

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADELINE NEIVERTH CHAGAS

CULTIVO DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE
NITROGÊNIO E PRESENÇA DE *Herbaspirillum seropedicae*: UMA ABORDAGEM
PROTEÔMICA

PALOTINA

2020

ADELINE NEIVERTH CHAGAS

CULTIVO DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE
NITROGÊNIO E PRESENÇA DE *Herbaspirillum seropedicae*: UMA ABORDAGEM
PROTEÔMICA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia
Molecular da Universidade Federal do Paraná, Setor
de Palotina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Bioquímica e Biologia
Molecular.

Orientadora: Profª. Dra. Marise Fonseca dos Santos
Coorientadora: Profª. Dra. Adriana Silva Hemerly

PALOTINA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C433 Chagas, Adeline Neiverth
Cultivo de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) *in vitro* na ausência de nitrogênio e presença de *Herbaspirillum seropedicae*: uma abordagem proteômica / Adeline Neiverth Chagas – Palotina, 2020.
193f.

Orientadora: Marise Fonseca dos Santos
Coorientadora: Adriana Silva Hemerly
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

1. Deficiência de nitrogênio. 2. Interação planta-bactéria. 3. 1D-SDS-PAGE-LC-MS/MS. 4. Fluorescência da clorofila. I. Santos, Marise Fonseca dos, II. Hemerly, Adriana Silva. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 633.1

Ficha catalográfica elaborada por Liliane Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR - 33287015001P7

ATA Nº01

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA
MOLECULAR**

No dia trinta de outubro de dois mil e vinte às 14:00 horas, na sala virtual Canal Defesa de Tese Adeline, Vídeo Conferência Plataforma Teams da Microsoft 365 / UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **ADELINE NEIVERTH CHAGAS**, intitulada: *Cultivo de trigo (*Triticum aestivum* var. Ilini) in vitro na ausência de nitrogênio e presença de *Herbaspirillum seropedicae*: uma abordagem proteômica*, sob orientação da Profa. Dra. MARISE FONSECA DOS SANTOS. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MARISE FONSECA DOS SANTOS (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ADRIANA SILVA HEMERLY (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO), KADIMA NAYARA TEIXEIRA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FÁBIO ROGÉRIO ROSADO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MARINA KIMIKO KADOWAKI (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MARISE FONSECA DOS SANTOS, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

PALOTINA, 30 de Outubro de 2020.

Assinatura Eletrônica
09/11/2020 12:10:24.0
MARISE FONSECA DOS SANTOS
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
10/11/2020 20:05:36.0
ADRIANA SILVA HEMERLY
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

Assinatura Eletrônica
09/11/2020 14:36:50.0
KADIMA NAYARA TEIXEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
11/11/2020 14:55:33.0
FÁBIO ROGÉRIO ROSADO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
09/11/2020 10:48:22.0
MARINA KIMIKO KADOWAKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO
PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR - 33287015001P7

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ADELINE NEIVERTH CHAGAS** intitulada: **Cultivo de trigo (*Triticum aestivum* var. lini) *in vitro* na ausência de nitrogênio e presença de *Herbaspirillum seropedicae*: uma abordagem proteômica**, sob orientação da Profa. Dra. MARISE FONSECA DOS SANTOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 30 de Outubro de 2020.

Assinatura Eletrônica
09/11/2020 12:10:24.0

MARISE FONSECA DOS SANTOS
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
10/11/2020 20:05:36.0

ADRIANA SILVA HEMERLY

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

Assinatura Eletrônica
09/11/2020 14:36:50.0

KADIMA NAYARA TEIXEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
11/11/2020 14:55:33.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
09/11/2020 10:48:22.0

MARINA KIMIKO KADOWAKI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ)

Rua Pioneiro, 2153 Bloco da Direção - PALOTINA - Paraná - Brasil
CEP 85950-000 - Tel: (41) 3211-8529 - E-mail: pmbqbm@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 61035

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 61035

*À Deus e à meus filhos,
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

À coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM.

À UFPR, especialmente o laboratório LABIOGEN, por ceder espaço para minha pesquisa.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida no início do curso.

À COODETEC, por ceder as sementes.

À Universidade Paranaense (UNIPAR), Campus Umuarama, por ceder o laboratório e equipamentos para nossos experimentos e à professora Silvia Graciele Hulse de Souza que nos auxiliou.

Com muito carinho, à equipe da Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em especial a professora Russolina Benedeta Zingali, professor Dário Eluan Kalume, técnicos Ana Lúcia de Oliveira Carvalho e Augusto Vieira Magalhães por me receberem de braços abertos em seu laboratório. Por colaborarem com a execução das análises de espectrometria de massas. Por toda a paciência ao repassar os protocolos, por estarem sempre disponíveis quando precisei me ajudando prontamente. Carinho especial também à pós-doutoranda Marjolly Caruso Brígido, que me ensinou e auxiliou na confecção dos géis no período em que estive no Rio de Janeiro.

Ao Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), principalmente ao professor Ronaldo Mohana Borges e o técnico Eduardo de Souza Matos, por gentilmente abrirer as portas do seu laboratório e auxiliarem nas análises proteômicas feitas pelo Mascot Daemon, no início do doutorado.

À equipe do Laboratório de Proteômica Estrutural e Computacional do Instituto Carlos Chagas (FioCruz) de Curitiba, professor Paulo Costa Carvalho, Louise Ulrich Kurt, em especial ao Milan Avila Clasen. Que, por horas me auxiliaram oferecendo suporte na utilização do software PatternLab, passando inúmeras dicas, sempre dispostos a ajudar e a buscar soluções. Meu muito obrigado.

À minha Co-orientadora Adriana Silva Hemerly, por nos acompanhar mesmo distante.

Com carinho especial à minha Orientadora, Marise Fonseca dos Santos, pela confiança dedicada a mim, pelo apoio, pelas orientações, por não medir esforços quando eu precisei e por compreender minhas dificuldades.

À professora Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo por sempre colaborar quando necessário e por auxiliar nas análises estatísticas.

À professora Adriana Fiorini Rosado por gentilmente auxiliar nas análises de PCR e ao professor Fábio Rogério Rosado pelas várias sugestões.

Aos demais professores do programa que se dedicaram e ofertaram disciplinas maravilhosas, com muita qualidade. Em algumas circunstâncias, somente para mim, pois era a única discente do programa.

Aos colegas de pós-graduação com quem tive uma convivio intenso no laboratório, em especial Aline Snak, Sharlini Zago, Alessandro Augusto Gonzalez e Jussara Andréia Lunkes. Colegas estes, que hoje considero família, sempre presentes, inclusive nos momentos mais difíceis, daqueles em que se perde todo o experimento, mas precisa seguir em frente. Mostraram-me o verdadeiro significado das palavras amizade e companherismo.

Aos demais colegas da pós-graduação, que compartilhei muitos conhecimentos e momentos agradáveis durante as disciplinas.

À todos os alunos de iniciação científica e do Programa Voluntário Acadêmico (PVA) que me auxiliaram durante todos esses anos. Camila Gazolla Volpiano, Lorrana Verdi Flores, Alessandra Lima, Adriá Vieira Braun, Vinícius Dahm, Brenda Vilseque Fernandes, Hemilly Karini Rezende, Michely Karine Klein e Nicolý Karoline Klein. Tenho um carinho especial por todos, sempre presentes e preocupados com a qualidade dos experimentos. Com certeza os dias foram muito melhores com vocês. Tenho muito respeito e guardarei sua amizade com muito carinho.

Aos colegas de trabalho que compreenderam quando precisei ficar ausente e prontos a colaborar. Em especial Cleuza Aparecida da Rocha Montanucci, Mara Regina Zadinello, Marina Giombelli Rosenberger, Bruna Hart Ulsenheimer, Jéssica Cristhine Gallego e a Fernanda Cripa Saggin. Ao longo desses anos foram muitos momentos difíceis e me ajudaram a superar. Obrigada a todas, pela amizade, carinho e companherismo.

À minha família querida, onde estão os meus maiores mestres Pai e Mãe, irmãos e toda família adotada pelo casamento. Vocês me ensinaram através de seu exemplo as principais virtudes de um ser humano: humildade, honestidade e dedicação. Estarei sempre em dívida por todo o apoio, amor, carinho e compreensão que me deram durante esses anos e durante toda a minha vida. Sem vocês seria impossível enfrentar tudo o que eu enfrentei, dentro e fora do laboratório. Obrigada por confiarem em mim, até quando eu mesma acreditei que não fosse capaz.

Ao meu amado esposo Rafael Augusto Stefanovicz Chagas, que compartilhou cada sorriso meu e cada lágrima nesses anos. Que me apoiou, me deu a mão e me ajudou a levantar quando precisei. Sabe exatamente o que significa para mim, enfim, chegar ao fim dessa etapa.

Aos meus filhos amados Bernardo e Beatriz, que do ventre, têm me acompanhado nessa etapa final. A mamãe ama muito vocês dois.

E por fim, e mais importante, a Deus, meu senhor, em quem confio integralmente, pela orientação nas decisões, pelo sustento na dificuldade e por atender minhas orações. Por colocar todas essas pessoas no meu caminho e me mostrar a importância de cada uma delas, através dos desafios e alegrias que apareceram durante essa jornada. Por me mostrar que não estou só, e nada em nossas vidas acontece ao acaso. Que cada dificuldade a ser superada, não é maior do eu seja capaz de resolver, obrigada.

“O senhor é meu pastor e nada me faltará” (Salmo, 23:1)

RESUMO

O nitrogênio (N) é o principal determinante da produtividade para a cultura do trigo, sendo esse um dos maiores desafios da agricultura. O trigo está entre os cereais mais consumidos no mundo e sua produção no Brasil não atende a demanda nacional. A inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal, pode ser considerada uma ferramenta promissora na busca de uma agricultura sustentável e na diminuição de custos. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi investigar proteínas presentes nas folhas de trigo das cultivares CD104 e CD120 quando inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* para compreender a fisiologia da planta e do sistema fotossintético na ausência desse nutriente essencial ao seu desenvolvimento. Para obter as plantas em experimentos *in vitro*, sementes de trigo foram esterilizadas, pre-germinadas e transferidas para tubos de ensaio de vidro contendo meios de cultivo. Os controles experimentais, sem inóculo da bactéria, foram obtidos de plantas cultivadas no meio MS líquido sem (SN) e com (CN) fonte de nitrogênio. Após 24h, alguns tubos com meio SN receberam inóculo da bactéria (SNI) e todos os tubos foram mantidos em sala de cultivo a 24 °C e foto-período de 14 h de luz por 20 dias. Nenhum meio de cultura continha sacarose. As folhas foram tomadas para avaliar a massa seca e fresca, comprimento e produção de extrato de proteínas para realização de análise proteômica com base no fracionamento de proteínas por SDS-PAGE seguida de LC-MS/MS, tipo Q-TOF. Plantas intactas foram usadas para obtenção de índice de nitrogênio (NBI), clorofila (CHL), flavonoides, antocianinas e fluorescência da clorofila. As proteínas identificadas foram divididas de acordo com função em componentes celulares, processos biológicos e funções moleculares. A partir dos resultados, foi possível observar para as folhas da cv. CD120 que a bactéria promoveu incremento de NBI e CHL, e reduziu antocianinas. Houve também redução na extinção fotoquímica e não-fotoquímica a partir dos dados de fluorescência da clorofila. E apenas uma proteína foi identificada exclusivamente no tratamento SNI, sendo atribuída à proteção do fotossistema II (PSII). Enquanto as folhas da cv. CD104 obtidas do meio SNI, 5 proteínas foram relacionadas a fotossíntese e outras proteínas sugerem relação com respostas de hipersensibilidade e resistência a doenças em plantas, como a beta-1,3-glucanase. Ambas as cultivares, na ausência de nitrogênio (SN), apresentaram proteínas relacionadas ao metabolismo antioxidante, dentre elas a glutathione S-transferase. Os resultados sugerem que a ausência de nitrogênio é promotora de estresse nas plantas de trigo de ambas cultivares, porém a cv. CD120 é mais tolerante. É possível concluir que a interação com a bactéria *H. seropedicae* é genótipo dependente e que a presença da bactéria no meio induziu nas plantas diferentes respostas para mitigação do estresse da ausência de nitrogênio, sendo que para a cv. CD104 promoveu tolerância e a cv. CD120 obteve nitrogênio pela interação com a bactéria.

Palavras-chave: deficiência de nitrogênio, interação planta-bactéria, 1D-SDS-PAGE-LC-MS/MS, fluorescência da clorofila.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is the main determinant of wheat crop productivity, which is one of the biggest challenges in agriculture. Wheat is the most consumed cereal in the world and its production is not enough to meet consumption in Brazil. Inoculation with plant growth-promoting bacteria can be a promising tool in the search for sustainable agriculture and cost reduction. Therefore, the objective of this study was to investigate proteins present in the wheat leaves of cultivars CD104 and CD120 when inoculated with a diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* to understand the plant and photosynthetic system physiology in the absence of this essential nutrient for its development. To obtain the plants *in vitro* experiments, wheat seeds were sterilized, pre-germinated and transferred to glass test tubes containing medium. The experimental controls, without bacterial inoculum, were obtained from plants grown in MS liquid medium without (SN) and with (CN) nitrogen source. After 24h, some tubes of SN medium received bacterial inoculum (SNI) and all tubes were kept in a culture room at 24 °C and a 14-hour photoperiod of light for 20 days. Sucrose was not added to mediums. Leaves were harvested to evaluate dry and fresh mass, length, and production of protein extract for proteomics based on protein fractionation by SDS-PAGE followed by LC-MS / MS, type Q-TOF. Intact plants were used to obtain nitrogen index (NBI) and chlorophyll (CHL), flavonoids and anthocyanins, chlorophyll fluorescence. The identified proteins were distributed in different cellular components, biological processes, and molecular functions. From the results it was possible to observe the bacterium promoted the increase of NBI and CHL, reduced anthocyanins in leaves of cv. CD120 and the chlorophyll fluorescence data shown reduction in photochemical and non-photochemical extinction too. Only one protein was uniquely at this condition and it is attributed to protection of photosystem II (PSII). While the leaves of cv. CD104 from the SNI medium were observed 5 proteins related to photosynthesis and other proteins to hypersensitivity and diseases resistance responses, such as beta-1,3-glucanase. Both cultivars in the absence of nitrogen (SN) presented proteins related to antioxidant metabolism, among them glutathione S-transferase, although chlorophyll fluorescence data were not severely affected, proteomic data indicated cv. CD120 is more tolerant to nitrogen absence. It is possible to conclude interaction with the bacterium *H. seropedicae* is plant-genotype dependent and the presence of the bacteria is inducing different responses to mitigate plant stress in the medium without nitrogen source. There is evidence to conclude that cv. CD104 is achieving tolerance and cv. CD120 is obtaining nitrogen from interaction with the bacterium.

