridos para a denitrificação em *E. coli* e *P. aeruginosa* (VAN ALST et al., 2007 ; MORENO-VIVIÁN et al., 1999). Especula-se uma possível via de adesão a superfície da raiz por *A. brasilense* FP2 (CAMILIOS-NETO et al., 2014). Em *E. coli* a expressão do operon *narXL* é ativado sob condições de limitação de oxigênio e NarL é ativado na presença de

nitrato (MORENO-VIVIÁN et al., 1999). Em *P. aeuruginosa* NarX/NarL tem papel essencial na ativação da regulação que controla a formação do biofilme (VAN ALST et al. (2007). A ligação de nitrato ao elemento P BOX (domínio conservado em *NarX* nitrato- dependente) altera a conformação de NarX, permitindo auto-fosforilação e subsequentemente fosforilando NarL, que se liga a um sitio alvo especifico do DNA resultando na ativação ou desativação da transcrição do operon (VAN ALST et al., 2007; MORENO-VIVIÁN et al., 1999).

TABELA 5 – PROTEÍNAS DO *A. brasilense* ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE NITROGÊNIO

ID	gene	Peptídeos	descrição
gi|392381754	nifH	12	nitrogenase iron protein
gi|392381752	nifK	22	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain
gi|392381753	nifD	21	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain
gi|392381738	nifS	5	Nitrogenase metalloclusters biosynthesis protein
gi|392380839	nifU-like	3	putative iron-sulfur cluster scaffold
gi|392381739	nifU	7	Fe-S cluster assembly protein
gi|392381746	nifX	1	nitrogenase molybdenum-iron protein
gi|392381735	nifW	3	nitrogenase-stabilizing/protective protein
gi|392381743	fdxB	3	ferredoxin III (nif specific)
gi|392377824	moaB	5	molybdopterin biosynthesis enzyme
gi|392380443	moSto	4	molybdenum storage protein alpha subunit
gi|392381004	glnZ	6	P-II nitrogen regulatory protein
gi|392382078	glnB	10	P-II nitrogen regulatory protein
gi|392377167	ntrC	10	transcriptional regulator involved in nitrogen fixation
gi|392377168	ntrX	1	transcriptional regulator involved in nitrogen fixation
gi|392380681	amtB	1	ammonium transporter
gi|392382076	glnA	32	glutamine synthetase
gi|392378005	glnH	5	glutamine ABC transporte
gi|392379901	ptsN	2	nitrogen regulatory IIA
gi|392380319	NarL	4	nitrate/nitrite response regulator protein
gi|392382761	NarX	7	two-component transcriptional regulator of nitrate reductase

FONTE: O AUTOR (2016)

A capacidade da bactéria de ajustar seu metabolismo diante a situações adversas ou durante a interação com a planta, possui uma grande influência no sucesso de colonização da raiz. A capacidade de sintetizar e armazenar compostos de reserva como os polihidroxialcanoatos (PHA) é uma vantagem, permitindo sua utilização como fonte energética e reserva de compostos orgânicos (MADISON e HUISMAN, 1999). Dessa maneira, atestando a observação realizada sobre PHBs (FIGURA 4), foram encontrados genes ligados a síntese e armazenamento de PHB em *A. brasilense* (TABELA 6), entre eles

proteínas para a formação do granulo e síntese de PHB. Sendo assim, para avaliar se *A. brasilense* FP2 estava sintetizando PHB durante o processo de colonização da planta, plantas foram inoculadas com *A. brasilense* FP2 selvagem e com uma estirpe mutante de *A. brasilense* Sp7 (*ΔPhaC1*) deficiente em produzir PHB. A produção de PHB foi estimada por citometria de fluxo antes da inoculação (cultivo em NFB-lactato), 3 e 7 dias após a inoculação em arroz cv. Nipponbare, utilizando vermelho de nilo para corar os grânulos de PHB. Como pode ser observado não existe um acumulo significativo de PHB para a estirpe mutante *ΔPhaC1* durante os dias avaliados, mostrando que a bactéria mutante não consegue formar o granulo de PHB. Contrariamente, *A. brasilense* FP2 tem um aumento significativo na produção de PHB com 7 DAI (FIGURA 15).

TABELA 6 - PROTEÍNAS DE *A. brasilense* ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE PHB

ID	gene	Peptídeos	descrição
gi|392381670	phasin	8	phasin domain protein
gi|392377297	phasin	14	Granule-associated protein
gi|392382223	phbC	18	poly-beta-hydroxybutyrate polymerase
gi|392379928	phaR	7	polyhydroxyalkanoate synthesis repressor

FONTE: O AUTOR (2016)

Em *A. brasilense* a reserva de PHB possui grande importância para superar períodos com privação de carbono. *A. brasilense* Sp7 selvagem demonstra uma sobrevivência a maiores períodos de privação de carbono comparados a estirpe mutante *ΔPhaC1* que é deficiente em produzir PHB (KADOURI et al., 2002; KADOURI, JURKEVITCH e OKON, 2003; KADOURI et al., 2005). Em campo, bactérias que possuem uma produção maior de PHB demonstram maiores efeitos de promoção de crescimento vegetal em trigo e milho (DOBBELAERE, S. et al., 2001; HELMAN, BURDMAN e OKON, 2011). Em algumas bactérias a via de síntese e degradação de PHAs é bem caracterizada, com o polímero sendo acumulado quando há disponibilidade de ácidos graxos, mas deficiência em nutrientes vitais como N, P, S e O_2. PHAs são degradados quando a disponibilidade de nutrientes aumenta ou quando ocorre limitação de carbono, degradação e síntese podem ocorrer ao mesmo tempo em alguns casos (WITHOLT e KESSLER, 1999).

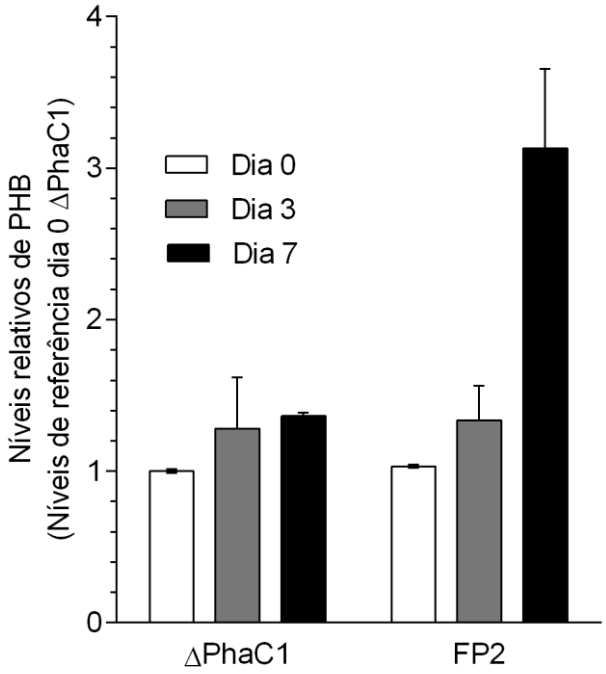


FIGURA 15 – PRODUÇÃO DE PHB DE *A. brasilense* FP2 E MUTANTE *ΔPHAC1* EM CULTURA, 3 E 7 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO EM ARROZ.CV. NIPPONBARE OS VALORES CORRESPONDEM A UM EXPERIMENTO EM TRIPLICATA. OS VALORES DE FLUORECÊNCIA DE *ΔPHAC1* EM CULTURA FORAM UTILIZADOS COMO NORMALIZADOR PARA OBTER OS NÍVEIS RELATIVOS DE PRODUÇÃO DE PHB DURANTE OS DIAS.
FONTE: O AUTOR (2016)