Keywords: nitrogen deficiency, plant-bacteria interaction, 1D-SDS-PAGE-LC-MS/MS, chlorophyll fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - IMAGEM DAS PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.	25
FIGURA 2 – MASSA FRESCA, SECA E COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.	26
FIGURA 3 - IMAGEM DE GEL AGAROSE DO PRODUTO DE PCR DE AMOSTRAS DE BACTÉRIA ORIUNDAS DO CO-CULTIVO COM VARIEDADES DE TRIGO.	28
FIGURA 4 - ÍNDICE DE NITROGÊNIO (NBI) E ÍNDICE DE CLOROFILA (CHL) DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.	29
FIGURA 5 - DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES E ANTOCIANINAS DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.	30
FIGURA 6 - IMAGEM DO PERFIL DE SDS-PAGE DESCONTÍNUO A 12% E CORADO COM COMASSIE BLUE COLOIDAL G-250.	33
FIGURA 7 - DIAGRAMA DE VENN GERADO A PARTIR DA ANÁLISE DOS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM PEPTÍDEOS ESPECÍFICOS, PELO SOFTWARE PATTERNLAB (V.4.1.1.18).	36
FIGURA 8 - ALINHAMENTO ENTRE SEQUÊNCIAS DE DUAS CISTEÍNAS (P38076) E (A0A3B6EB15) PRESENTE EM DOIS TRATAMENTOS DA CULTIVAR CD104, CN E SN, RESPECTIVAMENTE.	43
FIGURA 9 – ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD104 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO COM NITROGÊNIO (CN), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.	46
FIGURA 10 – ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD104 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SEM NITROGÊNIO (SN), A FUNÇÕES	

MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	47
FIGURA 11 – ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD104 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM BACTÉRIA (SNI), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	48
FIGURA 12 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD120 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO COM NITROGÊNIO (CN), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	62
FIGURA 13 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD120 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SEM NITROGÊNIO (SN), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES	63
FIGURA 14 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD120 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM BACTÉRIA (SNI), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	64
FIGURA 15 - IMAGENS DAS REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA OBTIDOS NO STRING V.11.0 A PARTIR DAS ID UNIPROT OBTIDAS DE FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD104 DOS TRATAMENTOS CN, SN, SNI, INTERSEÇÕES DE TRATAMENTOS CN&SN, SN&SNI E CN&SNI.	74
FIGURA 16 - IMAGENS DAS REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA OBTIDOS NO STRING V.11.0 A PARTIR DAS ID UNIPROT OBTIDAS DE FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD120 DOS TRATAMENTOS CN, SN, INTERSEÇÕES DE TRATAMENTOS CN&SN E CN&SNI.....	77

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

FIGURA SUPLEMENTAR 1 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD104 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS CN&SN , A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	186
FIGURA SUPLEMENTAR 2 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD104 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS SN&SNI , A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	187
FIGURA SUPLEMENTAR 3 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD104 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS CN&SNI , A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	188
FIGURA SUPLEMENTAR 4 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD104 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS CN&SN&SNI , A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.	189
FIGURA SUPLEMENTAR 5 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD120 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS CN&SN , A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	190
FIGURA SUPLEMENTAR 6 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD120 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS SN&SNI , A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.....	191
FIGURA SUPLEMENTAR 7 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD120 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA	

INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS CN&SNI , A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.	192
FIGURA SUPLEMENTAR 8 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD120 , PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS CN&SN&SNI , A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.	193

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, SUSCETIBILIDADE A DOENÇAS, TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E ÁREAS RECOMENDADAS PARA O PLANTIO DAS CULTIVARES DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CD104 E CD120.	15
TABELA 2 - FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA DE FOLHAS DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.	31
TABELA 3 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD104 PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS COM NITROGÊNIO (CN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.	37
TABELA 4 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD104 PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO (SN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.	39
TABELA 5 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD104 PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA (<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1) (SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.	41
TABELA 6 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD120 PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS COM NITROGÊNIO (CN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.	56
TABELA 7 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD120 PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM	

MEIO MS SEM NITROGÊNIO (SN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.....	59
---	----

TABELA 8 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD120 PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA (<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Smr1) (SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.....		61
---	--	----

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

TABELA SUPLEMENTAR 1 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD104 PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS COM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO (CN&SN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.....	126
TABELA SUPLEMENTAR 2 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD104 PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 (SN&SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.....	128
TABELA SUPLEMENTAR 3 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD104 PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS COM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 (CN&SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.....	130
TABELA SUPLEMENTAR 4 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD104 PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS COM NITROGÊNIO, SEM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 (CN&SN&SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.	131
TABELA SUPLEMENTAR 5 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD120 PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS COM	

NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO (CN&SN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.....	155
TABELA SUPLEMENTAR 6 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD120 PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 (SN&SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.....	
	157
TABELA SUPLEMENTAR 7 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD120 PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS COM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 (CN&SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.....	
	159
TABELA SUPLEMENTAR 8 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> var. Lini) CV. CD120 PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS COM NITROGÊNIO, SEM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 (CN&SN&SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.	
	161

LISTA DE ABREVIATURAS

m.f. – massa fresca

m.s. – massa seca

CV – Coeficiente de Variação

cv.(s) – Cultivar (es)

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase,

F_o – Fluorescência mínima da folha adaptada ao escuro

F_m – Fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro

F_v/F_m – Máxima eficiência quântica do PSII

F_v/F_o – Fluorescência mínima variável

F_v – Fluorescência variável

F_s – Estado estacionário da fluorescência na presença de luz

F_m' – Fluorescência máxima na presença da luz

ETR – Taxa de transporte aparente de elétrons

Y(II) – Rendimento quântico efetivo do PSII

Y(NO) – Extinção fotoquímica

Y(NPQ) – Extinção não-fotoquímica

NPQ – Extinção não-fotoquímica de “Stern-Volmer”

CHL – Clorofila

NBI – Índice de Nitrogênio

MF – *Molecular Function* (Função Molecular)

BP – *Biological Process* (Processo Biológico)

CC – *Cellular Component* (Componente Celular)

SN – Sem Nitrogênio

CN – Com Nitrogênio

SNI – Sem Nitrogênio Inoculado

LC – *Liquid Chromatograph* (Cromatografia Líquida)

ID(s) – Identidade/identificação(s) da(s) proteína(s)

Hits – Acertos

N – Nitrogênio

C – Carbono

PGPB – *Plant Growth Promoting Bacteria* (Bactérias promotoras de crescimento de plantas)

PGPR - *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas)

NUE - *Nitrogen Use Efficiency*

PNUE - *Photosynthetic Nitrogen Use Efficiency*

FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio

GOGAT – Glutamina -Oxoglutarato Aminotransferase

GS – Glutamina Sintetase

NR – Nitrato Redutase

CAT – Catalase

AC – Anidrase Carbônica

RuBisCO – Ribulose - 1,5 - Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase

GO – *Gene Ontology*

MS – *Mass Spectrometry/Mass Spectrom* (Espectro/Espectrometria de Massas)

IPP – Interação Proteína-Proteína IPP

MDH – Malato Desidrogenase

GST – Glutathione S-Transferase

Proteínas PR – *Pathogenesis Related Protein* (Proteínas Relacionadas à Patogenicidade)

ISR – *Induced Systemic Resistance* (Indução de Resposta Sistêmica)

HR – *Hypersensitivity Responses* (Respostas a Hipersensibilidade)

SAR – *Systemic Acquired Resistance* (Resistência Sistêmica Adquirida)

IST – *Induced Systemic Tolerance* (Tolerância Sistêmica Induzida)

ROS – *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

PSII – Fotossistema II

PSI – Fotossistema I

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1.1	A cultura do Trigo	3
1.1.2	Importância da adubação nitrogenada na cultura do trigo	5
1.1.3	Interação planta-bactéria.....	7
1.1.4	A bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	10
1.1.5	Estudos proteômicos.....	12
2	DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)	14
2.1	OBJETIVOS GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	OBTENÇÃO DE FOLHAS DE TRIGO DAS CV. CD104 E CD120 NAS CONDIÇÕES DO ESTUDO.....	15
3.1.1	Cultivo das plantas	15
3.1.2	Condições de crescimento bacteriano e preparo do inóculo	16
3.1.3	Confirmação molecular da espécie bacteriana.....	16
3.1.4	Delineamento experimental e análise estatística.....	17
3.1.5	Coleta de amostras	17
3.2	DETERMINAÇÃO DE CRESCIMENTO, MASSA FRESCA E MASSA SECA... 18	
3.3	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE NITROGÊNIO, CLOROFILAS, FLAVONOIDES E ANTOCIANINAS	18
3.4	FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA	18
3.5	ANÁLISE PROTEÔMICA	19
3.5.1	Extração de proteínas e fracionamento por SDS-PAGE descontínua.....	19
3.5.2	Tripsinização das frações separadas na SDS-PAGE descontínua	20
3.5.3	Separação e identificação dos peptídeos por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida	20
3.5.4	Identificação e análise de dados das proteínas em banco de dados	21
4	RESULTADOS.....	24
4.1	AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL	24
4.2	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE NITROGÊNIO, CLOROFILAS, FLAVONOIDES E ANTOCIANINAS	27

4.3	FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA	27
4.4	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	32
4.5	ANÁLISE PROTEÔMICA	33
4.5.1	Resposta da cv. de trigo CD104 nos diferentes tratamentos	35
4.5.2	Respostas da cv. de trigo CD120 nos diferentes tratamentos	53
4.5.3	Anotação e rede de interação proteína-proteína.....	68
5	DISCUSSÃO.....	78
5.1	AVALIANDO DADOS PROTEÔMICOS E FISIOLÓGICOS.....	79
5.2	DISCUSSÃO SOBRE MASSA FRESCA E SECA	93
5.3	ÍNDICE DE NITROGÊNIO (NBI) E CLOROFILA (CHL).....	94
5.4	ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA.....	95
6	CONCLUSÃO	101
7	REFERÊNCIAS	103
8	TABELAS SUPLEMENTARES.....	126
9	FIGURAS SUPLEMENTARES	186

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, instalou-se uma intensa preocupação em relação ao aumento da produtividade e estabilidade agrícola de longo prazo, devido ao aumento populacional previsto para 10 bilhões em 2050. Para suprir essa demanda, o aumento da produção agrícola até 2030, deveria alcançar a faixa de 60 a 110% em comparação a 2005 (BETTI *et al.*, 2016; BLOCH *et al.*, 2020; HENRY *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2020).

A produção de cereais de modo sustentável é a única forma de lidar no futuro com a redução de solos cultiváveis, a maior demanda por biocombustíveis, as mudanças climáticas, o uso prolongado e excessivo de fertilizante inorgânico que está acidificando o solo, a redução na fertilidade do solo e baixa eficiência no uso de nitrogênio (N) (BLOCH *et al.*, 2020; HENRY *et al.*, 2018; KARIM *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2018; SARMA *et al.*, 2017). Associado a esses desafios é importante compreender que as plantas, em geral, estão expostas a uma variedade de patógenos que afetam desfavoravelmente no aumento da produtividade (BERTINI *et al.*, 2019). Essas preocupações têm fomentado a busca por estratégias de manejo que venham manter a boa qualidade do solo e a sustentabilidade da produção agrícola futura.

Dentre os principais problemas enfrentados pelas culturas agrícolas, o estresse abiótico, causado por inúmeras adversidades ambientais, continua sendo um dos maiores desafios no manejo e prevenção da perda de safra em todo o mundo, resultando em perdas de rendimento médio de mais de 50% para as principais culturas a cada ano (GURURANI; VENKATESH; TRAN, 2015; KONG; OYANAGI; KOMATSU, 2010; SASI *et al.*, 2018). As plantas, como organismos sésseis, são continuamente expostas a essas condições de estresse, que impõem numerosos efeitos prejudiciais na sua fisiologia e que compromete sua produtividade (GURURANI; VENKATESH; TRAN, 2015).

Em meio a esses desafios, muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de conhecer as respostas de plantas de interesse agrícola e industrial, diante estresses abióticos causados por deficiência nutricional, seca, salinidade, alta e baixa temperatura, inundação e metais pesados (CUI *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2011; GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2020; KONG; OYANAGI; KOMATSU, 2010; KONOTOP *et al.*, 2012; MAHALINGAM, 2017; NEILSON; MARIANI; HAYNES, 2011; OKAMOTO; OKADA, 2004; YAO *et al.*, 2019).

Dentre as adversidades ambientais, um dos maiores desafios da agricultura, é fornecer N suficiente para às culturas de cereais, pois o crescimento e o desenvolvimento das plantas são altamente dependentes de N, sendo o principal determinante da produtividade da cultura. Compreendendo esse fator e que os cereais são responsáveis por 45% da energia alimentar

mundial consumida pelos humanos, além de ração para a agricultura animal e matéria-prima para biocombustíveis (BLOCH *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020) o desafio de fontes adequadas de N para o desenvolvimento das safras é grande.

A fim de manter ou aumentar a produtividade na cultura do trigo, o fertilizante de N é frequentemente usado em demasia, entretanto a eficiência de uso na produção de trigo tem correspondido a um terço (BLOCH *et al.*, 2020; KARIM *et al.*, 2020).

O suprimento de N também é conhecido por exercer efeitos múltiplos sobre as plantas (POLESSKAYA; KASHIRINA; ALEKHINA, 2004), pois, é um nutriente inorgânico crítico para a síntese de aminoácidos, clorofila, nucleotídeos, vários outros metabólitos e componentes celulares, com seu papel crítico na fotossíntese (ZHU *et al.*, 2020). A fotossíntese é de suma importância para todos os aspectos da fisiologia das plantas como fornecedora de energia, impactando nas taxas de crescimento, biomassa e na produtividade. No entanto, além de ser afetada pela disponibilidade de N, também é afetada por estresses causados por outras condições ambientais adversas, resultando na diminuição da capacidade fotossintética geral (DRIEVER *et al.*, 2017; GURURANI; VENKATESH; TRAN, 2015; HUANG, JUN *et al.*, 2013; WEN *et al.*, 2021).

Nesse sentido, muitos pesquisadores têm investigado os efeitos da suplementação de N na cultura do trigo, associado ou não a condições de estresses abióticos, com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o assunto, para buscar alternativas para solucionar ou mitigar o problema da eficiência do uso do N e atingir a produtividade necessária de forma sustentável (KARIM *et al.*, 2020; MAGLOVSKI *et al.*, 2017; POLESSKAYA; KASHIRINA; ALEKHINA, 2004; SHANGGUAN; SHAO; DYCKMANS, 2000; WEN *et al.*, 2021; YOUSUF *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2020).

A inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas (*Plant Growth Promoting Bacteria* - PGPB) tem sido considerada uma ferramenta promissora. As PGPB são bactérias de vida livre, rizosféricas, epifíticas e endofíticas, capazes de estimular o crescimento vegetal e aumentar a resistência e tolerância da planta hospedeira a uma ampla gama de estresses bióticos e abióticos (ABD EL-DAIM; BEJAI; MEIJER, 2019; AFRIDI *et al.*, 2019; BARNAWAL *et al.*, 2017; LASTOCHKINA *et al.*, 2019).