Um aspecto chave na FBN é a sensibilidade ao oxigênio (O_2). A maioria dos diazotrófos preferencialmente fixa nitrogênio sob condições onde a concentração de O_2 é baixa (GALLON, 1981). Alguns componentes da via de fixação de nitrogênio são irreversivelmente inativados por O_2, como a nitrogenase (EADY e SMITH, 1979). Foi postulado que radicais livres possuem grande responsabilidade na toxicidade e talvez possa inibir a fixação de nitrogênio (FRIDOVICH, 1978, 1981; HALLIWELL, 1981). Essas espécies reativas de oxigênio (ERO), em particular peroxido de hidrogênio H_2O_2 superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH^-), são gerados por várias vias durante o metabolismo aeróbico e podem produzir efeito toxico e inibição da FBN em alguns casos (FRIDOVICH, 1978; BUCHANAN, 1977; MORTENSON et al., 1976). Foram encontradas diversas proteínas envolvidas em redução de EROs nas células de *A. brasilense* FP2 entre elas, superóxido dismutases, peroxidases, catalase e redutases (TABELA 7). Dessa maneira, para avaliar a formação de ERO intracelular em *A. brasilense* FP2 durante a colonização de arroz cv. Nipponbare, os níveis de ERO foram analisados na bactéria em cultura

contendo amônio e colonizando as raízes de arroz em 3 e 7 dias. É possível observar que *A. brasilense* FP2 tem uma formação de ERO menor enquanto está colonizando a planta e fixando nitrogênio em 3 e 7 quando comparado a bactéria em meio liquido na presença de amônio, não fixando nitrogênio (FIGURA 15). Isso pode sugerir que *A. brasilense* FP2 expressa proteínas que diminuem o estado de oxidação intracelular quando tem necessidade de fixar nitrogênio. É observado que em bactérias que estão fixando nitrogênio, proteínas que diminuem ERO intracelular como superóxido dismutases são expressas em maior quantidade quando comparadas a bactérias que não estão fixando nitrogênio, em contrapartida, a repressão da atividade de nitrogenase na presença de amônio é associado a um declínio nessas proteínas em *A. brasilense* (CLARA et al., 1984).

TABELA 6 - PROTEÍNAS DO *A. brasilense* ENVOLVIDAS EM REDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

ID	gene	Peptídeos	descrição
gi|392378525	ahpC	11	alkyl hydroperoxide reductase, C subunit
gi|392382858	ahpD	4	putative Alkylhydroperoxidase domain D subunit
gi|392378526	ahpF	2	alkyl hydroperoxide reductase, F subunit
gi|392381058	ccpA	12	cytochrome c551 peroxidase
gi|392377884	cpo1	5	non-heme chloroperoxidase
gi|392381798	bcp	2	thiol peroxidase, thioredoxin-dependent
gi|392377402	sodB	4	superoxide dismutase, iron/manganese cofactor
gi|392379921	sodA	2	superoxide dismutase
gi|392380629	TrxA	7	thioredoxin 1, redox factor
gi|392380535	trx	9	putative thioredoxin
gi|392381798	trx	2	thiol peroxidase, thioredoxin-dependent
gi|392381056	KatA	2	catalase
gi|392382635	gor	2	glutathione reductase

FONTE: O AUTOR (2016)

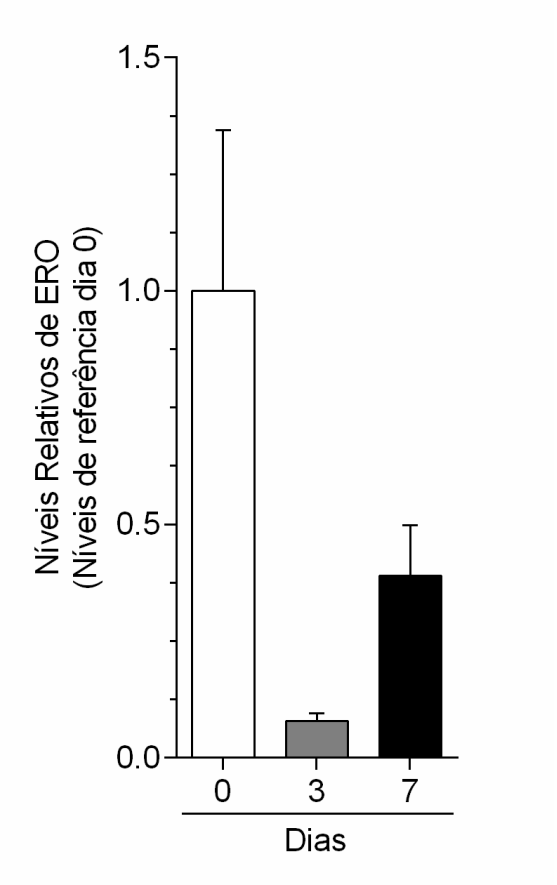


FIGURA 16 – FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO) DE *A. brasilense* FP2 EM CULTURA E INOCULADO EM ARROZ CV. NIPPONBARE. OS VALORES CORRESPONDEM A UM EXPERIMENTO EM TRIPLICATA. OS TEMPOS DE AMOSTRAGEM FORAM CONTADOS RELATIVOS AOS DIAS APÓS INOCULAÇÃO (DAI) DOS TRATAMENTOS COM A PLANTA, OS VALORES DE FLUORECENCIA DE *A. brasilense* FP2 EM CULTURA CONTENDE NH4Cl FORAM UTILIZADOS COMO NORMALIZADOR PARA OBTER OS NÍVEIS RELATIVOS DE FORMAÇÃO DE ERRO DURANTE OS DIAS.
FONTE: O AUTOR (2016)

Uma das explicações alternativas para o efeito de estimulação do crescimento em plantas por *A. brasilense,* envolvem a síntese de substâncias que regulam o crescimento da planta entre elas a auxina, ácido indolacético (AIA). Dessa maneira foram encontradas entre as proteínas do *A. brasilense* associado a raízes de arroz (TABELA 9) proteínas de produção de AIA da via por ácido indol-3-piruvico dependente de triptofano (FIGURA 16). A produção de AIA pela bactéria talvez possa explicar os genes com expressão diferencial da planta que são regulados por auxina envolvidos no desenvolvimento da raiz. Auxina tem sido reportado como uma das principais causas da mudança na morfologia das raízes de plantas inoculadas com *A. brasilense ,* que por sua vez pode ser responsável por uma melhora na captação de minerais pela planta (JAIN; PATRIQUIN, 1985; KAPULNIK et al., 1985; OKON; KAPULNIK, 1986).

TABELA 7- PROTEÍNAS DO *A. brasilense* ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE AUXINA

ID	Gene	Peptídeos	Descrição
gi|392381453	ipdC	1	indole-3-pyruvate decarboxylase
gi|392382149	trpC	1	indole-3-glycerol-phosphate synthase
gi|392382150	trpD	1	anthranilate phosphoribosyltransferase
gi|392382151	trpG	1	aminodeoxychorismate synthase, subunit I]

FONTE: O AUTOR (2016)

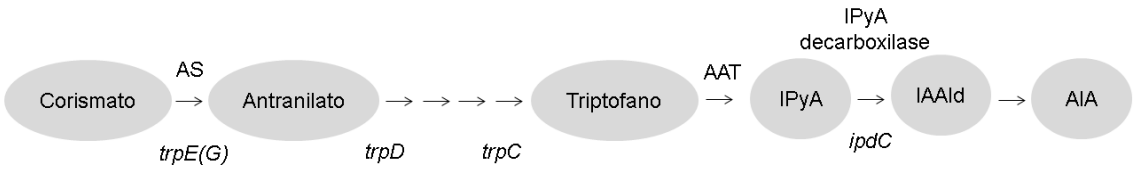


Figura 17- VIA BIOSINTÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOLACÉTICO EM *A. brasilense* .
FONTE: STEENHOUDT; VANDEREYDEN (2000)
NOTA: IPyA, ÁCIDO INDOL-3-PIRUVICO IAAld, INDOL-3-ACETALDEÍDO; AIA, ÁCIDO INDOLACÉTICO; AS, ANTRANILATO SINTASE; AAT, AMINO ÁCIDO AROMATICO AMINOTRANSFERASE.

A associação entre *Azospirillum*-planta apenas pode ter sucesso se a bactéria estiver apta a sobreviver no solo e conseguir colonizar o hospedeiro com uma grande população (STEENHOUDT; VANDEREYDEN, 2000). A planta cria um gradiente de nutrientes de exsudato na rizosfera diminuindo com o seu afastamento. Assim a motilidade e quimiotaxia habilitam a bactéria a mover-se em direção a planta onde pode beneficiar-se do exsudato da raiz como fonte de carbono e energia e assim podendo contribuir com o crescimento da planta (STEENHOUDT; VANDEREYDEN, 2000). Sendo assim, foram encontradas proteínas relatadas como necessárias para o primeiro passo de interação com a planta, com funções de motilidade para montagem do flagelo, quimiotaxia, adesão, formação de biofilme como exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) (TABELA 2 – ANEXOS).

A proteínas *sbpA* identificadas nas proteínas do *A. brasilense* é muito similar a ChvE de A*grobacterium tumefaciens* e é envolvida na captação de D-galactose e funções de quimiotaxia em *A. brasilense* a diversos açucares como D-fucose, L-arabinose e D-galactose (VAN BASTELAERE et al., 1999). Isso sugere um passo inicial na interação com a planta e função conservada em diferentes bactérias (STEENHOUDT; VANDEREYDEN, 2000). Além de *sbpA* outro fator envolvido na via de transdução de sinal importantes para a quimiotaxia é a proteína de membrana aceptora de sinal MCP e proteínas do

citosol como CheA, CheR, CheW e CheY foram identificadas (HAZELBAUER *et al.*, 2008). A quimiotaxia não apenas requer quimo-atacantes, depende também da motilidade da bactéria, foram encontradas proteínas para a montagem do fagelo como Laf1, flaF, FlgE, FliX e flgK, o flagelo é a primeira estrutura que entra em contato com a célula vegetal, sendo responsável pelo movimento em resposta a quimiotaxia em direção a planta (REINHOLD, HUREK e FENDRIK, 1985, (STEENHOUDT; VANDEREYDEN, 2000). Tem sido sugerido que o ancoramento da bactéria depende da produção de lipopolissacarídeos (LPS), exopolissacarídeos (EPS), polissacarídeos capsulares (CPS) e flagelos laterais. Foram identificadas diversas proteínas relacionadas a adesão e formação de biofilme bacteriano como OmaA, gauU, glmU, glmS, lpxA, ExoP, ExoM, lectin-like, exoC e exoB. Lectin-like são proteínas que estão envolvidas no reconhecimento e colonização da superfície da raiz. A proteína OmaA pode interagir com EPS conduzindo agregação e floculação da bactéria (BURDMAN et al., 2001). Pode ser observado na figura 17 um esquema de como todas essas proteínas encontradas podem estar atuando na quimiotaxia, ancoramento, adesão e estabelecimento nas raízes de arroz por *A. brasilense.*

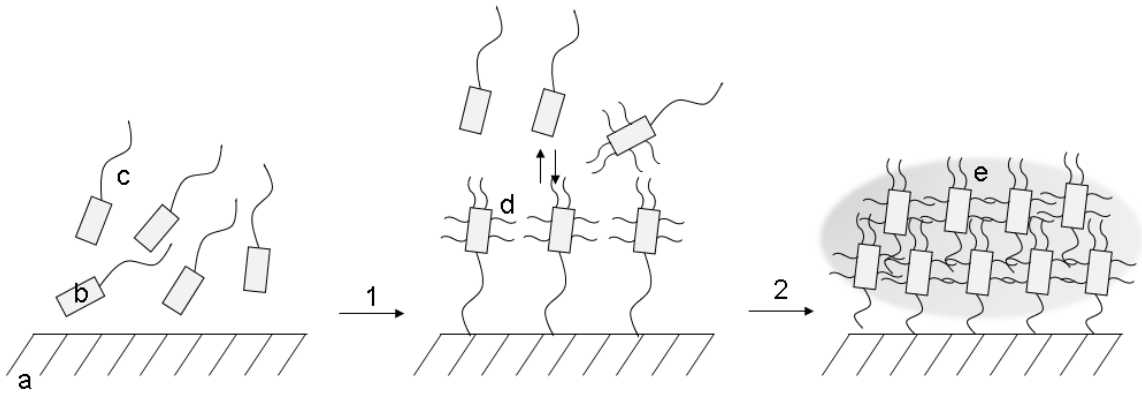


FIGURA 18 -MOTILIDADE, QUIMIOTAXIA E FORMAÇÃO DE BIOFILME NA SUPERFICIE DA RAIZ DA PLANTA. (1) REPRESENTA A QUIMIOTAXIA E A MOTILIDADE COM AUXILIO DO FLAGELO POLAR, (2) ANCORAMENTO E ADESÃO DA BACTÉRIA COM AUXILIO DE EPS, LPS E CPS A SUPERFICIE DA RAIZ.
AUTOR: MODIFICADO DE STEENHOUDT; VANDEREYDEN (2000)
NOTA: (a) SUPERFICIE DA RAIZ; (b) *A. brasilense* FP2; (c) FLAGELO POLAR; (d) FLAGELO LATERAL; (e) BIOFILME, EPS, LPS E CPS.

7. CONCLUSÕES

A. brasilense FP2 pode colonizar as raízes de arroz cv. Nipponbare e se manter estável com uma população de ~10^8 células por gramas de raiz a partir de 3 DAI até pelo menos 7 DAI.

A análise proteômica por LC-MS/MS das raízes de arroz inoculadas e não inoculadas com *A. brasilense* FP2 possibilitou identificar 6.158 proteínas, entre elas proteínas que podem estar regulando o ciclo celular e/ou promovendo remodelamento das raízes do arroz, essas proteínas estão relacionadas com o aumento da raiz e proliferação celular e são responsivas a hormônios vegetais como auxina.

A. brasilense FP2 induz uma resposta sistêmica, induzindo a expressão diferencial de várias proteínas ligadas a estímulos bióticos e abióticos, isso pode conferir a planta um sistema imune mais robusto, frente as adversidades encontradas no ambiente como patógenos ou estresse abióticos.

A. brasilense FP2 não possui o gene que codifica para ACC deaminase, reconhecida como importante para o mecanismo de promoção do crescimento vegetal através da redução dos níveis de etileno nas raízes, e foi mostrado que a presença desta bactéria não altera os níveis de etileno na associação com arroz cv. Nipponbare.

A. brasilense FP2 aderido à raiz de arroz está expressando proteínas do metabolismo de fixação de nitrogênio, sendo possível detectar atividade da enzima nitrogenase, foi possível ainda identificar acumulo de grânulos de PHB e redução de níveis de ERO

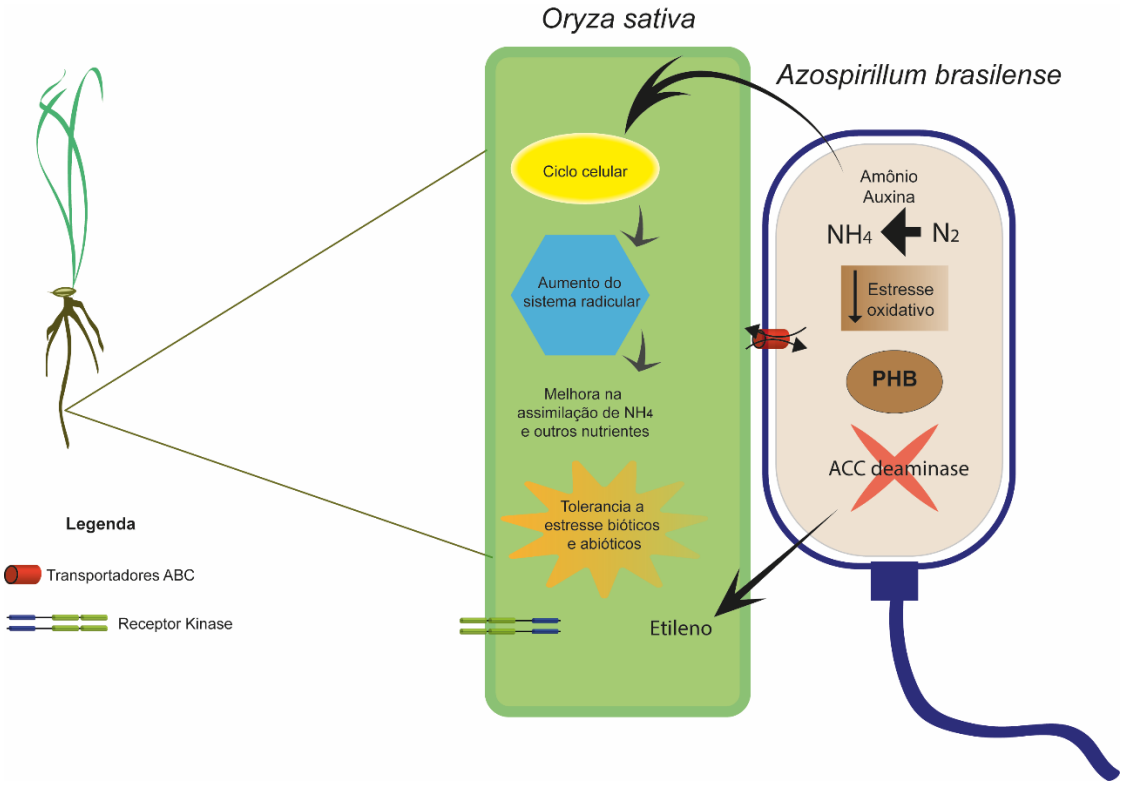


FIGURA 19 – POSSIVEIS EFEITOS OBSERVADOS EM ENSAIOS BIOLÓGICOS E MOLECULARES DA ASSOCIAÇÃO DE *A. BRASILENSE* FP2 A RAÍZES DE ARROZ CV. NIPPONBARE.
FONTE: O AUTOR

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiol Res**; 163:173–81, 2008

ALBAN, A.; DAVID, S. O.; BJORKESTEN, L.; ANDERSSON, C.; LEWIS, S; CURRIE, I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. **Proteomics**, 3, 36–44, 2003.