As PGPB afetam positivamente as plantas por meio da biossíntese de vários compostos biologicamente ativos, tais como, substâncias com atividades antibióticas e inseticidas, biossurfactantes, sideróforos, quelantes, fito-hormônios, enzimas antioxidantes e fixação biológica de nitrogênio (FBN). Além de regular o nível de etileno nas plantas e melhorando a biodisponibilidade de macro/micronutrientes, desenvolvimento de resistência sistêmica a

doenças e tolerância a estresses abióticos envolvendo vias de sinalização dependentes de salicilato ou jasmonato (ANTONELLA DI BENEDETTO *et al.*, 2017; BARNAWAL *et al.*, 2017; BATRA *et al.*, 2018; BLOCH *et al.*, 2020; CARRIL *et al.*, 2020; LASTOCHKINA *et al.*, 2019).

Há anos, pesquisadores buscam e continuam buscando informações para validar a eficiência desse tipo de interação, não apenas em trigo, mas também em diversas espécies de interesse econômico (CHENG; MCCONKEY; GLICK, 2010; DIVAN BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 2000; KOPER *et al.*, 2020; LADE *et al.*, 2018; NEIVERTH *et al.*, 2014; ROESCH *et al.*, 2006; YOON *et al.*, 2016). E também seu efeito perante estresses bióticos e abióticos específicos (AFRIDI *et al.*, 2019; AWAN *et al.*, 2020; BARNAWAL *et al.*, 2017; CARRIL *et al.*, 2020; FURLAN *et al.*, 2017; MISHRA; SRIVASTAVA; NAUTIYAL, 2014; SHAMEER; PRASAD, 2018; SUYAL *et al.*, 2018).

Assim o estudo da fotossíntese na interação planta-bactéria (BASHAN *et al.*, 2006; MARCOS *et al.*, 2015; RANGEL DE SOUZA *et al.*, 2016; SAMANIEGO-GÁMEZ *et al.*, 2016; STEFAN *et al.*, 2013); e das vias metabólicas e da fisiologia através da análise proteômica da interação planta-bactéria (ALBERTON *et al.*, 2013; DHAWI; DATTA; RAMAKRISHNA, 2017; FALEIRO *et al.*, 2015; IBORT *et al.*, 2018; LEANDRO *et al.*, 2019; LERY *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2017) foram realizados.

A análise proteômica é uma ferramenta metodológica que já provou ser efetiva nos estudos das diferenças em sistemas biológicos, e em especial para os estudos dos efeitos de bactérias promotoras de crescimento vegetal (CHENG; MCCONKEY; GLICK, 2010; KWON *et al.*, 2016; LERY *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2017), como se propõe nesse trabalho.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 A cultura do Trigo

O trigo pertence ao gênero *Triticum*, constituído de um grande número de espécies, das quais algumas se encontram em estado silvestre, e outras somente em estado de cultivo (CURTIS, B. C.; RAJARAM, S.; GÓMEZ MACPHERSON, 2002; SOBRINHO, J. S.; SOUZA, 1983). É uma angiosperma da classe das Liliopsidas, pertencente à ordem Poales, da família Poaceae. É uma planta anual, hermafrodita e autógama (BRAMMER *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2000).

As espécies podem ser divididas em três grupos de acordo com o número de cromossomos: as diplóides que possuem 14 cromossomos, as tetraplóides com 28 cromossomos e as hexaplóides com 42 cromossomos (BRAMMER *et al.*, 2001; MAYER *et al.*, 2014).

Um fator chave para o sucesso do trigo como cultura alimentar global é sua adaptabilidade a várias condições climáticas. Isso é atribuível, em parte, à estrutura do genoma alohexaplóide, que surgiu como resultado de dois eventos de poliploidização. Estima-se que o primeiro reuniu os genomas de duas espécies diplóides relacionadas à espécie selvagem *Triticum urartu* ($2n = 2x = 14$; AA; onde $2n$ é o número de cromossomos em cada célula somática e $2x$ é o número básico do cromossomo) uma gramínea silvestre, também diplóide, e *Aegilops speltoides* ($2n = 14$; SS). Esta hibridização formou o alotetraplóide *T. turgidum* ($2n = 4x = 28$; AABB), um ancestral do trigo selvagem cultivado no Oriente Médio e *T. turgidum* sp. *durum* cultivado para macarrão atualmente. Um segundo evento de hibridização entre *T. turgidum* e uma espécie de gramínea diploide, *A. tauschii* (DD), produziu o ancestral alohexaplóide *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD), que desde então tem sido cultivado como trigo para pão e é responsável por mais de 95% do trigo cultivado em todo o mundo (MAYER *et al.*, 2014; SOBRINHO, J. S.; SOUZA, 1983; ZIMIN *et al.*, 2017).

Possui grande importância mundial, por ser o principal cereal consumido no mundo pelos humanos, seguindo pelo milho, arroz e aveia. No ano de 2018, a produção mundial foi de 734 Mt, sendo 40 Mt menor do que no ano anterior, no entanto, mesmo entre oscilações ao longo dos anos, a produção tem crescido e a área plantada tem diminuído, em especial de 2015 (233,5 Mha) para 2018 (214,3 Mha) (FAOSTAT, 2020). Contando com uma população mundial crescente e atual de 7,7 bilhões de pessoas (ONU, 2019), é de se observar que a perspectiva é de que seja aumentada a produção deste cereal. Entretanto houve diminuição de suprimento de trigo e seus produtos que pode ser observada desde o início deste século, onde em 2000 era de 190g/capita/dia, em 2013 de 179 g/capita/dia, sendo que na década de 90 atingiu 194g/capita/dia, o seu maior valor (FAOSTAT, 2020).

A produção brasileira de trigo também oscila muito, mas vem aumentando ao longo dos anos. Em 2018, pela FAOSTAT (FAOSTAT, 2020), atingiu 5,4 Mt, com uma área pouco maior que 2 Mha. Entretanto o consumo de 2018 foi de 12,1 Mt, o que demandou importação de 6,7 Mt (ABITRIGO, 2020).

1.1.2 Importância da adubação nitrogenada na cultura do trigo

O principal nutriente responsável pelo aumento do rendimento e do teor de proteína no trigo é o N (PANKIEVICZ *et al.*, 2016) e determina o número de afilhos ou perfilhos, sendo essencial na fase de formação dos nós, no início do alongamento (SALA *et al.*, 2005).

Os fertilizantes químicos são utilizados na cultura do trigo e em outras culturas e tem sido aproveitado em apenas 1/3 do aplicado (HAWKESFORD; GRIFFITHS, 2019). Essa grande quantidade de fertilizante é perdida no solo, o que tem aumentando o risco ambiental por lixiviação para os cursos de água e por emissões de gases de efeito estufa (GUO *et al.*, 2019; HAWKESFORD, 2017; HIREL *et al.*, 2011).

Cabe observar o potencial do N que não é usado com eficiência em todas as culturas e são várias as formas pelas quais esse excesso de N pode poluir. As águas de chuvas por exemplo, podem arrastar sobre o solo ou internamente, nitratos e ureia, contaminando rios, lençóis freáticos e outras fontes, sendo que o nitrato é tóxico e precisa ser retirado da água para uso humano, animal ou industrial. A eutrofização que ocorre dessa quantidade de nutriente, pode ter consequências na diminuição de luz e oxigênio disponível para a fauna aquática e todo o ciclo de vida relacionado. A eutrofização também pode chegar aos solos e desequilibrar a microbiota nativa e sua fertilidade, sendo que uma das sérias consequências disso, é a capacidade em produzir o óxido nitroso (N_2O) que aumenta a quantidade de gases e portanto o efeito estufa ou ainda, reagindo com ozônio (O_3) formando pentóxido de dinitrogênio (N_2O_5) que ao reagir com água forma ácido nítrico (HNO_3) (HIREL *et al.*, 2011). Dados indicam que a emissão de N_2O continua crescendo nos últimos 8 anos a uma taxa de 46000g/ano (FAOSTAT, 2020).

Embora tenham havido avanços em relação a manejo agrícola da cultura do trigo como já demonstrado (GUO *et al.*, 2019; KUMAR JAT *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2018), para que se tenha maior rendimento com menor prejuízo, as pesquisas tem se voltado a buscar o aumento da eficiência no uso do nitrogênio (NUE - *Nitrogen Use Efficiency*) e algum sucesso já tem sido encontrado (HAWKESFORD; GRIFFITHS, 2019).

No mundo todo, desde 2011, a quantidade de N total utilizado como fertilizante está estável em valores de 69 kg/ha. E desde então a produção do trigo aumentou. Não se pretende correlacionar diretamente com o aumento de NUE para o trigo, mas esta cultura ocupa maior área junto com milho e o arroz (trigo: 214Mha, milho: 193Mha e arroz:167Mha). No Brasil, nos últimos 10 anos dobramos o uso de fertilizante nitrogenado na agricultura (FAOSTAT, 2020).

A eficiência do uso de nitrogênio fotossintético (PNUE - *Photosynthetic Nitrogen Use Efficiency*) é característica agrônômica chave, comumente usada para estimar a eficiência com a qual este recurso é usado para garantir o crescimento e desenvolvimento ideal da planta, e é calculada como a razão da taxa de fotossíntese pelo conteúdo de N da folha (HABBIB *et al.*, 2020; YIN, LIJUN *et al.*, 2019).

Outro fato importante a considerar é custo de fertilizantes nitrogenados. Para transformar N gasoso (N_2) e gás hidrogênio (H_2) em amônia (NH_3), o processo industrial que tem mantido os insumos da agricultura, conhecido como Harber-Bosh, usa alta quantidade de energia, temperatura e pressão elevadas, fornecida pela queima, normalmente, do petróleo e emite mais de 400Mt de CO_2 (CHEN, SHIMING *et al.*, 2019).

Algumas alternativas foram buscadas e encontradas para aumentar a NUE. Uma delas é encontrar uma cultivar melhorada sob condição de menor quantidade de N como proposto por pesquisadores (HIREL *et al.*, 2011) e foi estudado e alcançado em trigo (HAWKESFORD; GRIFFITHS, 2019; HAWKESFORD, 2017; YI *et al.*, 2018). Outra alternativa vem da experiência com o manejo de plantio direto que também se mostrou promissor na NUE, em especial no uso de N fotossintético (HABBIB *et al.*, 2020).

É importante que o N absorvido na fase vegetativa seja transferido para as folhas, e que na fase reprodutiva ocorra a sua mobilização para o grão através de aminoácidos, portanto é notável que 80% do N dos grãos de trigo sejam oriundos das folhas (KANT; BI; ROTHSTEIN, 2011).

O aparato fotossintético detém a maior parte do N da folha, pois 75% deste, está presente nos cloroplastos e já foi mostrada que sua deficiência diminuiu significativamente a eficiência do PSII (Fv/Fo) e a eficiência da conversão quântica potencial fotossintética (Fd/Fs) das folhas.(SHANGGUAN; SHAO; DYCKMANS, 2000).

As formas de absorção de N pelas raízes são amônio e nitrato (KANT; BI; ROTHSTEIN, 2011). Mas é a partir de amônio que o N inorgânico é transformado em orgânico através do sistema glutamina sintetase (GS) e glutamina-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT). O íon amônio pode ser oriundo de fonte primária como amônia (NH_3), nitrato (NO_3^-) ou da FBN, ou ainda de fontes secundárias como do catabolismo de aminoácidos, fotorrespiração e enzimas como asparaginase, fenilalanina amônio liase (BERNARD; HABASH, 2009). Entretanto é a “GS considerada como etapa limitante do processo de assimilação do amônio” (ANTONELLA DI BENEDETTO *et al.*, 2017).

A partir da década de 70, os pesquisadores passaram a se empenhar em compreender a FBN (MARX, 2004) e atualmente podem comemorar a compreensão da fixação simbiótica

de nitrogênio (FSN) (ROY *et al.*, 2020). Entretanto o estudo em não leguminosas no Brasil, iniciou com a pesquisadora Johanna Döbereiner e seus colaboradores, que foram responsáveis pelo isolamento e caracterização de inúmeras cepas bacterianas isoladas, capazes de interagir com plantas tanto para fixar o N, quanto para promover o crescimento vegetal (BALDANI, JOSÉ I.; BALDANI, 2005).

A possibilidade de interações benéficas bacterianas na cultura do trigo e a elucidação de detalhes nos últimos anos sobre mecanismos, rotas e genes envolvidos (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014; CARVALHO, T. L. G. *et al.*, 2014; GOUDA *et al.*, 2018; NEIVERTH *et al.*, 2014; SHRIVASTAVA; KUMAR, 2015), tem gerado muitas expectativas sobre o uso biotecnológico dessas bactérias, denominadas de PGPB. Na sua maioria são bactérias da rizosfera e, portanto, Rhizobactérias, daí o termo: rhizobactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* - PGPR) (NEHRA; CHOUDHARY, 2015; PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014). Tais alternativas seriam muito vantajosas, que sendo possível sua aplicação nas plantas de importância agronômica, poderia diminuir os riscos na poluição e os custos de produção.

1.1.3 Interação planta-bactéria

A observação de que culturas de cana-de-açúcar poderiam se beneficiar de uma associação com bactérias, do potencial de fixação de N (BALDANI, JOSÉ I. *et al.*, 1997), e que esta era a razão para que a cultura de cana-de-açúcar pudesse se desenvolver com metade ou menos do fertilizante normalmente usado em outros países (DE CARVALHO, THAIS LOUISE GURJÃO; FERREIRA; HEMERLY, 2011), foram ponto de partida para inúmeros estudos. E para além da FBN, o fato de uma bactéria diazotrófica promover o crescimento vegetal sem necessariamente fixar N, como no estudo onde, tanto a cepa selvagem quanto um mutante no sistema da nitrogenase (*nif*⁺), de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, foram capazes de promover o crescimento de cana-de-açúcar na presença de fertilizante nitrogenado (SEVILLA *et al.*, 2001).

Alguns artigos tratam como associação simbiótica e outros aplicam o conceito de simbiose apenas a interação entre leguminosas e bactérias capazes de dar origem a nódulos, Rhizobaceas (SOUZA, ROCHELI DE; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). Entretanto, é possível reconhecer os tipos de associação pelo local onde a bactéria pode ser encontrada, relativas ao sistema solo-planta, de uma perspectiva mais simples, bactérias na rizosfera

(PGPR) e as encontradas nos espaços intra e intercelular (endofíticas) (AHMAD *et al.*, 2018; BALDANI, JOSÉI. *et al.*, 1997).

As bactérias diazotróficas tem a capacidade de FBN. Entretanto, já em 1997 os estudos mostram que, em se tratando especialmente de não leguminosas, a fixação nem sempre ocorre e outros fatores são tão importantes quanto a FBN para a promoção do crescimento (BALDANI, JOSÉI. *et al.*, 1997).