ALBERTON, D.; MÜLLER-SANTOS, M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; et al. Comparative proteomics analysis of the rice roots colonized by *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 reveals induction of the methionine recycling in the plant host. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 11, p. 4757–68, 2013.

APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction**. Plant Physiology**, v. 90, n. 1, p. 109–16, 1989

ARAÚJO, L. M.; BAURA, V. A.; SOUZA, E. M.; BENELLI, E. M.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. In vitro uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-signal transducing GlnZ protein. **Protein. Expr. Purif.**, v.33, p.19-24, 2004.

ARGUISSAIN, G. G.; PIRCHI, H. J.; PERTICARI, A.; et al. Plant-Growth Promotion of Argentinean Isolates of *Azospirillum brasilense* on Rice (Oryza sativa L) Under Controlled and Field Conditions. American-Eurasian **Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 13, n. 10, p. 1361–1369, 2013.

ARSENE, F.; KAMINSKI, A; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain.**J. Bacteriol**. v. 178, p. 4830–4838, 1996.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 84–93, 2009. Elsevier Inc

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol Lett.**, 32, 1559–1570, 2010.

BACILIO, M.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. Alleviation of noxious effects of cattle ranch composts on wheat seed germination by inoculation with *Azospirillum* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 4, p. 261–266, 2003.

BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant,**

Cell and Environment, v. 32, n. 6, p. 666–681, 2009.

BADRI, D. V.; WEIR, T. L.; VAN DER LELIE, D.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 642–650, 2009.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485–491, 2000.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum* - plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BASHIR, K.; HANADA, K.; SHIMIZU, M.; et al. Transcriptomic analysis of rice in response to iron deficiency and excess. **Rice**, v. 7, n. 1, p. 18, 2014.

BASS, D.A., PARCE, J.W., DECHATELET, L.R., SZEJDA, P., SEEDS, M.C. AND THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded re- sponse to membrane stimulation. **J. Immunol**, 130, 1910, 1983.

BEIJERINCK, M. W. Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. II Abt.,** 63 : 353-359, 1925.

BELIMOV, A. A.; DIETZ, K. J. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. **Microbiological research**, v. 155, n. 2, p. 113–121, 2000.

BERG G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: per-spectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Appl **Microbiol Biotechnol**, 84:11–8, 2009.

BOERJAN, W.; CERVERA, M. T.; DELARUE, M.; et al. Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. **The Plant cell**, v. 7, n. 9, p. 1405–1419, 1995.

BL, B.; CLARKE, D. J.; WOLFF, M.; et al. UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. **Nature structural & molecular biology**, v. 8, n. 5, p. 417–422, 2001.

BLOEMBERG, G.; LUGTENBERG, B. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr Opin Plant Biol 4:343–350**. Curr Opin Plant Biol,** v. 4, p. 343–350, 2001.

BOERJAN, W.; CERVERA, M. T.; DELARUE, M.; et al. Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. **The Plant cell**, v. 7, n. 9, p. 1405–1419, 1995.

BOISSON-DERNIER, A.; KESSLER, S. A.; GROSSNIKLAUS, U. The walls have ears: The role of plant CrRLK1Ls in sensing and transducing extracellular signals. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 5, p. 1581–1591, 2011.

BOONBURAPONG, B.; BUABOOCHA, T. Genome-wide identification and analyses of the rice calmodulin and related potential calcium sensor proteins. **BMC plant biology**, v. 7, p. 4, 2007.

BOUCHÉ, N.; YELLIN, A.; SNEDDEN, W. A.; FROMM, H. Plant-Specific Calmodulin-Binding Proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 435–466, 2005.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREWIN, N. J. Tissue and cell invasion by Rhizobium: the structure and development of infection threads and symbiosomes. See Ref. 160, pp. 347–60.

BUCHANAN, A. G. and H. LEES. Superoxide dismutase froM nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* purification, characterization and intracellular location. **Can.J. Microbiol**, 26: 441 -447, 1980.

BURDMAN, S.; DULGUEROVA, G.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 14, n. 4, p. 555–561, 2001.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. **Journal of Biology Chemistry**, v. 266, p. 9339-9342, 1991.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.

CAMILIOS-NETO, D.; BONATO, P.; WASSEM, R.; et al. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC genomics**, v. 15, p. 378, 2014.

CANTAREL, B. I.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 233–238, 2009.

CAO, S.; XU, Q.; CAO, Y.; et al. Loss-of-function mutations in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in Arabidopsis. **Physiologia Plantarum**, v. 123, n. 1, p. 57–66, 2005.

CASIMIRO, I. Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. **The Plant Cell Online**, v. 13, n. 4, p. 843–852, 2001.

CHAKRABARTY, D.; TRIVEDI, P. K.; MISRA, P.; et al. Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. **Chemosphere,** v. 74, n. 5, p. 688–702, 2009. Elsevier Ltd.

CHEN, G. Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 4, p. 304–313, 2002.

CHEN, G. Discordant Protein and mRNA Expression in Lung Adenocarcinomas. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 4, p. 304–313, 2002.

CHEN, L.; SHINDE, U.; ORTOLAN, T. G.; MADURA, K. Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly**. EMBO Reports**, v. 2, n. 10, p. 933–938, 2001.

CHI, Y. H.; PAENG, S. K.; KIM, M. J.; et al. Redox-dependent functional switching of plant proteins accompanying with their structural changes. **Frontiers in plant science,** v. 4, n. July, p. 277, 2013.

CLARA, W.; ES, R. K.; IC, C. H. X.; KNOWLES, R.; KNOWLES, R. Superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in ammonium-grown and nitrogen- fixing *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 1222-1228, 1984.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–72, 2008.

COX, J.; MANN, M. 1D and 2D annotation enrichment : a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. Suppl 16, p. S12, 2012. BioMed Central Ltd.

COX, J.; MANN, M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 273–299, 2011.

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; III, J. R. Y. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. December, p. 991–1000, 2007.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. *Azospirillum* inoculation in pre-germinating wheat seeds. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 83–86, 1996.

DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. **Annu. Rev. Biochem.,** 73: 241–268, 2004.

DE ZAMAROCZY, DELORM, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of glnB and glnA in *Azospirillum brasilense.* **Mol. Gen. Genet**., v. 224, p.421-430, 1990.

DE ZAMAROCZY, M. Structural homologues PII and Pz of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol**., v. 29, p.449-463, 1998.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional Organization of the glnB-glnA Cluster of Azospirillum brasilense**. J. Bacteriol**., v.175, p. 2507-2515,1993.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense***. J. Bacteriol**., v.178, p.4143-4149, 1996.

DEKHIL, B. S.; CAHILL, M.; STACKEBRANT, E.; SLY, L. I. Tranfer of *Conglomeromonas largomibilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. Nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *paroensis* to the new type species of *Conglomeromonas*. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.20, p.72-77, 1997.

DEREVYANCHUK, M.; LITVINOVSKAYA, R.; KHRIPACH, V.; KRAVETS, V. Brassinosteroid-induced de novo protein synthesis in *Zea mays* under salinity and bioinformatic approach for identification of heat shock proteins. **Plant Growth Regulation,** 2015. Springer Netherlands

DIXON, R.; KHAN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nature Reviews**, v.2, p.621-631, 2004.

DOBBELAERE, S. et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Functional Plant Biology**, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.J. (Eds). Intl. Symp. **Nitrogen Fixation**. Pullman: USA: Washington Univ. Press, v.2, p.518-538, 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. **Science Tech**, 1987.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212–217, 2006.

DU, L.; JIAO, F.; CHU, J.; et al. The two-component signal system in rice (Oryza sativa L.): A genome-wide study of cytokinin signal perception and transduction. **Genomics**, v. 89, n. 6, p. 697–707, 2007.