A bactérias encontradas na rizosfera se aproveitam dos exudados e em troca influenciam o desenvolvimento da planta por algumas respostas como solubilização de fosfato, produção de alguns ácidos orgânicos, produção de fito-hormônios como ácido indol-acético, diminuição de produção de etileno via produção de atividade de desaminase de precursor do etileno (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico), solubilização de nutrientes como ferro a partir de sideróforos e da FBN. As rizobactérias, quando não necessariamente estão fixando o N atmosférico, contribuem com solubilização de nutrientes e uso do N disponível na matéria orgânica (AHMAD *et al.*, 2018).

PGPR também são capazes de diminuir os efeitos de condições de estresse para planta através dos mesmos mecanismos diretos de promoção de crescimento ou por mecanismos indiretos que podem prevenir ou reduzir os danos pela produção de compostos ou sideróforos que reduzem o Ferro disponível para o crescimento de organismos patogênicos, ou por ter sido induzido seu mecanismo de resistência sistêmica, ou ainda por produção de exopolissacarídeos. Porém, é importante acentuar que a estes efeitos variam entre as PGPR, podem depender do solo, da planta (NADEEM *et al.*, 2014) e possivelmente da variedade.

As bactérias endofíticas podem ser encontradas em várias partes das plantas e as “funções mais importantes são a proteção contra patógenos, interação com plantas simbiotes, desencadeamento de mecanismos de defesa da planta contra estresses ambientais, produção de substâncias voláteis e fixação de nitrogênio”. E “também são conhecidas por produzirem substâncias alelopáticas, que servem como controle biológico para diferentes pragas. A combinação desses efeitos de promoção de crescimento aumenta o nível de imunidade da planta contra doenças e pragas” (MYRESIOTIS; VRYZAS; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2014). É importante acentuar que a característica endofítica foi caracterizada como aquela bactéria ou fungo que tem seu ciclo de vida, ou parte dele, no interior das plantas sem causar sintomas de doença, mas podendo promover algum benefício para a planta (BALDANI, JOSÉI. *et al.*, 1997; LIU, HONGWEI *et al.*, 2017).

De modo geral, tanto as bactérias endofíticas quanto as PGPR, podem ser tratadas como PGPB e como são um grupo variado de bactérias, atuam de diversas formas, mas em

geral, compartilham as mesmas habilidades, independente se são rizosféricas ou endofíticas (SOUZA, ROCHELI DE; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

O mecanismo interativo que leva ao desenvolvimento da interação e promoção do crescimento vegetal não é conhecido. Desse modo, propõe-se que possam haver em alguns casos, o antagonismo entre bactérias promotoras de crescimento e fito-patógenos, a competição e o hiper-parasitismo como fator importante de biocontrole por microorganismo de vida livre, atuando assim, como PGPR (ANTONELLA DI BENEDETTO *et al.*, 2017; RAAIJMAKERS *et al.*, 2009).

Além da morfologia, do tamanho da raiz e do sistema de transporte de N da raiz, a interação raiz-microrganismos, como PGPB, influenciam na absorção de N da rizosfera e, portanto, no NUE, pois podem promover alongamento de raízes (ANTONELLA DI BENEDETTO *et al.*, 2017).

No Brasil genótipos de trigo ensaiados *in vitro* foram inoculados com bactérias isoladas das mesmas variedades, com *H. seropedicae* e *Azospirillum brasilense*, e mostraram que existe relação entre os genótipos de trigo e a presença de bactérias endofíticas e que “bactérias diazotróficas endofíticas promoveram o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo” (SALA *et al.*, 2005).

Outro experimento, também realizado no Brasil, foi conduzido em casa de vegetação com solo não esterilizado, avaliando o impacto de três bactérias endofíticas diazotróficas no metabolismo, fisiologia e crescimento de plantas de trigo (*Triticum aestivum* hard L.) sob três níveis de fertilizante de N (zero, dose de N-fertilizante recomendada pela metade e dose total). Três cepas mutantes espontâneas resistentes aos antibióticos foram usadas IAC-AT-8 (*Azospirillum brasilense*), IAC-HT-11 (*Achromobacter insolitus*) e IAC-HT-12 (*Zoogloea ramigera*). Todas as três bactérias foram capazes de modificar, de forma específica, a atividade das enzimas nitrato redutase (NR) e GS, melhorar o teor de clorofila e promover o aumento do peso da raiz e da parte aérea. Mas o conteúdo de N e o NUE foram dependentes da cepa de bactérias endofíticas e do tecido vegetal avaliado. Os parâmetros foram afetados pela taxa de N (SILVEIRA *et al.*, 2016).

Duas variedades de trigo tiveram o efeito de estresse por cádmio (Cd) diminuído por uma cepa da bactéria *Bacillus siamensis* e ainda foram demonstradas diferentes respostas das variedades de trigo, sendo uma mais tolerante do que a outra na presença da bactéria (AWAN *et al.*, 2020).

Foi realizada a quantificação *in situ* das concentrações relativas de H₂O₂ em folhas de trigo infectadas com a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae*, isoladamente ou na presença

da bactéria benéfica *Herbaspirillum seropedicae*. Observaram que as concentrações de H₂O₂ foram diferentes dependendo das combinações bacterianas testadas. Notavelmente, as plantas desafiadas com *P. syringae* na presença de *H. seropedicae*, acumularam menos H₂O₂ na folha e mostraram sintomas necróticos reduzidos, apontando para um papel potencial de *H. seropedicae* na redução dos níveis de H₂O₂ desencadeados por patógenos em plantas jovens de trigo (CARRIL *et al.*, 2020).

Variedades de trigo também foram cultivadas sob interação com PGPR *Streptomyces* de espécies diferentes, revelando efeito de PGPR em uma cultivar, e como um agente estressor leve para outra. O autor confirmou que estudos prévios devem ser realizados antes da aplicação comercial como biofertilizantes (AKBARI *et al.*, 2020).

Em outro estudo ainda, uma variedade de trigo foi avaliada em campo usando PGPR, carvão biológico e NPK como fertilizante sintético. O estudo mostrou a melhora no rendimento, sendo vantajoso o uso do consórcio PGPR e do carvão de fonte biológica em de trigo com menor custo de adubação (IJAZ *et al.*, 2019).

1.1.4 A bactéria *Herbaspirillum seropedicae*

H. seropedicae é uma proteobactéria diazotrófica que se associa ao trigo, milho, sorgo, cana-de-açúcar, arroz e outras gramíneas forrageiras de forma endofítica, promovendo crescimento do vegetal e aumentando sua produtividade como mostrado por pesquisadores (BALDANI, JOSÉI. *et al.*, 1997; MAIDA *et al.*, 2016; PANKIEVICZ *et al.*, 2016). Além disso *H. seropedicae* parece ser capaz de induzir respostas defensivas da planta, sendo portanto, útil como agente de biocontrole (DALL'ASTA *et al.*, 2019). A aplicação dela em milho mostrou-se positiva para o aumento da assimilação de N, bem como aumento no acúmulo de fósforo (P) e potássio (K) nas partes aéreas (DA FONSECA BREDA *et al.*, 2019). As respostas ao estresse hídrico também foram positivas em plantas inoculadas com *H. seropedicae*, mostrando maiores níveis de carbono, clorofila, maior biomassa, bem como níveis menores de ácido abscísico e etileno (CURÁ *et al.*, 2017).

O gênero *Herbaspirillum*, afiliado filogeneticamente ao *Betaproteobacteria* (ROTHBALLER *et al.*, 2008) foi primeiramente descrito com a espécie *Herbaspirillum seropedicae*, como sendo a primeira espécie endófito a ser identificada (BALDANI *et al.*, 1996). É uma bactéria diazotrófica, gram-negativa, capaz de estabelecer associações endofíticas (BALDANI, JOSÉI. *et al.*, 1997), e pôde ser isolada de muitas gramíneas, tais como milho,

sorgo, arroz, cana-de-açúcar, de várias plantas forrageiras crescidas no Brasil, assim como também do trigo (BALDANI, JOSÉ I.; BALDANI, 2005).

A espécie *H. seropedicae* possui várias estirpes. O genoma da estirpe SmR1, um mutante espontâneo resistente a estreptomicina da estirpe Z78, é constituído por um único cromossomo circular de 5.513.887pb e um total de 4.735 ORFs potenciais, codificando 3.108 proteínas com funções conhecidas, 497 proteínas preditas e 1.130 sem função conhecida. Foram também identificadas sequências que codificam para 55 tRNAs representando todos os 20 aminoácidos. A estirpe SmR1 é capaz de crescer na presença monossacarídeos tais como D-glicose, D-frutose, D-galactose, L-arabinose, com açúcar-álcool e ácidos orgânicos tais como L-malato e L-lactato. No entanto, não é capaz de crescer em oligo ou polissacarídeos. Apresenta capacidade limitada de crescer em aminoácidos como fonte de carbono, sendo capaz de utilizar L-prolina, L-tirosina, D/L-alanina, β -alanina, L-isoleucina e L-glutamato (PEDROSA, FÁBIO O. *et al.*, 2011).

É uma bactéria endofítica obrigatória, encontrada dentro de raízes, caules e folhas de milho, sorgo, arroz gramíneas forrageiras cultivadas no Brasil, exceto da folha da cana-de-açúcar (BALDANI, JOSÉ I. *et al.*, 1997).

Nosso grupo avaliou *in vitro* e a vaso em casa de vegetação, cinco variedades brasileiras do germoplasma da empresa COODETEC (Cooperativa de Pesquisa Agrícola do Paraná-Ltda). Os resultados apontaram que as variedades CD104 e CD120 apresentaram distintas respostas quanto a inoculação com a bactéria nos experimentos *in vitro* usando meio MS completo diluído 10x, com e sem inoculação com a bactéria *H. seropedicae*. A cultivar CD104 apresentou distinto comportamento com diminuição de peso fresco de raiz, peso seco de folha, conteúdo de nitrogênio e ausência de pelos radiculares quando inoculada e apenas a presença epifítica da bactéria. As demais cultivares apresentaram de aumento pelos radiculares quando inoculadas e entre essas, as que apresentaram bactéria endofiticamente localizadas na raiz foram as cv. CD120 e CD108, sendo que nas condições experimentais apenas a CD120 apresentou tamanho reduzido de comprimento de raiz quando inoculada. Avaliadas as cv. CD104 e CD120 a vaso, CD104 não apresentou resposta à adição de ureia ou da bactéria na semeadura e mostrou redução no peso de 100 sementes, mantendo o peso de semente por planta quando comparado o experimento não inoculado com o inoculado. Entretanto a cv. CD120 se apresentou responsiva mostrando aumento significativo no peso de 100 sementes e peso de sementes por planta (NEIVERTH *et al.*, 2014). Esses efeitos demonstram que a associação para promoção do crescimento de planta com bactéria é dependente de fatores como genótipo, solo e estirpe bacteriana.

1.1.5 Estudos proteômicos

Técnicas proteômicas têm sido uma ferramenta importante para explorar os mecanismos sobre as respostas de plantas e suas interações (CHENG; MCCONKEY; GLICK, 2010). Estudos proteômicos, além de fornecer ligação entre a expressão gênica e a abundância de proteínas, auxilia a identificação das principais proteínas envolvidas em rotas de interesse como por exemplo, na defesa e resistência das plantas a patógenos (SANTOS *et al.*, 2019), e, pode ser crucial para a compreensão dos processos fisiológicos que não são contabilizados no nível genômico (BERTINI *et al.*, 2019).

Como exemplo temos o experimento realizado em arroz inoculado com *H. seropedicae* SmR1, no qual foi utilizada uma abordagem proteômica para estudar os mecanismos de interação nas raízes de arroz. As proteínas do arroz reguladas positivamente incluíam a S-adenosilmetionina sintetase, metiltioribose quinase e aciredutone dioxigenase 1, todas envolvidas na reciclagem de metionina. De acordo com esses resultados, a produção de etileno foi reduzida em aproximadamente três vezes nas raízes de arroz colonizadas por *H. seropedicae*. Os resultados sugerem que a bactéria estimula a reciclagem de metionina e a síntese de fitosideróforos, além de diminuir a síntese de etileno em raízes de arroz (ALBERTON *et al.*, 2013).

Em outro experimento, os pesquisadores, por meio da proteômica, estudaram o papel da rizobactéria promotora de crescimento vegetal, *Enterobacter cloacae* SBP-8, com atividade ACC desaminase no perfil de proteoma de trigo (*T. aestivum* L.) sob estresse de alta salinidade (NaCl 200 mM). Proteínas relacionadas ao transporte de íons, via metabólica, síntese de proteínas e resposta à defesa, aumentaram em certa medida sob estresse salino. Uma comparação mais ampla do proteoma da planta de trigo sob diferentes tratamentos, revelou que alterações em algumas das vias metabólicas poderiam estar envolvidas na adaptação ao estresse em resposta à inoculação de PGPR. Os resultados sugeriram que a inoculação bacteriana aumentou a capacidade da planta do trigo de combater o estresse salino por meio da regulação de fatores de transcrição, promovendo atividade antioxidativa, indução de enzimas de defesa, biossíntese de lignina e aceleração da síntese protéica (SINGH *et al.*, 2017).

Usando uma abordagem proteômica para investigar o proteoma de raiz de *Zea mays* (cv. DKB240) inoculado com *H. seropedicae* SmR1 cultivado in vitro e colhido 7 dias após a inoculação, os pesquisadores observaram 18 proteínas acumuladas diferencialmente em amostras de raízes, 10 das quais foram identificadas por massa dos peptídeos obtida por

espectrometria de massa MALDI-TOF. Entre as proteínas identificadas, 3 proteínas estavam presentes exclusivamente em amostras de raízes inoculadas, 6 proteínas reguladas positivamente e 1 proteína regulada negativamente em relação ao controle. A partir dos resultados, observaram a primeira evidência da expressão da ATP sintase do tipo III durante a interação *H. seropedicae* e raiz de milho (FERRARI *et al.*, 2014).

Entretanto, muito ainda precisa ser compreendido, especialmente nas cultivares brasileiras que foram produzidas para atender ao nosso clima e características específicas de solo. A compreensão de como essas interações acontecem, quais produtos metabólicos, vias metabólicas e respostas são empregadas pelo vegetal e pelo microrganismo, são de suma importância, uma vez que se busca, cada vez mais, o aumento da produtividade, redução dos custos e menor impacto ecológico (DEFEZ; ANDREOZZI; BIANCO, 2017).

Não foram encontrados experimentos utilizando a proteômica como ferramenta para investigar as alterações fisiológicas do trigo na interação com a bactéria promotora de crescimento vegetal *H. seropedicae* na ausência de N, apesar de ser importante conhecer os efeitos do nitrogênio assim como da bactéria para a compreensão dos mecanismos envolvidos, e em variedades que apresentam respostas distintas como mostrado (NEIVERTH *et al.*, 2014).