EADY, R. R.; SMITH, B. E. Physico-chemical proprieties of nitrogenase and its components. In A treatise on dinitrogen fixation. Edited by: R. W. F. Hardy, F.Bottomley, and R. C. Burns. John Wiley & Sons, Inc.,New York. p. 390-490,

1979.

ECKER, J. R.; DAVIS, R. W. Plant defense genes are regulated by ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 15, p. 5202–5206, 1987.

ECKERT, B., WEBER, O. B., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M., HARTMANN, A. *Azospirillum doebereinerae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 51, n. 1, p.17-26, 2001.

FANG, H.; MENG, Q.; XU, J.; et al. Knock-down of stress inducible OsSRFP1 encoding an E3 ubiquitin ligase with transcriptional activation activity confers abiotic stress tolerance through enhancing antioxidant protection in rice. **Plant Molecular Biology,** v. 87, n. 4-5, p. 441–458, 2015.

FANG, Y.; LIAO, K.; DU, H.; et al. A stress-responsive NAC transcription factor SNAC3 confers heat and drought tolerance through modulation of reactive oxygen species in rice**. Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 21, p. 6803–6817, 2015.

FARMER, L. M.; BOOK, A. J.; LEE, K.-H.; et al. The RAD23 family provides an essential connection between the 26S proteasome and ubiquitylated proteins in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 22, n. 1, p. 124–142, 2010.

FEETHAM, M. C.; HANLON, W. A.; LINSELEY, P. S.; et al. Integrated Genomic and Proteomic Analyses of Gene Expression in Mammalian Cells. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 3, n. 10, p. 960–969, 2004.

FOYER, C. H.; LOPEZDELGADO, H.; DAT, J. F.; SCOTT, I. M. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum,** v. 100, n. 2, p. 241–254, 1997.

FRIDDOVICH I. Oxygen is toxic: The biology of oxygen radicals Bioscience, **Science** (Washington, D.C.), 201, 875-880, 1978.

FUKUZAKI, E. Application of Metabolomics to High Resolution Phenotype Analysis. , v. 8, p. 2013, 2013.

GAO, F.; CHEN, J.; MA, T.; et al. The glutathione peroxidase gene family in thellungiella salsuginea: Genome-wide identification, classification, and gene and protein expression analysis under stress conditions. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 15, n. 2, p. 3319–3335, 2014.

GALLON J. K. The oxygen sensitivity of Nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. **Trends Biochem**. Sci. 6: 19-23, 1981.

GE, L.; CHEN, H.; JIANG, J.-F.; et al. Overexpression of OsRAA1 Causes Pleiotropic Phenotypes in Transgenic Rice Plants, including Altered Leaf, Flower,

and Root Development and Root Response to Gravity. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1502–1513, 2004.

GLICK B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 41, no. 2, pp. 109–117, 1995.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications**. Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens**. Biotechnology Advances**, v. 15, n. 2, p. 353–378, 1997.

GLICK, B.; PENROSE, D.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of theoretical biology**, v. 190, n. 1, p. 63–8, 1998.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; et al. The Challenge of Food Security. **Science**, v. 327, n. February, p. 812, 2012.

GOFF, S. A. A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica). **Science**, v. 296, p. 92–100, 2002.

GRAHAM, P. H.; VANCE C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crop Res,** 65: 93–106, 2000.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C.P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, v. 131, p. 872-877, 2003.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p. 39-63, 2002.

GUO, H.; LI, L.; YE, H.; et al. Three related receptor-like quinases are required for optimal cell elongation in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 106, n. 18, p. 7648–7653, 2009.

HALLIWELL, B. Free radical, oxygen toxicity and aging. In Age pigments. Edited by R. S**. Sohal. Elsevier North-Holland**, Inc., New York. p. 1-62, 1981.

HAN, S. O.; NEW, P. B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, v. 36, n. 2, p. 193–201, 1998.

HELMAN, Y.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Plant growth promotion by rhizosphere 120 bacteria through direct effects. In: ROSENBERG, E. e GOPHNA, U. (Ed.). Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms. **Berlin Springer- Verlag,** p.89–103, 2011.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 347, 1950.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I. EL; TOILLON, R. A.;

BOURHIS, X. LE. Proteomics of breast cancer: The quest for markers and therapeutic targets. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 4, p. 1403–1411, 2008.

HOPFNER, K.-P., KARCHER, A., SHIN, D.S., CRAIG, L., ARTHUR, L.M., CARNEY, J.P., AND TAINER, J.A. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC - ATPase superfamily. **Cell**, 101: 789–800, 2000.

HU, J.; DONG, G.; FANG, Y.; et al. A New-Nipponbare Rice Germplasm with High Seed-Setting Rate. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 41, n. 10, p. 549–552, 2014.

HU, Q.; NOLL, R. J.; LI, H.; et al. The Orbitrap: A new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 4, p. 430–443, 2005.

HUERGO, L. F.; MERRICK, M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; ARAUJO, L. M.; SOUZA, E. M. Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and the nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria. **Mol. Microbiol.,** v.66, p.1523-1535, 2007.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Regulation of glnB gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiol. Lett**., v.223, p.33-40, 2003.

HUERGO, L. F; FILIPAKI, A.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Effects of the PII and PZ proteins over-expression in the nitrogen metabolism of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett**., v. 253, p.47-54, 2005.

J. M. LYNCH, ED., The Rhizosphere, Wiley-Interscience, Chich- ester, UK, 1990.

JAIN, D. K.; PATRIQUIN, D. G. Characterization of a substance produced by Azospirillum which causes branching of wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 206–210, 1985.

JAKOBY, M.; WEISSHAAR, B.; DRGE-LASER, W.; et al. bZIP transcription factors in Arabidopsis. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 3, p. 106–111, 2002.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. E DOBEREINER, J. Herbaspirillum, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of Sorghum bicolor L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.785-797, 1997.

JOFRÉ, E.; SONIA FISCHER; VIVIANA RIVAROLA; HÉCTOR BALEGNO; MORI, G. Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 416–422, 1998.

JOHN, L. C.; GRISAFI, P. L.; FINK, G. R. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. **Genes Dev.,** p. 2131–2142, 1995.

JUNG, K. H.; AN, G. Application of MapMan and RiceNet drives systematic analyses of the early heat stress transcriptome in rice seedlings. **Journal of Plant Biology,** v. 55, n. 6, p. 436–449, 2012.

JUNG, K. H.; HAN, M.; NGUYEN, V. N. T.; et al. Development of Defense Signaling Pathways Against Bacterial Blight Disease in Rice Using Genome-Wide Transcriptome Data**. Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 7, p. 48–111, 2014.

KADOURI, D. et al. Identification and isolation of genes involved in poly (betahydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phbC mutant. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 6, p. 2943-9, Jun 2002.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization Involvement of the Reserve Material Poly- ᴺᴸ -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. **Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244–3250, 2003.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization Involvement of the Reserve Material Poly- ᴺᴸ -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. **Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244–3250, 2003.

KAMINSKI, PA.; BATUT, J.; BOISTARD, P. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. See Ref. 160, pp. 431–460. 1998.

KANIA, T.; RUSSENBERGER, D.; PENG, S.; APEL, K.; MELZER, S. FPF1 promotes flowering in Arabidopsis. **The Plant cell**, v. 9, n. 8, p. 1327–38, 1997.

KAPULNIK, Y.; FELDMAN, M.; OKON, Y.; HENIS, Y. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. **Soil Biol. Biochem**. 17, 509-515, 1985.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 881–887, 1985.

KAWAHARA, Y.; DE LA BASTIDE, M.; HAMILTON, J. P.; et al. Improvement of the Oryza sativa Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. **Rice** (New York, N.Y.), v. 6, n. 1, p. 4, 2013.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 39. **Int. J. Syst. Bacteriol**. 41 : 580-581, 1991.

KIM, M. C.; CHUNG, W. S.; YUN, D.-J.; CHO, M. J. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. **Molecular plant,** v. 2, n. 1, p.

13–21, 2009.

KLASSEN, G.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; RIGO, L.U. Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the GlnB nitrogen signaltransducing protein. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 71, p. 5637–5641, 2005.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: PHYTO-BACTERIOLOGIE, S. D. P. V. E., Proceedings of the IVth **International Conference on Plant Pathogenic Bacteria** p.879-882, 1978.

KOTTAPALLI, K. R.; SATOH, K.; RAKWAL, R.; et al. Combining in silico mapping and arraying: an approach to identifying common candidate genes for submergence tolerance and resistance to bacterial leaf blight in rice. **Molecules and cells,** v. 24, n. July, p. 394–408, 2007.

KUMAR, V.; SINGH, A.; MITHRA, S. V. A.; et al. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (Oryza sativa). **DNA Research**, v. 22, n. 2, p. 133–145, 2015.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **Int J. Syst. Evol. Microbiol.** 60 (Pt 12): 2832-2837, 2010.

LEE, S. J.; BÖHM, A.; KRUG, M.; AND BOOS, W. The ABC of binding-protein-dependent transport in Archaea. **Trends Microbiol**, 15: 389–397, 2007.

LIN, S. Y.; LIU, Y. C.; HAMEED, A.; HSU, Y. H.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 63 (Pt 10): 3762-8, 2013.

LIN, S. Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B., CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 59 (Pt 4): 761-765, 2009.

LINK, A. J.; ENG, J.; SCHIELTZ, D. M.; et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 676 - 682, 1999.

LIVAK, J. K.; SCHIMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2ΔΔCT Method. **Methods**, v.25, p. 402 - 408, 2001.

LU, Z.; YU, H.; XIONG, G.; et al. Genome-Wide Binding Analysis of the Transcription Activator IDEAL PLANT ARCHITECTURE1 Reveals a Complex Network Regulating Rice Plant Architecture. **Plant Cell**, v. 25, n. October, p. 3743–3759, 2013.

LUCY M.; REED E.; GLICK B. R. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek,** 86:1–25, 2004.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; AND PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylene-diamine. **Can. J. Microbiol**, 37, 549–553, 1991.

MACKAY, V. L.; LI, X.; FLORY, M. R.; et al. Gene Expression Analyzed by High-resolution State Array Analysis and Quantitative Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 5, p. 478–489, 2004.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic**. Microbiol Mol Biol Rev**, v. 63, n. 1, p. 21-53, Mar 1999.

MAGALHAES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. Bras. Cien**., 55: 417-430, 1983.

MAGALHAES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 15. **Int. J. Syst. Bacteriol.,** 34 : 355-357, 1984.

MAJOVSKY, P.; NAUMANN, C.; LEE, C. W.; et al. Targeted proteomics analysis of protein degradation in plant signaling on an LTQ-Orbitrap mass spectrometer. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 10, p. 4246–4258, 2014.

MAKAROV, A.; DENISOV, E.; KHOLOMEEV, A.; et al. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 7, p. 2113–2120, 2006.

MANN, M.; KELLEHER, N. L. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 47, p. 18132–18138, 2008.

MANTELIN S.; TOURAINE B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **J. Exp. Bot.**, 55:27–34, 2004.

MASCARUA-ESPARZA, M. A.; VILLA-GONZALEZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant and Soil**, v. 106, n. 1, p. 91–95, 1988.

MAUCHLINE, T. H.; FOWLER, J. E.; EAST, A. K.; SARTOR, A. L.,; ZAHEER, R.; HOSIE, A. H. F.; et al. Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding proteindependent transportome. **Proc Natl Acad Sci USA** 103: 17933–17938, 2006.

MCCORMACK, A L.; SCHIELTZ, D. M.; GOODE, B.; et al. Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the

low-femtomole level. **Analytical chemistry**, v. 69, n. 4, p. 767–776, 1997.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,** 57: 620 – 624, 2007.

MEHTA, A.; BRASILEIRO, A. C. M.; SOUZA, D. S. L.; ROMANO, E.; CAMPOS, M. A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; SILVA, M. S.; FRANCO, O. L.; FRAGOSO, R. R.; BEVITORI, R.; ROCHA, T. L. Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? **FEBS Journal**, v. 275, p. 3731–3746, 2008.

MELZER, S.; KAMPMANN, G.; CHANDLER, J.; APPEL, K. FPF1 modulates the competence to flowering in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 18, n. 4, p. 395–405, 1999.

MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, M.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the nifL gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Gen. Genet**., v.185, p.75-81, 1982.

MÉSZÁROS, T.; MISKOLCZI, P.; AYAYDIN, F.; et al. Multiple cyclin-dependent quinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. **Plant molecular biology**, v. 43, n. 5-6, p. 595–605, 2000.

MEYER, Y.; GROSSET, J.; CHARTIER, Y. & CLEYETMAREL, J.C. Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody-production-antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. **Electrophoresis,** 9, 704-712, 1988.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; CASAGRANDE, J. T.; THOMAS, P. D. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nature**, v. 8, n. 8, p. 1551–1566, 2013.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; CASAGRANDE, J. T.; THOMAS, P. D. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nat. Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1551–1566, 2013.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; THOMAS, P. D. PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 377–386, 2013.

MICHALSKI, A.; DAMOC, E.; HAUSCHILD, J.-P.; et al. Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 10, n. 9, p. M111.011015, 2011.

MORENO-VIVIÁN, C.; CABELLO, P.; BLASCO, R.; et al. Prokaryotic Nitrate Reduction : Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases MINIREVIEW Prokaryotic Nitrate Reduction : Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6573–6584, 1999.

MORTENSON, L. E.; M. N. WALKER and G. A. WALKER. Effect of magnesium

di- and triphosphates on the structure and electron transport function of the components of clostridial nitrogenase. **Proc. Int. Symp. Nitrogen Fixation**. 1st. 1974, pp. 117-149, 1976.

MURPHY, J. P.; KONG, F.; PINTO, D. M.; WANG-PRUSKI, G. Relative quantitative proteomic analysis reveals wound response proteins correlated with after-cooking darkening. **Proteomics**, v. 10, n. 23, p. 4258–4269, 2010.

NASMYTH, K.; AND HAERING, C.H. The structure and function of smc and kleisin complexes. **Annu Rev. Biochem.,** 74: 595–648, 2005.

NJOLOMA, J.; TANAKA K.; SHIMIZU.T.; NISHIGUCHI, T.; ZAKRIA M.; AKASHI R.; OOTA M.; AKAO S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, p. 137–143, 2006.

OHYANAGI, H.; EBATA, T.; HUANG, X.; et al. OryzaGenome: Genome Diversity Database of Wild Oryza Species. **Plant and Cell Physiology**, v. 57, n. 1, p. e1–e1, 2016.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 90, n. 1-3, p. 3–16, 1986.

OLSEN, J. V.; SCHWARTZ, J. C.; GRIEP-RAMING, J.; et al. A Dual Pressure Linear Ion Trap Orbitrap Instrument with Very High Sequencing Speed. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2759–2769, 2009.

OPASSIRI, R.; POMTHONG, B.; AKIYAMA, T.; et al. A stress-induced rice (Oryza sativa L.) beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain. **The Biochemical journal**, v. 408, n. 2, p. 241–249, 2007.

PANKIEVICZ, V. C. S.; DO AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; et al. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907–919, 2015.

PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS genetics**, v. 7, n. 5, p. e1002064, 2011.

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nifA and ntrC (glnG) type genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 95-101, 1984.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol,** 56: 1263-1271, 2006.

PÉREZ-MONTAÑO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiol. Res.**, v. 169, n. 5-6, p. 325-36, May-Jun 2014.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR**. Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PFLÜGER-GRAU, K.; CHAVARRÍA, M.; DE LORENZO, V. The interplay of the EIIA(Ntr) component of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS(Ntr)) of Pseudomonas putida with pyruvate dehydrogenase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1810, n. 10, p. 995–1005, 2011.

POSTGATE, J. R.; CANNON, F. C. The molecular and genetics manipulation of nitrogen-fixation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 292 p. 589-599, 1981.

PRADET-BALADE, B.; BOULMÉ, F.; BEUG, H.; MÜLLNER, E. W.; GARCIA-SANZ, J. A. Translation control: Bridging the gap between genomics and proteomics? **Biochemical Sciences**, v. 26, n. 4, p. 225–229, 2001.

PRADET-BALADE, B.; BOULMÉ, F.; BEUG, H.; MÜLLNER, E. W.; GARCIA-SANZ, J. A. Translation control: Bridging the gap between genomics and proteomics? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 4, p. 225–229, 2001.

PRELL, J.; MULLEY, G.; HAUFE, F.; et al. The PTS Ntr system globally regulates ATP-dependent transporters in *Rhizobium leguminosarum*. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 117–129, 2012.

RAMADOSS, D.; LAKKINENI, V. K.; BOSE, P.; ALI, S.; ANNAPURNA, K. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 6, 2013.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen fixing organism with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int. J. Syst. Bacteriol**, 37: 43-51, 1987.