Assim sendo, nesse trabalho propõe-se avaliar a expressão de proteínas foliares de cultivares de trigo brasileiras que apresentaram, anteriormente, respostas opostas quando cultivadas in vitro com *H. seropedicae* SmR (NEIVERTH *et al.*, 2014), em estágios iniciais de desenvolvimento. O estudo in vitro é preferido nesta proposta, pois pode estabelecer uma associação pura de efeitos de outros micro-organismos benéficos, patógenos e inertes presentes na rizosfera e podem exercer influência positiva ou não, a depender da composição e dos exudatos emitidos (RAAIJMAKERS *et al.*, 2009).

2 DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)

2.1 *Objetivos Geral*

Estudar proteínas específicas encontradas nas folhas de trigo das cultivares CD104 e CD120 inoculadas com a bactérias *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 em cultivo *in vitro* em condições de ausência de nitrogênio. Para controle, estudo de proteínas de folhas cultivadas nas mesmas condições e na presença e ausência de fonte de nitrogênio sem inoculação com a bactéria.

2.2 *Objetivos específicos*

Obter folhas de plantas de trigo das cv. CD104 e CD120 cultivadas *in vitro* em meio MS sem sacarose sob três condições: com fonte de nitrogênio (1), sem fonte de nitrogênio (2) e sem fonte de nitrogênio inoculada com a bactéria *H. seropedicae* Smr1(3).

Avaliar as proteínas exclusivamente presentes em cada tratamento através de análise proteômica e inferir as rotas metabólicas e fisiológicas presentes em cada tratamento.

Avaliar parâmetros fisiológicos e de crescimento vegetal por tomada de peso seco e fresco, comprimento da parte aérea e eficiência fotossintética, e correlacionar com as proteínas encontradas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de folhas de trigo das cv. CD104 e CD120 nas condições do estudo.

3.1.1 Cultivo das plantas

O experimento *in vitro* foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina. As sementes de *T. aestivum* (cv.s CD104 e CD120.), foram oriundas do germoplasma da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC, Paraná, Brasil) e mantidas pelo laboratório. Principais características de cada cultivar estão representadas na TABELA 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, SUSCETIBILIDADE A DOENÇAS, TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO E ÁREAS RECOMENDADAS PARA O PLANTIO DAS CULTIVARES DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CD104 E CD120.

Características morfológicas	Cultivar	
	CD104	CD120
Ciclo	Médio	Médio
Média à maturação plena (dias)	116	120
Estatura média (cm)	80 - Baixa	84 - Média
Posição das folhas	Pendentes	Ereta a intermediária
Tolerância a seca	sim	não
Suscetibilidade a doenças	Ferrugem da folha; Giberela e Brusone	Vírus do mosaico
Eficiência no uso de adubação	Eficiente e responsivo	Eficiente e responsivo
Regiões de cultivo (Brasil)	Paraná, Mato Grosso e São Paulo	Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul

FONTE:(COODETEC, 2010)

As sementes foram esterilizadas conforme protocolo de (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014), onde foram imersas em etanol 70% por 30 segundos, sob agitação (120rpm). Em seguida, agitadas em solução de hipoclorito acidificado (NaOCl 0,5% (v/v) HCl concentrado 0,18% (v/v), Tween 80 0,01% (v/v) e KH₂PO₄ 7 mM) por cinco minutos. Então foram lavadas em água estéril três vezes sob agitação, por um minuto cada, seguindo por imersão durante quatro horas em água estéril. Em seguida as sementes foram colocadas novamente em solução de hipoclorito acidificado por cinco minutos, lavadas três vezes como anteriormente e deixadas

cinco minutos em peróxido de hidrogênio 35 % (v/v) e novamente lavadas quatro vezes em água estéril por um minuto cada, sob agitação. Em seguida, foram germinadas em placas que continham ágar água (6 g.L^{-1}) a 30°C , na ausência de luz por 24 h. As sementes germinadas com vigor semelhante, foram, uma a uma, transferidas para tubos de ensaio de vidro estéreis (20 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro) contendo 25 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE, TOSHIO; SKOOG, 1962) sem sacarose, com presença (CN) ou ausência de fonte de nitrogênio (SN). Esferas de polipropileno (cerca de 10 mL em volume) foram usadas no meio para servir de suporte às sementes e plantas.

O cultivo foi realizado em sala de crescimento sob condições de fotoperíodo de 14h luz/10h escuro em temperatura de $25 (\pm 2)^\circ\text{C}$, sendo os tubos acomodados em estantes dispostas aleatoriamente em prateleiras. Após 24h da transferência das sementes germinadas para os tubos SN, foi feita a inoculação com 0,25 mL de suspensão de *H. seropedicae* SmR1 na concentração de $1,5 \times 10^7 \text{ UF.mL}^{-1}$ (tratamento SNI). O controle experimental foi formado por sementes transferidas para tubos contendo meio MS sem sacarose com fonte de nitrogênio (tratamento CN) e sem fonte de nitrogênio (tratamento SN). Após 21 dias da transferência das sementes para os tubos, o experimento foi considerado encerrado.

3.1.2 Condições de crescimento bacteriano e preparo do inóculo

O cultivo bacteriano de *H. seropedicae* SmR1 e o preparo do inóculo foi de acordo com protocolo proposto na literatura (KLASSEN *et al.*, 1997) em meio NFbHP-malato contendo 20 mM NH_4Cl com adição de estreptomicina ($80 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As bactérias em meio líquido foram quantificadas por turbidimetria a 600 nm na fase exponencial, tomando como referência a relação 1,0 DO_{600} para $4,4 \times 10^8 \text{ células.mL}^{-1}$. A quantidade necessária para uma concentração de $1,5 \times 10^7 \text{ células.mL}^{-1}$ foi centrifugada a 12.000 xg por 10 min a 4°C , o *pellet* foi ressuspenso em solução salina (MOUTIA *et al.*, 2003) e então, feita a inoculação nas plantas.

3.1.3 Confirmação molecular da espécie bacteriana

A confirmação molecular da *H. seropedicae* foi realizada por amplificação, por análise de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), de uma região pertencente ao rDNA 16S, específica da bactéria (de 76pb) utilizando o seguinte par de primers Herbas1-F 5'-

TTTCGCGGTAGGCGATCA-3' e Herbas1-R 5'- GAGCAATTGACCGGCAAGAC-3' (PEREIRA *et al.*, 2014).

Para isso, 15 mL do meio de cultura de co-cultivo planta/bactéria de 3 tubos escolhidos aleatoriamente, de ambas cultivares, foram centrifugados a 10.000 xg por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com aproximadamente 500 µL de água ultrapura estéril. Um total de 20 µL foi aquecido a 96 °C por 6 min para a lise das células e liberação do DNA genômico. O sobrenadante foi obtido por breve centrifugação e 2 µL foi utilizado na PCR (SNAK, 2018), adicionando ao tubo Tampão de PCR 1x: 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da Taq DNA Polimerase (4G Pesquisa e Desenvolvimento) e 0,2 µM de cada primer. A reação foi realizada em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96, e o protocolo de amplificação consistiu em 3 min a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 1 min a 54 °C, 1 min a 72 °C e 5 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg.mL⁻¹ em Tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) e foto-documentados em equipamento Locus Biotecnologia LPIX. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb e 50 pb (NorgenTM). Para controle negativo foi utilizado água ultrapura estéril.

3.1.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2x3, onde haviam 2 cultivares (CD104 e CD120) em 3 tratamentos (CN, SN e SNI). Para avaliar as diferenças entre os tratamentos realizou-se a análise de variância, considerando cultivares na presença/ausência de nitrogênio e bactérias como tratamentos, aplicando-se o teste de comparação das médias, Tukey, a um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) por meio do programa estatístico Genes (CRUZ, 2013). Cada variável avaliada possui repetições específicas, sendo considerada no mínimo 3 repetições biológicas.

3.1.5 Coleta de amostras

Após o de cultivo *in vitro*, as plantas foram coletadas aleatoriamente, lavadas com água destilada, secas com papel toalha e a parte aérea destacada das raízes e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e guardadas em ultra-freezer (-80 °C), quando não usadas após coleta.

3.2 *Determinação de crescimento, massa fresca e massa seca*

Para avaliação de crescimento, foram mensurados o comprimento da parte aérea (cm) usando régua graduada. Das mesmas plantas, foi obtida a massa fresca e seca da parte aérea (g). A massa seca foi obtida pela secagem do material a 50°C em estufa por 72 h. Para cada tratamento avaliado, considerando-se as duas cultivares, a unidade experimental foi composta por 5 plantas e a análise estatística foi feita com 3 repetições.

3.3 *Determinação do índice de nitrogênio, clorofilas, flavonoides e antocianinas*

As análises foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Paranaense –UNIPAR, Umuarama/PR. Ao fim do tempo de cultivo (20 dias de co-cultivo para o tratamento SNI e 21 para os tratamentos CN e SN), o índice total de nitrogênio, clorofilas, flavonoides e antocianinas foram mensurados nas folhas frescas das plantas e obtidos com auxílio do equipamento DUALEX SCIENTIFIC+™ modelo Quick Start (FORCE A®, França, Paris) conforme instruções do fabricante. A clorofila é mensurada analisando a luz transmitida pela folha (dada em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Flavonoides e antocianinas, analisando o efeito de triagem destes na fluorescência da clorofila (dado em unidades de absorbância relativa de 0 a 3 para flavonoides e 0 a 1,5 para antocianinas). A calibração de fábrica.

O experimento foi composto por seis repetições, cada repetição equivale a uma planta (foram avaliadas duas folhas por planta). A leitura foi realizada na região intermediária das folhas sem destacar as folhas das plantas.

3.4 *Fluorescência da clorofila*

A determinação da fluorescência da clorofila foi realizada por meio do Plant Stress Kit® (ADC Bioscientific) seguindo as instruções do fabricante. Essa medida foi executada ao fim do cultivo *in vitro*, utilizando-se 6 plantas de cada tratamento, com leituras feitas em 2 folhas por planta. Cada planta foi considerada como uma repetição.

Após a adaptação das folhas ao escuro por 20 minutos, foram determinados os valores de fluorescência mínima da folha adaptada ao escuro (F_o), fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro (F_m), máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m) e fluorescência mínima variável (F_v/F_o). A partir desses dados, foi calculada a fluorescência variável ($F_v = F_m - F_o$).

Determinados os parâmetros da fluorescência da clorofila do estado adaptado ao escuro, a mesma folha foi submetida à luz e então obtidos o valor do estado estacionário da fluorescência na presença de luz (F_s'), fluorescência máxima na presença da luz (F_m'), além do rendimento quântico efetivo do PSII ($Y(II)$) e a taxa de transporte aparente de elétrons (ETR) (FALQUETO *et al.*, 2007; LICHTENTHALER; BUSCHMANN; KNAPP, 2005; MAXWELL; JOHNSON, 2000; SCHREIBER; BILGER; NEUBAUER, 1995).

A partir dessas determinações foram calculados a extinção fotoquímica ($Y(NO) = F_s'/F_m$), extinção não-fotoquímica ($Y(NPQ) = (F_s'/F_m') - (F_s'/F_m)$) (KLUGHAMMER; SCHREIBER, 2008) e extinção não-fotoquímica de “Stern-Volmer” ($NPQ = (F_m - F_m')/F_m$) (KOTABOVÁ *et al.*, 2011; MAXWELL; JOHNSON, 2000; NILKENS *et al.*, 2010).

3.5 *Análise proteômica*

3.5.1 Extração de proteínas e fracionamento por SDS-PAGE descontínua

A extração de proteínas da parte aérea da planta de trigo seguiu o protocolo proposto na literatura (CHEN, YU *et al.*, 2014). A parte aérea das plantas de CD104 e CD120 coletadas anteriormente, pesadas (500 mg) e armazenadas em -80 °C foram maceradas em nitrogênio líquido em seguida acrescentado 1% p/v de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O pó foi homogeneizado em tampão de extração na proporção de 10 mL para cada 1g de amostra vegetal (0,5 M Tris-HCl pH 8,3, NP-40 2% (v/v), 20 mM $MgCl_2$, β -mercaptoetanol 2% (v/v), 1 mM fenilmetilsulfonil Fluoreto (PMSF)). Após centrifugação a 13.000 xg durante 20 minutos a 4 °C, as proteínas foram precipitadas a partir do sobrenadante por adição de seis volumes de acetona a 4 °C, permanecendo a -20 °C *overnight*. Após centrifugação a 13.000 xg durante 20 minutos a 4 °C, os *pellets* foram lavados com acetona a 4 °C contendo DTT 0,1% (p/v), centrifugadas, e o procedimento de lavagem repetido três vezes. Finalmente, o precipitado foi seco ao vácuo e armazenado a -80°C até o uso. O precipitado foi pesado e parte foi ressuspenso em tampão de amostra (0,0625M Tris-HCL pH 6,8; glicerol 10% (v/v), SDS 4% (p/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v)) para uma concentração final de 4 mg.mL⁻¹. A solução foi aplicada em SDS-PAGE a 12% descontínua (gel concentrador a 4%) (LAEMMLI, 1970) corado com Coomassie G-250 (CANDIANO *et al.*, 2004). Em cada *lane* foram aplicados 80µg de proteína. O padrão de peso molecular utilizado foi *LMW calibration kit for SDS electrophoresis* da GE Healthcare. As condições elétricas foram de 50V até a passagem completa da amostra pelo gel concentrador, seguido de 200v até o final da corrida restante. O experimento consistiu em 4

réplicas biológicas, cada réplica foi formada pelo conjunto da parte aérea oriundas de 5 plantas, totalizando 500mg, e foram produzidos 4 geis, um para cada réplica.

3.5.2 Tripsinização das frações separadas na SDS-PAGE descontínua

O perfil eletroforético por *lane* na SDS-PAGE descontínua de cada uma das réplicas biológicas das amostras (CD104 e CD120, tratamentos CN, SN e SNI) foram divididas em 13 frações que foram excisadas do gel, picadas e transferidas para micro tubos. Em seguida foram descoloridas em solução 25 mM NaHCO₃ pH 8,0 e acetonitrila 50% (v/v). Na sequência, para reduzir as pontes dissulfeto, as bandas foram deixadas em 100 µL de solução de 10 mM DTT em 25 mM NaHCO₃ pH 8,0 por 60 min a 56 °C, em seguidas lavadas com 25 mM NaHCO₃ pH 8,0 e secas em dessecador sob baixa pressão.

Então, para alquilar os resíduos de cisteína, foi acrescentada 100 µL de iodoacetamida 50 mM em solução de 25 mM NaHCO₃ pH 8,0 e deixadas no escuro a temperatura ambiente por 30min. Após lavadas com 25 mM NaHCO₃ pH 8,0, seguida de lavagem com acetonitrila e secas.