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

RUSSO, A.; VETTORI, L.; FELICI, C.; et al. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on Prunus cerasifera L. clone Mr.S 2/5 plants. **Journal of Biotechnology**, v. 134, n. 3-4, p. 312–319, 2008.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990.

SALLAUD, C.; LORIEUX, M.; ROUMEN, E.; et al. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. TAG. **Theoretical and applied genetics**. Theoretische und angewandte Genetik, v. 106, n. 5, p. 794–803, 2003.

SANDERS, D.; PELLOUX, J.; BROWNLEE, C.; HARPER, J. F. Calcium at the crossroads of signaling. **The Plant cell**, v. 14 Suppl, p. S401–S417, 2002.

SCHOENBORN, L.; YATES, P. S.; BRONWYN, E.; et al. Liquid Serial Dilution Is Inferior to Solid Media for Isolation of Cultures Representative of the Phylum-Level Diversity of Soil Bacteria Liquid Serial Dilution Is Inferior to Solid Media for Isolation of Cultures Representative of the Phylum-Level Divers. D **Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4363–4366, 2004.

SCHUHMANN, H.; HUESGEN, P. F.; ADAMSKA, I. The family of Deg/HtrA proteases in plants. **BMC plant biology**, v. 12, p. 52, 2012.

SHEN, C.; LI, D.; HE, R.; et al. Comparative transcriptome analysis of RNA-seq data for cold-tolerant and cold-sensitive rice genotypes under cold stress. **Journal of Plant Biology,** v. 57, n. 6, p. 337–348, 2014.

SHIONO, K.; YAMAUCHI, T.; YAMAZAKI, S.; et al. Microarray analysis of laser-microdissected tissues indicates the biosynthesis of suberin in the outer part of roots during formation of a barrier to radial oxygen loss in rice (*Oryza sativa*). **Journal of experimental botany**, 65(17):4795-806, 2014.

SKERMAN, V. B. D.; SLY, L. I.; WILLIAMSON, M. L. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 62. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 47: 915-916, 1997.

SKERMAN, V. B. D.; SLY, L. I.; WILLIAMSON, M. L. *Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a sodium-sensitive, mixed-flagellated organism from fresh waters. **Int. J. Syst. Bacteriol**. 33: 300-308, 1983.

SMIL V. Nitrogen in crop production. **Glob. Biogeol Cycl.**, 13: 647–662, 1999.

SNEDDEN, W. A.; FROMM, H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. **New Phytologist**, v. 151, n. 1, p. 35–66, 2001.

SOCOLOW RH. Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. Proc **Natl Acad Sci. USA**, 96: 6001–6008, 1999.

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p. 257-288, 2000.

STEENHOUDT, O.; VANDEREYDEN, J. *Azospirillum*, fee-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000.

STETS, M. I.; CAMPBELL ALQUERES, S. M.; SOUZA, E. M.; et al. Quantification of Azospirillum brasilense FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR**. Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700–6709, 2015.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the

Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species*, Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.967-980, 1978.

THAKORE Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Biotechnol**, 2:194–208, 2006.

TILAK, K. V. B. R.; KRISHNA MURTI, G. S. R. Nitrogen Fixation by Azospirillum spp. in Certain Saline and Saline-Alkali Soils of India. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, **der Technologie und des Umweltschutzes,** v. 136, n. 8, p. 641–643, 1981

TIMMUSK, S.; PAALME, V.; PAVLICEK, T.; et al. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. 1–7, 2011.

UMATE, P. Genome-wide analysis of thioredoxin fold superfamily peroxiredoxins in Arabidopsis and rice. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 12, p. 1543–1546, 2010.

UMEDA, M.; IWAMOTO, N.; UMEDA-HARA, C.; et al. Molecular characterization of mitotic cyclins in rice plants. Molecular **and General Genetics**, v. 262, n. 2, p. 230–238, 1999.

USADEL, B.; POREE, F.; NAGEL, A.; et al. A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: A case study in the crop species, Maize. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, n. 9, p. 1211–1229, 2009.

VALDAMERI, G.; KOKOT, T. B.; PEDROSA, F. DE O.; DE SOUZA, E. M. Rapid quantification of rice root-associated bacteria by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 237–241, 2015.

VAN ALST, N. E.; PICARDO, K. F.; IGLEWSKI, B. H.; HAIDARIS, C. G. Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3780–3790, 2007.

VAN BASTELAERE, E.; LAMBRECHT, M.; VERMEIREN, H.; et al. Characterization of a sugar-binding protein from Azospirillum brasilense mediating chemotaxis to and uptake of sugars**. Molecular Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 703–714, 1999.

VAN OOIJEN, G.; MAYR, G.; KASIEM, M. M. A; et al. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. **Journal of experimental botany,** v. 59, n. 6, p. 1383–1397, 2008.

VANCE, C. Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. **Plant Physiology**, v.

127, n. 2, p. 390397, 2001.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 0034, 2002.

VANDESOMPELE, J.; KUBISTA, M.; PFAFFL, M. M. W. Reference Gene Validation Software for Improved Normalization. **Real-time PCR: Current Technology and Apllications**, v. 4, p. 47–64, 2009.

VLIEGHE, K.; BEEMSTER, G. T. S.; MAGYAR, Z.; ANTONIO, J.; ACOSTA, T. The Plant-Specific Cyclin-Dependent Quinase CDKB1 ; 1 and Transcription Factor E2Fa-DPa Control the Balance of Mitotically Dividing and Endoreduplicating Cells in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 16, n. October, p. 2683–2692, 2004.

WANG, A.; LI, J.; ZHANG, B.; XU, X.; BEWLEY, J. D. Expression and location of endo-beta-mannanase during the ripening of tomato fruit, and the relationship between its activity and softening. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 15, p. 1672–1684, 2009.

WANG, D.; PAN, Y.; ZHAO, X.; et al. Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 149, 2011.

WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, p. 2782-2786, 2006.

WANG, X.; DINLER, B. S.; VIGNJEVIC, M.; JACOBSEN, S.; WOLLENWEBER, B. Physiological and proteome studies of responses to heat stress during grain filling in contrasting wheat cultivars. **Plant Science**, v. 230, p. 33–50, 2015. Elsevier Ireland Ltd.

WANG, Z. Q.; XU, X. Y.; GONG, Q. Q.; et al. Root proteome of rice studied by iTRAQ provides integrated insight into aluminum stress tolerance mechanisms in plants. **Journal of Proteomics**, v. 98, p. 189–205, 2014. Elsevier B.V

WIDJAJA, I.; NAUMANN, K.; ROTH, U.; et al. Combining subproteome enrichment and Rubisco depletion enables identification of low abundance proteins differentially regulated during plant defense. **Proteomics**, v. 9, n. 1, p. 138–147, 2009.

WINGLER, A. Interactions between flowering and senescence regulation and the influence of low temperature in Arabidopsis and crop plants. **Annals of Applied Biology,** v. 159, n. 3, p. 320–338, 2011.

WITHOLT, B.; KESSLER, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. **Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 279-285, 1999.

XIE, C. H., YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**., 55: 1435-1438, 2005.

WU, T.; YANG, C.; DING, B.; et al. Plant Physiology and Biochemistry Microarray-based gene expression analysis of strong seed dormancy in rice cv . N22 and less dormant mutant derivatives. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 99, p. 27–38, 2016. Elsevier Masson SAS.

XIE, C. H., YOKOTA, A. Azospirillum oryzae sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant Oryza sativa**. Int.J.Syst.Evol.Microbiol**. 55: 1435-1438. 2005.

XU, J.; LAN, H.; FANG, H.; et al. Quantitative Proteomic Analysis of the Rice (*Oryza sativa* L.) Salt Response. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0120978, 2015.

YAN, S.; ZHANG, Q.; TANG, Z.; SU, W.; SUN, W. Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Chilling Stress Responses in rice. **Mol. Cell. Proteomics**, p. 484–496, 2006.

YANG J.; KLOEPPER J. W.; RYU C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Plant Sci**. , 14:1–4, 2009.

YANG, P.; LI, X.; WANG, X.; et al. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. **Proteomics**, v. 7, n. 18, p. 3358–3368, 2007.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 11, p. 49–79, 2009.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, 13, 134, 2012.

YOUNG J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogenfixing organisms. In STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.). **Biological Nitrogen Fixation. London: Chapman; Hall**, New York, p. 43-86, 1992.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 58 (Pt 4): p.959-963. 2008.