Para a digestão com tripsina, foi adicionado 10 µL da solução de tripsina na concentração de 0,01 µg.µL⁻¹ em 25 mM NaHCO₃, pH 8,0. Os tubos com as bandas em solução de tripsina foram mantidos por 10 min no gelo, foi acrescentada mais solução de 25 mM NaHCO₃ pH 8,0, suficiente para reidratar o gel e, então, deixado a 37 °C por aproximadamente 16 h.

Posteriormente, foi realizada a extração dos peptídeos em solução na presença de 30 µL de ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila 50% (v/v) em sonicador por 30 min seguido da transferência da solução para novos tubos. Este processo foi repetido 3 vezes, e as soluções coletadas foram postas para secar em dessecador a vácuo. Para análise por espectrometria de massas os peptídeos extraídos foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1% (v/v). (SHEVCHENKO *et al.*, 1996).

3.5.3 Separação e identificação dos peptídeos por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida

A análise para identificação das proteínas foi realizada na Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica (UEMP) do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis – IBqM, na Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

A solução de peptídeos de cada amostra (peptídeos extraídos e tripsinizados de cada uma das 13 frações) foi separada no sistema UPLC - Waters NanoAcquity (Waters, Milford, MA). As moléculas foram dessalinizadas usando a pré-coluna C18 Waters Symmetry (180 μm X 20 mm, 5 μm). Utilizou-se 7,5 μL do volume para a injeção da amostra, a qual foi separada em sistema líquido de cromatografia utilizando a coluna BEH 130 C18 (100 μm X 100 mm, 1,7 μm - Waters, Milford, MA) em fluxo de 0,5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, com gradiente linear de acetonitrila (10–40%) contendo de ácido fórmico 0,1% (v/v). Os espectros de massa sequenciais foram obtidos utilizando o espectrômetro Q-ToF quadrupolo/ortogonal (Waters, Milford, MA) com interface para o sistema de cromatografia capilar NanoAcquity. A ionização por electrospray (ESI) foi realizada utilizando 3500V, com temperatura da fonte de 80 °C e voltagem do cone de 30 V.

A aquisição dos dados e controle do instrumento foram conduzidos no programa MassLynx (Versão 4.1, Waters). Foram realizadas corridas cromatográficas com amplitude de 400-2000 razão massa/carga (m/z), usando intervalos de 1 segundo aplicados durante todo o processo cromatográfico. Dados dependentes de aquisição foram realizados nos precursores com cargas +2, +3 e +4 para fragmentação MS/MS, ao longo de um intervalo de 50-2000 m/z .

A partir de cada espectro de massa (*Mass Spectrum* - MS) no máximo 3 íons foram selecionados para posterior fragmentação e obtenção de espectros de fragmentos (MS/MS). A fragmentação dos íons parentais ou dissociação induzida por colisão (*Collision-Induced dissociation* - CID) foi obtida através da utilização do gás argônio a uma pressão de 40 psi e uma energia de colisão com variação de 18 a 90V dependendo da carga e massa do precursor. Todos os dados foram processados usando o servidor ProteinLynx Global (versão 2.5, Waters) onde o valor da massa/carga de cada precursor (MS) e fragmento (MS/MS) foi determinada a partir dos espectros de massas oriundos desses cromatogramas, utilizando para calibração o sistema Q-ToF LockSpray™ (Waters, Milford, MA).

3.5.4 Identificação e análise de dados das proteínas em banco de dados

Os dados obtidos de espectrometria de massas das 4 réplicas biológicas, em arquivos mgf foram analisados pelo software PatternLab For Proteomics (versão 4.1.1.18) (BARBOZA *et al.*, 2011; CARVALHO, PAULO C *et al.*, 2012, 2016) para atribuição de identidade proteica aos espectros de MS e MS/MS. O banco de dados local utilizado foi formado pelos dados oriundos da plataforma UNIPROT (CONSORTIUM, 2019) de *Triticum aestivum* (Strain: cv. Chinese Spring) (Identificação taxonômica do organismo 4565 - versão 07.03.2020) e de *Herbaspirillum seropedicae* (strain SmR1) (Identificação taxonômica do organismo 757424 -

versão 07.03.2020). Foram estipulados os seguintes parâmetros de busca: 40 ppm de tolerância de massa do precursor, 0,4 Da de massa para dos fragmentos, tripsinização, exceto de resíduos seguidos de Pro, clivagens inespecíficas e perda de 1 resíduos na clivagem triptica. Como modificação fixa foi estabelecida a carbamidometilação das cisteínas (carbamidometil (C)) e como modificações variáveis foram estabelecidas a oxidação da metionina (M), fosforilação da tirosina, serina e treonina (YST), hexosaminoacetilação (HexNAc) da serina e treonina (ST) e Acetil (N-terminal). A taxa aceitável de falsos positivos (FDR) foi ajustada para 1%.

Os resultados das identificações foram selecionados para análise de dados das réplicas biológicas considerando a presença de proteínas com peptídeos identificados em 3 das 4 replicatas biológicas. Estes dados foram selecionados e agrupados em diagramas de Venn dos tratamentos CN, SN e SNI das variedades CD104 e CD120. Foram extraídos arquivos contendo as identificações de proteínas em CN, SN e SNI, sendo essas as proteínas exclusivamente presentes nesses tratamentos. E ainda, as identificações exclusivas presentes nas interseções entre CN&SN, SN&SNI, CN&SNI e geral (CN&SN&SNI). As identificações consideradas foram aquelas que apresentavam peptídeos exclusivos para o grupo de proteína e considerando parcimônia máxima.

As proteínas identificadas foram atribuídas a suas respectivas: função molecular (*Molecular Function* – MF), processo biológico (*Biological Process* – BP) e onde são encontrados como componentes celulares (*Cellular Component* – CC) através da ferramenta de análise de lista de genes (*GENE LIST ANALYSIS*) do ‘*The PANTHER classification system*’ (PANTHER v.14.0 - www.pantherdb.org) (MI; MURUGANUJAN; EBERT; *et al.*, 2019; MI; MURUGANUJAN; HUANG; *et al.*, 2019). Esta é uma ferramenta oficial do *GENE ONTOLOGY* (GO), que faz atribuição de família e subfamílias em termos do GO de MF, BP e CC (ASHBURNER *et al.*, 2000; CARBON *et al.*, 2019). Foram usados o banco de dados de *Triticum aestivum* da plataforma NCBI nr.

Ainda análises de dados foram feitas através da plataforma STRING v.11.0 (www.string-db.org) (SZKLARCZYK *et al.*, 2019). Esta plataforma além de inferir interação proteína-proteína também pode ser usada para atribuição de possíveis anotações para as proteínas não caracterizadas ou caracterizadas parcialmente. Para este último a função de mapeamento (*mapping*) foi usada a partir dos FASTAS das proteínas de cada tratamento acessados através do UNIPROT (*Retrieve/ID mapping*) e organizados em arquivos txt. Foi realizada a busca utilizando o banco de dados da plataforma NCBI para trigo (Wheat – *Triticum aestivum*; identificador taxonômico: 4565), milho (Maize - *Zea mays*; identificador taxonômico 4577) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*; identificador taxonômico 3702 – setembro de 2020).

Os critérios de maior identidade e diferença de entre os *bitscore* menor que 10% foram usados para selecionar a melhor anotação. Não sendo consideradas anotações de proteínas também não caracterizadas nos bancos de dados, se em outro banco de dados houvesse anotação e *bitscore* considerável.

Para busca de rede de interação proteína-proteína (IPP), foram usados os dados de FASTA agrupados nos tratamentos e suas interseções, e utilizando o banco de dados de *Triticum aestivum*. Foram apenas considerados os nós ou pontos de rede conectados (nós desconectados não foram considerados) diretamente por linhas ou arestas. O algoritmo usado pretende indicar associações específicas e significativas, isto é, de proteínas que contribuem conjuntamente para uma função compartilhada; o que não significa necessariamente que eles estejam fisicamente vinculados um ao outro). O nível de confiança utilizado foi estabelecido como alto (0.7). Foi estabelecido que as fontes de busca de informações de rede de interação proteína-proteína fossem aquelas encontradas em banco de dados de rede (linha azul clara - *database*), as encontradas em banco de dados experimentais (linha de cor rosa – *experimental data bank*), as encontradas em referências do PubMed - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> (linhas de cor amarela - *textmining*) e aquelas encontradas como co-expressão (linha de cor preta - *coexpression*).

4 RESULTADOS

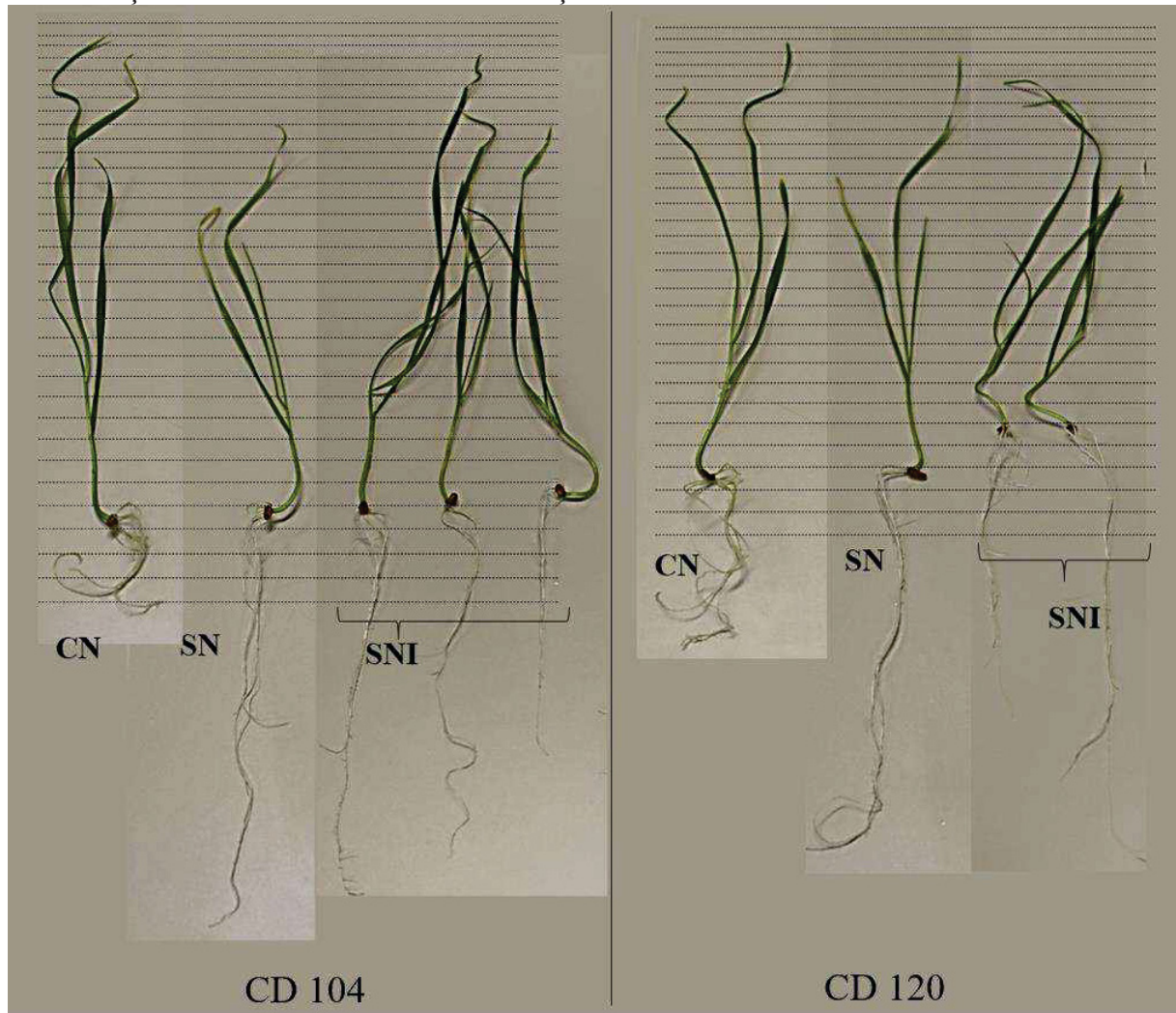
4.1 Avaliação de crescimento vegetal

As plantas de trigo, de ambas cultivares, nos tratamentos CN, SN e SNI apresentaram ao final dos 21 dias 3 folhas (FIGURA 1), caracterizando o estágio de crescimento 13 (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974). No entanto, as plantas de ambas as cultivares que cresceram no meio de cultivo, meio MS sem fonte de sacarose e com fontes de N (tratamento CN), apresentaram folhas maiores e mais verdes, comparado aos demais meios de cultivo [isto é, meio MS sem sacarose e sem fontes de N (tratamento SN) e meio MS sem sacarose, sem fontes de N e inoculado com a bactéria *H. seropedicae* SmR1 (tratamentos SNI)]. As plantas do tratamento SN apresentaram, além do amarelamento, descoloração nas pontas das folhas e crescimento levemente retardado sem influenciar no estágio de desenvolvimento. As plantas no tratamento SNI não apresentaram a mesma descoloração das pontas.

Os resultados obtidos para massa fresca, seca e comprimento da parte aérea estão apresentados na FIGURA 2. Observou-se que no tratamento CN, tanto massa fresca (m.f.) como massa seca (m.s.) (FIGURA 2A) de ambas cultivares, apresentaram médias superiores significativamente aos demais tratamentos, e os tratamentos SN e SNI foram iguais entre si. E ainda observa-se que as plantas de ambas cultivares dos tratamentos SN (CD104: 11,8%; CD120: 12,6%) e SNI (CD104: 12,5%; CD120: 12%), revelaram maior porcentagem de biomassa (calculado: $(m.s./m.f.) \times 100$), ao comparar com as plantas do tratamento CN (FIGURA 2A). Sendo que o tratamento de SNI de CD104 apresentou maior porcentagem de biomassa comparando-se aos demais tratamentos para essa cultivar.

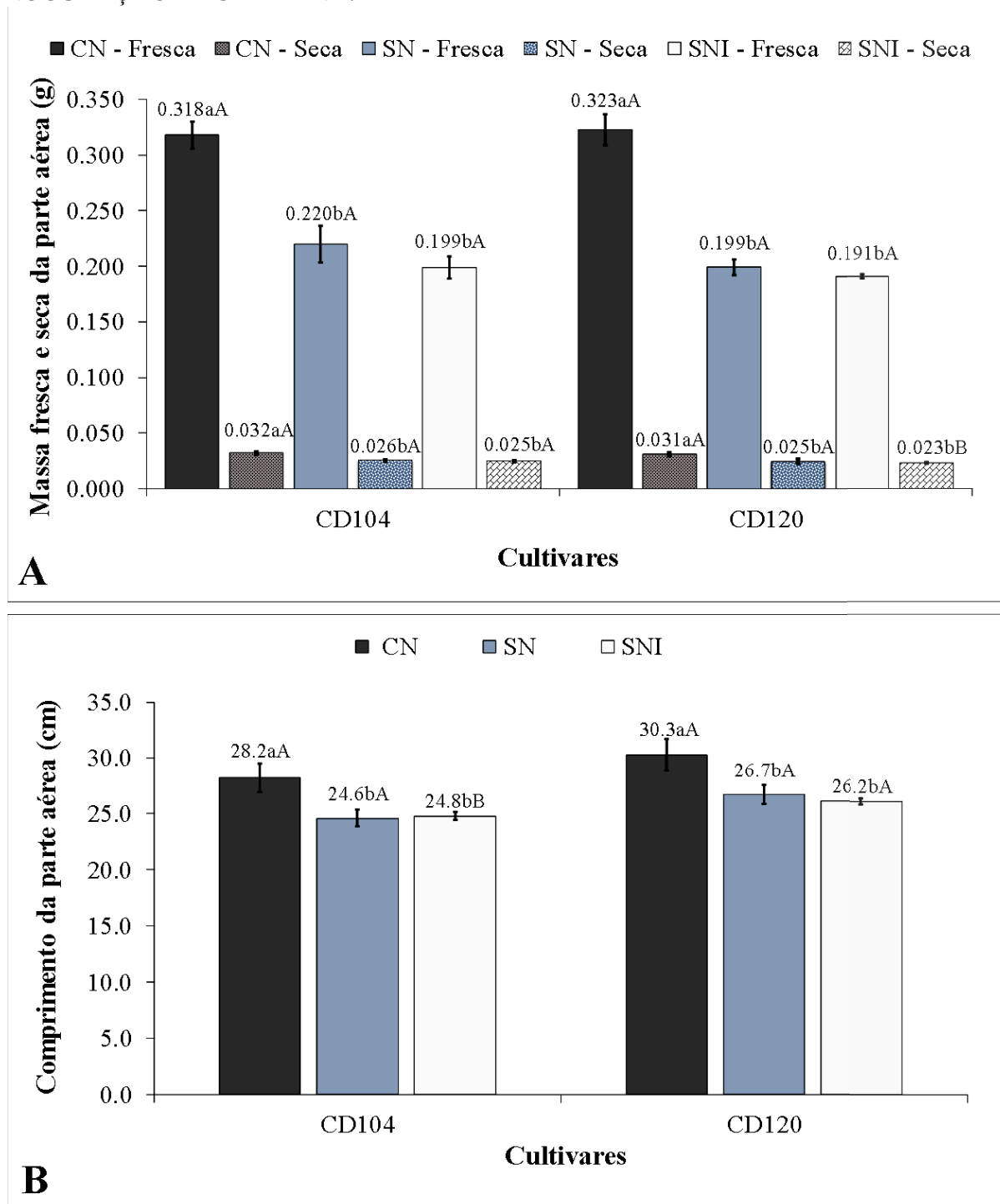
Para comprimento da parte aérea (FIGURA 2B), ambas cultivares apresentaram as maiores médias nas plantas do tratamento CN se comparado aos demais tratamentos. As plantas dos tratamentos SN e SNI não diferiram entre si. No entanto, nota-se que, plantas de SNI da cultivar CD120 (26,2 cm), são significativamente maiores que as plantas CD104 (24,8 cm) desse mesmo tratamento. Estes dados explicam o observado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - IMAGEM DAS PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.



FONTE: O autor (2020). Plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) das cultivares CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. As linhas indicam escala decimal.

FIGURA 2 – MASSA FRESCA, SECA E COMPRIMENTO DA PARTE AÉREA DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.



FONTE: o Autor (2020). Massa fresca e seca (g) (A), comprimento da parte aérea (cm) (B). Plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) das cultivares CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 ($\pm$ 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Colunas seguidas de letra minúscula se refere a análise entre tratamentos em uma mesma cultivar, e maiúscula se refere a análise entre cultivares num mesmo tratamento. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) $n=3$. Massa fresca CV= 5,60%, massa seca CV= 6,07%, comprimento da parte aérea CV= 4,25%.

Através da análise de PCR das amostras bacterianas obtidas dos meios de cultura oriundos do tratamento SNI, foi possível acompanhar as inoculações e confirmar a ausência de contaminação aplicada nos inóculos (FIGURA 3). Na figura está apresentado a imagem do gel de agarose com a presença da banda referente a região pertencente ao rDNA 16S, específica da bactéria *H. seropedicae* SmR1 (de 76pb).

4.2 *Determinação do índice de nitrogênio, clorofilas, flavonoides e antocianinas*

Na FIGURA 4, são apresentados gráficos dos valores de índices de nitrogênio (NBI)(A) e clorofila (CHL) (B). Foi possível observar que os índices NBI, de ambas as cultivares, e CHL de CD104, foram superiores no tratamento CN em relação aos demais tratamentos (SN e SNI). No entanto, o tratamento SNI da cv. CD120 apresentou médias significativamente iguais ao tratamento CN e superior ao SN para CHL.

A cv. CD104 apresentou dados de NBI e CHL superiores aos de CD120 nos tratamentos CN e SN, e iguais para SNI. É possível observar que o NBI do tratamento SNI da cv. CD120, foi significativamente superior (64%) ao tratamento SN e igual ao tratamento SNI para a cv. CD104 (FIGURA 4A). Os dados de CHL apresentaram o mesmo comportamento (FIGURA 4B).

A quantificação de flavonoides e antocianinas estão apresentados em gráfico na FIGURA 5. Observa-se que os níveis de flavonoides foram superiores nos tratamentos SN e SNI em relação ao tratamento CN para as duas cultivares (FIGURA 5A). Em relação as antocianinas, observou-se que não houve alteração em seus níveis na cv. CD104 entre os tratamentos, entretanto, uma queda significativa no tratamento SNI da cv. CD120 em relação ao tratamento CN (FIGURA 5B).

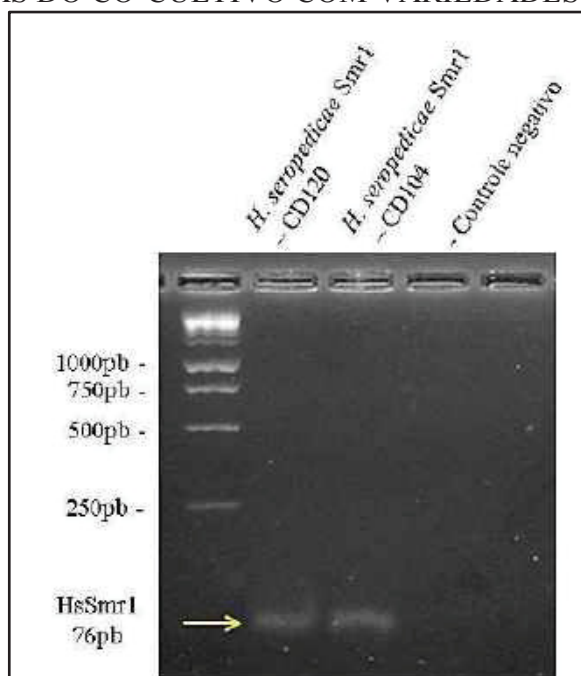
4.3 *Fluorescência da Clorofila*

Para os resultados referentes as análises da fluorescência realizadas na ausência de luz (TABELA 2), notou-se que no tratamento SNI para ambas cv.s, os valores de fluorescência inicial (F_0) são iguais ao tratamento SN e inferiores ao tratamento CN. Porém, houve uma diminuição da fluorescência máxima (F_m) no tratamento SNI da cv. CD104 comparado ao tratamento CN, e não houve diferença significativa entre tratamentos para a cv. CD120 nessa variável (TABELA 2).

No entanto, diminuições dos valores de F_o não influenciaram na fluorescência variável (F_v), mas refletiram num aumento significativo na máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m) e na fluorescência mínima variável (F_v/F_o) nos tratamentos SNI e SN para a cv. CD120 em relação ao tratamento CN. Referente a cv. CD104, alterações em F_o e F_m influenciaram na F_v , onde o tratamento SN apresentou valores significativamente inferiores ao controle CN, o que não aconteceu no tratamento SNI que foi igual aos tratamentos CN e SN. Entretanto, a diminuição de F_m não afetou a F_v/F_m e nem F_v/F_o do tratamento SNI, que foi igual ao tratamento CN e significativamente superior tratamento SN (TABELA 2).

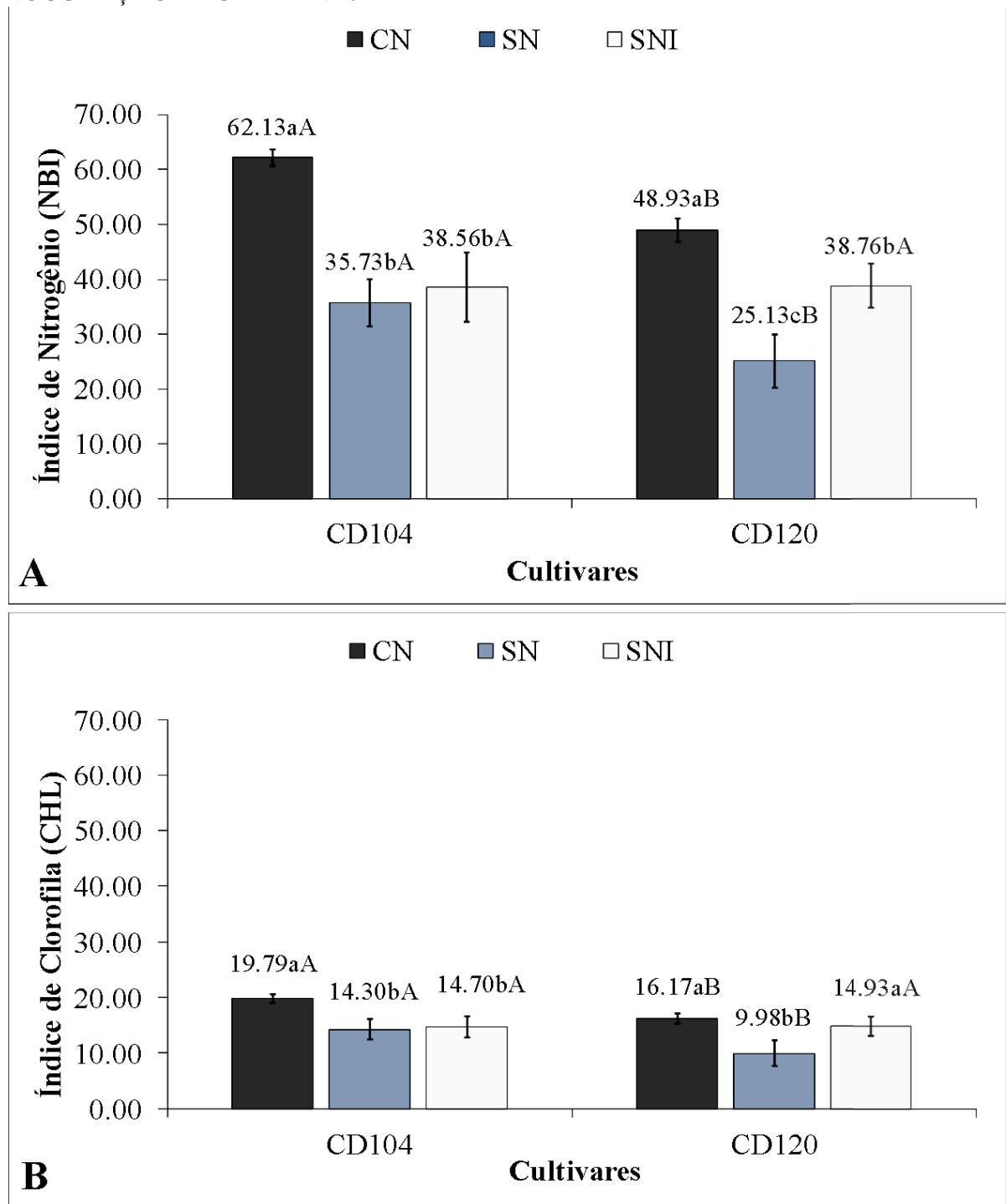
Quanto aos resultados das análises da fluorescência realizadas na presença de luz para a cv. CD104 verificou-se que o tratamento CN, apresentou valores de fluorescência estacionária na luz (F_s'), superiores aos do tratamento SN. Em relação ao tratamento SNI, para essa mesma variável, notou-se que foi igual a CN e SN. No entanto, para fluorescência máxima da folha adaptada a luz (F_m'), os tratamentos SN e SNI foram iguais entre si e inferiores que CN. Essas alterações em F_s' e F_m' vistos nos tratamentos SN e SNI, não influenciaram significativamente no rendimento quântico efetivo do PSII ($Y(II)$) nem na taxa de transporte de elétrons (ETR).

FIGURA 3 - IMAGEM DE GEL AGAROSE DO PRODUTO DE PCR DE AMOSTRAS DE BACTÉRIA ORIUNDAS DO CO-CULTIVO COM VARIEDADES DE TRIGO.