YU, J.; CHEN, S.; WANG, T.; SUN, G.; DAI, S. Comparative proteomic analysis of Puccinellia tenuiflora leaves under Na2CO3 stress. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 14, n. 1, p. 1740–1762, 2013.

ZHANG, H.; KIM, M. S.; KRISHNAMACHARI, V.; et al. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. Planta, v. 226, n. 4, p. 839–851, 2007.

ZHANG, Y.; FENG, F.; HE, C. Downregulation of OsPK1 Contributes to Oxidative Stress and the Variations in ABA/GA Balance in Rice. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 4, p. 1006–1013, 2012.

ZHANG, Y.; YIN, H.; ZHAO, X.; et al. The promoting effects of alginate oligosaccharides on root development in *Oryza sativa* L. mediated by auxin signaling. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 446–454, 2014.

ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y.; YANG, G.; ZHUANG, L.; HU, P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,** 63 (Pt 7): 2618-24, 2013.

ANEXOS

TABELA - ANEXO 1 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COMO TRANSPORTADOR ABC DO *A. brasilense*

ID NCBI	Descrição
>gi|392382401	amino acid ABC transporter, substrate-binding component
>gi|392378344	putative spermidine/putrescine ABC transporter (substrate-binding component)
>gi|392380066	sugar ABC transporter, periplasmic-binding component
>gi|392382325	branched-chain amino acid ABC transporter,substrate-binding periplasmic component
>gi|392383070	short-chain amide or branched-chain amino acid ABC transporter;substrate-binding component
>gi|392380071	sugar ABC transporter;substrate-binding component
>gi|392380646	lysine/arginine/ornithine ABC transporter;periplasmic-binding component
>gi|392378796	dipeptide ABC transporter;periplasmic-binding component
>gi|392380777	spermidine/putrescine ABC transporter,substrate-binding component
>gi|392382049	putative ABC transporter;periplasmic substrate-binding component
>gi|392382440	putrescine ABC transporter, periplasmic binding protein
>gi|392383795	putative ABC transporter;substrate-binding component
>gi|392381951	putative ABC transporter;substrate-binding component
>gi|392380221	putative ABC transporter (substrate-binding protein)
>gi|392377678	putative branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic component
>gi|392377478	ABC transporter, substrate-binding component
>gi|392379722	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component
>gi|392380594	putative ABC transporter (substrate-binding protein)
>gi|392379972	putative spermidine/putrescine ABC transporter (Substrate binding protein)
>gi|392381438	putative ABC transporter substrate binding protein
>gi|392382323	leucine//isoleucine/valine ABC transporter,ATPase component
>gi|392382586	putative ABC transporter, ATP-binding protein with duplicated ATPase domains
>gi|392384510	putative sugar ABC transporter;substrate-binding periplasmic component
>gi|392383841	dipeptide ABC transporter, substrate-binding component
>gi|392382730	ABC transporter;periplasmic component
>gi|392383052	branched-chain amino acid ABC transporter,periplasmic substrate-binding component
>gi|392380519	sugar ABC transporter, substrate-binding component
>gi|392378156	putative ABC transporter, substrate-binding protein
>gi|392378262	sulfate/thiosulfate ABC transporter;periplasmic-binding component
>gi|392382197	putative ABC transporter, substrate-binding component
>gi|392378305	methionine ABC transporter, periplasmic-binding component
>gi|392377654	putative iron ABC transporter, fbpA-like periplasmic component
>gi|392382322	leucine/isoleucine/valine ABC transporter,ATPase component
>gi|392377461	amino acid ABC transporter, periplasmic solute-binding component
>gi|392383687	putative branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic component
>gi|392380976	putative branched-chain amino acid ABC transporter, periplasmic component
>gi|392380023	putative oligopeptide ABC transporter (substrate-binding protein)
>gi|392383066	short-chain amide or branched-chain amino acid ABC transporter;ATP-binding component
>gi|392382404	amino acid ABC transporter, ATP-binding component
>gi|392380072	sugar ABC transporter;ATP-binding component

>gi|392381988	putative ABC transporter, periplasmic ligand-binding component
>gi|392377481	putative spermidine/putrescine ABC transporter subunit;ATP-binding component
>gi|392380065	sugar ABC transporter, ATP-binding component (RbsA-like)
>gi|392377259	ABC transporter involved in Fe-S cluster assembly SufC, ATP-binding protein
>gi|392378005	glutamine ABC transporter;substrate-binding component
>gi|392379078	putative ABC transporter, substrate binding protein;possible branched chain amino acid binding protein
>gi|392383788	ABC transporter;substrate-binding component
>gi|392379312	putative ABC transporter (substrate binding protein)
>gi|392383076	putative ABC transporter, periplasmic component
>gi|392379894	putative peptide transporter subunit: periplasmic-binding component of ABC superfamily
>gi|392383067	short-chain amide or branched-chain amino acid ABC transporter;ATP-binding component
>gi|392381363	oligopeptide ABC transporter, periplasmic component
>gi|392382588	putative ABC transporter involved in resistance to organic solvents
>gi|392378175	putative ABC transporter, ATP-binding component
>gi|392383091	ABC transporter, substrate-binding component
>gi|392378310	D-methionine ABC transporter protein,periplasmic binding protein
>gi|392377203	putative oligopeptide transport protein (ABC superfamily, peri_bind)
>gi|392381364	oligopeptide ABC transporter, periplasmic component
>gi|392377482	putative spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein
>gi|392380962	high-affinity branched-chain amino acid ABC transporter (substrate-binding protein) (fragment), partial
>gi|392384450	branched chain amino acids ABC transporter;ATP-binding component
>gi|392377597	putative ABC transporter, ATP-binding protein with duplicated ATPase domains
>gi|392381978	ABC transporter;periplasmic substrate-binding component
>gi|392383089	ABC transporter, ATP-binding component
>gi|392379269	ABC transporter substrate binding protein

FONTE: O AUTOR (2016)

TABELA - ANEXO 2 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS DO *A. brasilense* , MOTILIDADE, QUIMIOTAXIA E BIOFILME

ID	gene	Peptídeos	descrição
			Montagem do flagelo
gi|392378761		27	putative flagellin
gi|392379767	Laf1	26	flagellin
gi|392381660	flaF	27	putative modulator of sintesys flagellin
gi|392379808	FlgE	3	flagellar hook protein
gi|392382967	FliX	1	flagellar assembly protein
gi|392377704	flgK	2	flagellar hook protein
gi|392377705	FlgK-like	2	putative flagellar hook-associated protein
			Quimiotaxia
gi|392380911	OmaA	13;1	major outer membrane protein
gi|392380066	sbpA	17	sugar ABC transporter, periplasmic-binding component
gi|392383138	mcp	2	methyl-accepting chemotaxis protein
gi|392383646	CheW	1	chemotaxis signal transduction protein
gi|392381901	mcp	3	putative methyl-accepting chemotaxis receptor/sensory transducer
gi|392378437	CheR	1	chemotaxis methyltransferase
gi|392378433	CheA	9	chemotaxis sensor histidine quinase
gi|392383215	CheY	5	chemotaxis response regulator

gi|392384520	CheY-like	2	putative response regulator
gi|392377791	CheY-like	2	two-component response regulator
gi|392380202	CheY-like	6	putative response regulator receiver
gi|392378779	CheY-like	9	putative response regulator
gi|392379906	ChvI	2	two-component transcriptional regulator
			EPS e LPS
gi|392380036	gauU	9	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
gi|392382622	glmU	3	fused UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphate/glucosamine-1-phosphate acetyl transferase
gi|392382621	glmS	8	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase
gi|392382132	lpxA	2	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase
gi|392383982	ExoP	5	succinoglycan biosynthesis transport protein
gi|392383978	ExoM	1	putative Succinoglycan biosynthesis protein
gi|392384550	Ros/MucR	3	putative transcriptional regulatory protein
gi|392380832	Ros/MucR	2	putative transcriptional regulator
gi|392382698	Ros/MucR	4	putative transcriptional regulator
gi|392382589	VacJ-like	3	putative VacJ-like lipoprotein
gi|392382583	lectin-like	2	conserved hypothetical protein;putative signal peptide;putative C-type lectin-like
gi|392380456	exoC	1	phosphomannomutase
gi|392383819	exoB	8	putative NAD-dependent epimerase/dehydratasen;putative UDP-glucose 4-epimerase

FONTE: O AUTOR (2016)