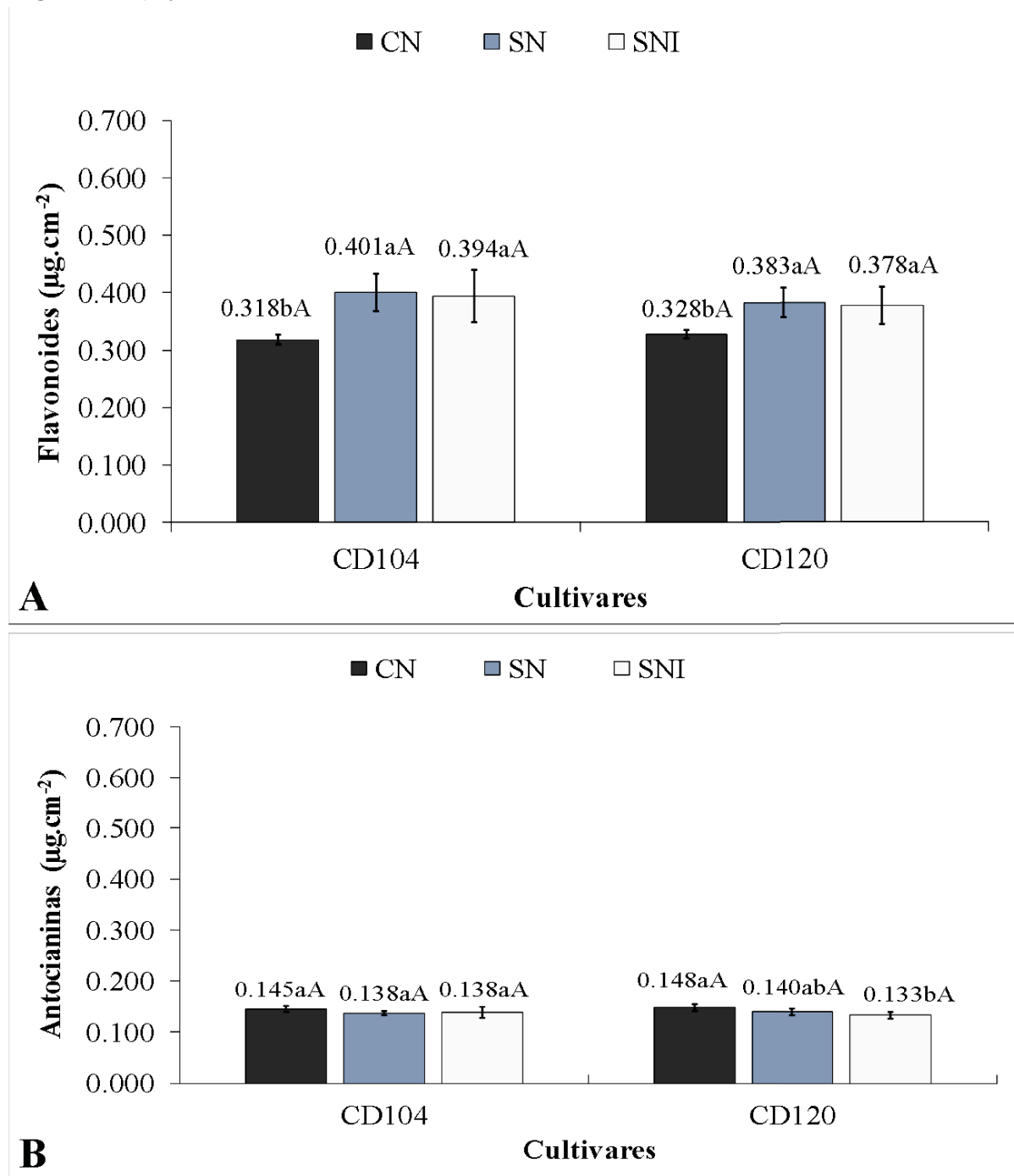
FONTE: O autor (2020). Amostras bacterianas (*Herbaspirillum seropedicae* Smr1) obtidas de meios de cultura MS líquido sem adição de sacarose e sem adição de fontes de nitrogênio, após co-cultivo *in vitro* de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) das cultivares CD104 e CD120, com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI) por 20 dias, e mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz. HsSmr1 76pb: região pertencente ao rDNA 16S de 76pb, específica da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* Smr1.

FIGURA 4 - ÍNDICE DE NITROGÊNIO (NBI) E ÍNDICE DE CLOROFILA (CHL) DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.



FONTE: o Autor (2020). Índice de nitrogênio – NBI (A) e índice de clorofila – CHL (B). Plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Liní) das cultivares CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 ($\pm$ 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Colunas seguidas de letra minúscula se refere a análise entre tratamentos em uma mesma cultivar, e maiúscula se refere a análise entre cultivares num mesmo tratamento. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) $n=6$. Índice de nitrogênio CV= 10,96%, índice de clorofila CV= 12,18%.

FIGURA 5 - DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES E ANTOCIANINAS DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.



FONTE: o Autor (2020). Determinação de Flavonoides (A) e Antocianinas (B). Plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) das cultivares CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a $24 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Colunas seguidas de letra minúscula se refere a análise entre tratamentos em uma mesma cultivar, e maiúscula se refere a análise entre cultivares num mesmo tratamento. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) $n=6$. Flavonoides CV= 8,60%, antocianinas CV= 4,86%.

TABELA 2 - FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA DE FOLHAS DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INOCULAÇÃO BACTERIANA.

Obtidas no escuro									
		Fo		Fm		Fv/Fm		Fv/Fo	
CD104	CN	579.3	aA	2610.5	aA	0.778	abA	3.51	abA
	SN	562.5	abA	2460.8	abA	0.771	bB	3.38	bB
	SNI	527.3	bA	2444.0	bA	0.784	aA	3.64	aA
CD120	CN	602.0	aA	2540.0	aA	0.763	bB	3.22	bB
	SN	524.5	bB	2410.5	aA	0.782	aA	3.61	aA
	SNI	510.7	bA	2441.2	aA	0.791	aA	3.79	aA
CV%		5.59		4.30		1.14		5.19	
Obtidas na Luz									
		Fs'		Fm'		Y(II)		ETR	
CD104	CN	250.3	aA	705.8	aA	0.650	aA	7.21	aA
	SN	208.5	bA	548.1	bA	0.615	aA	7.54	aA
	SNI	218.1	abA	586.9	bA	0.631	aA	7.19	aA
CD120	CN	280.4	aA	670.0	aA	0.578	bB	7.10	aA
	SN	203.3	bA	541.0	bA	0.628	aA	7.02	aA
	SNI	196.7	bA	585.92	bA	0.660	aA	7.33	aA
CV%		12.6		7.96		4.53		6.38	
Calculadas									
		NPQ		Y (NPQ)		Y(NO)		Fv	
CD104	CN	2.70	bA	0.259	bB	0.096	aB	2031.2	aA
	SN	3.49	aA	0.296	aA	0.085	bA	1898.3	bA
	SNI	3.20	aA	0.283	abA	0.089	abA	1916.7	abA
CD120	CN	2.80	bA	0.308	aA	0.110	aA	1938.0	aA
	SN	3.47	aA	0.292	aA	0.085	aA	1886.0	aA
	SNI	3.21	abA	0.255	bA	0.080	bA	1930.5	aA
CV%		9.24		7.84		8.76		4.55	

FONTE: o Autor (2020). No escuro: Fluorescência mínima da folha adaptada ao escuro (Fo), Fluorescência máxima da folha adaptada ao escuro (Fm), Máxima eficiência quântica do PSII (Fv/Fm), Fluorescência mínima variável (Fv/Fo); Na presença de luz: Estado estacionário da fluorescência na presença de luz (Fs'), Fluorescência máxima na presença da luz (Fm'), Rendimento quântico efetivo do PSII (Y(II)), Taxa de transporte aparente de elétrons (ETR); Calculados: Extinção (quenching) fotoquímica (Y(NO)= Fs'/Fm), Extinção (quenching) não-fotoquímica (Y(NPQ)= (Fs'/Fm')-(Fs'/Fm)), Extinção (quenching) não-fotoquímica de "Stern-Volmer" (NPQ= (Fm-Fm')/Fm) e Fluorescência variável (Fv). Plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) das cultivares CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Colunas seguidas de letra minúscula se refere a análise entre tratamentos em uma mesma cultivar, e maiúscula se refere a análise entre cultivares num mesmo tratamento. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p≤ 0,05) n=6.

Em relação a cv. CD120, observou-se uma resposta diferente ao da cv. CD104, onde houve uma diminuição nos valores de F_s' e F_m' nos tratamentos SN e SNI, se comparados ao CN. Essas alterações, influenciaram significativamente no aumento do rendimento quântico efetivo do PSII para ambos os tratamentos quando comparado ao CN, sem gerar alterações na ETR (TABELA 2).

Relacionado aos resultados obtidos para as extinções fotoquímicas ($Y(NO)$) e não-fotoquímicas (NPQ e $Y(NPQ)$), observou-se que para a cv. CD104, houve um aumento na extinção da fluorescência não-fotoquímica (NPQ) nos tratamentos SN e SNI, quando comparados ao tratamento CN. Esse aumento também ocorreu em $Y(NPQ)$, no tratamento SN quando comparado ao controle CN, porém o dado para o tratamento SNI foi igual a CN e SN. Em relação a extinção fotoquímica ($Y(NO)$), observou-se uma queda significativa nos valores de SN em relação a CN, não visto em SNI que foi igual a CN e SN.

Para a cv. CD120, verificou-se que, assim como para a cv. CD104, houve um aumento de NPQ no tratamento SN em relação ao tratamento CN. No tratamento SNI, não houve alterações significativas, sendo igual aos tratamentos CN e SN. Entretanto, em $Y(NPQ)$ e $Y(NO)$, ambos tratamentos CN e SN obtiveram a mesma resposta, mas houve uma queda significativa na resposta de SNI.

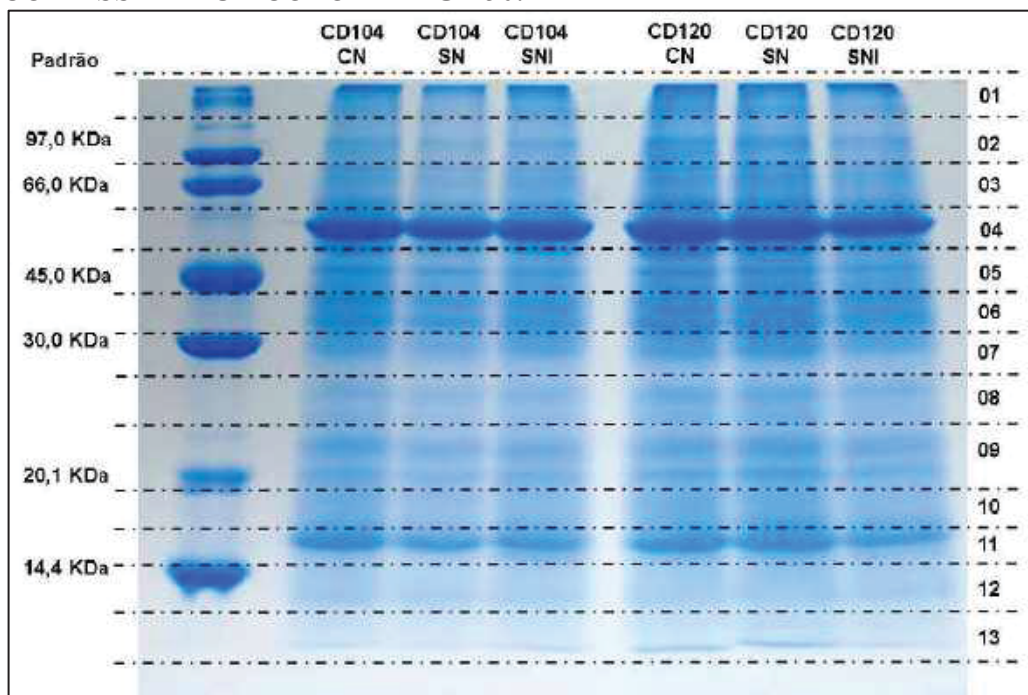
4.4 Extração de proteínas

Dois protocolos de extração de proteínas foram comparados entre si (VASCONCELOS *et al.*, 2005) e (CHEN, YU *et al.*, 2014). Após a comparação de perfil em SDS-PAGE descontínua, foi concluído que o protocolo proposto por Chen *et al.* (2014) foi mais eficiente (dados não mostrados).

Após obtidos os extratos proteicos, precipitados, lavados e secos até peso constante, estes foram pesados para o preparo de soluções com 4 mg.mL^{-1} e aplicação em SDS-PAGE descontinuado. Na FIGURA 6, está apresentada a imagem de um dos géis com uma réplica de todas as amostras, isto é, de cada cultivar nas três condições de tratamento. Ao total 4 géis foram necessários (um para cada réplica biológica) para obter amostras para análise por espectrometria de massas.

A FIGURA 6 também apresenta como o gel de eletroforese foi dividido/cortado por cada amostra, para seguir o protocolo de descoloração, redução e carboximetilação dos resíduos de cisteína nas proteínas, tripsinólise e extração de peptídeos.

FIGURA 6 - IMAGEM DO PERFIL DE SDS-PAGE DESCONTÍNUO A 12% E CORADO COM COMASSIE BLUE COLOIDAL G-250.



FONTE: o Autor (2020). Amostra proteica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) das cultivares CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 ($\pm$ 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Cada lane recebeu 80µg de proteína. Linhas tracejadas correspondem aos cortes realizados no gel/ lane de amostra para extração das proteínas e identificação por espectrometria de massas. O padrão de peso molecular utilizado foi LMW calibration kit for SDS electrophoresis da GE Healthcare. n=4.

4.5 Análise proteômica

Os peptídeos extraídos foram analisados por espectrometria de massas do tipo nanoLC-Q-ToF, e os dados foram processados pelo software PatternLab For Proteomics (versão 4.1.1.18) (BARBOZA *et al.*, 2011; CARVALHO, PAULO C *et al.*, 2012, 2016), considerando a presença de proteínas que apresentassem peptídeos identificados em pelo menos 3 das 4 replicatas biológicas. Assim, foram identificadas um total de 1015 e 1048 proteínas diferentes nas cv.s CD104 e CD120 respectivamente, do conjunto dos tratamentos.

Além das proteínas totais, foi possível selecionar proteínas em que a identificação considerou a presença peptídeos específicos, assim sendo foram reunidas 194 proteínas na cv. CD104 e 199 na cv. CD120. Esta forma de seleção de dados foi usada para garantir resultados robustos.

Para a análise dos dados e avaliação dos tratamentos, um diagrama de Venn para cada cv, foi gerado pelo software PatternLab (FIGURA 7), que agrupou as proteínas presentes

exclusivamente em cada tratamento para cada cultivar, nas interseções dos tratamentos, e em grupo de interseção geral de cada cultivar. Assim, pôde ser comparada e discutida a fisiologia pelas proteínas presentes como respostas das cultivares e tratamentos. As identidades das proteínas (IDs) agrupadas nos diagramas de Venn (FIGURA 7), foi usada para compor tabelas contendo as identificações. As proteínas exclusivas e presentes em cada tratamento de cada cultivar, estão apresentadas nas TABELA 3 a 8. As interseções dos tratamentos de cada cultivar são apresentadas nas TABELAS SUPLEMENTARES 1 a 8. É importante ressaltar que as IDs são do banco de dados de *T. aestivum*, baixados do UNIPROT (CONSORTIUM, 2019), no mês de março de 2020. O banco de dados do UNIPROTKB sofre atualizações periódicas e, portanto, podem ocorrer alterações em relação a ID de cada proteína presente nas tabelas, especialmente quando IDs são retiradas do banco de dados.

De acordo com os diagramas de Venn apresentados na FIGURA 7, a cv. CD104 apresentou 162, 168 e 164 proteínas nos tratamentos CN, SN e SNI e na cv. CD120, 185, 166 e 156 proteínas. As proteínas presentes exclusivamente na cv. CD104 foram 12, 9 e 8 e na cv. CD120 foram 21, 8 e 1, respectivamente nos tratamentos CN, SN e SNI. Para as identificações presentes em comum entre os tratamentos, isto é, nas interseções dos tratamentos, foram observadas na cv. CD104, 9, 15 e 6 proteínas e na cv. CD120, 14, 5 e 11, respectivamente, nas interseções entre CN&SN, SN&SNI e CN&SNI. As proteínas existentes em comum entre todos os tratamentos, para as cv.s CD104 e CD120, foram 135 e 139, respectivamente (FIGURA 7). Dentre todas as proteínas com peptídeos específicos identificadas nas cv.s CD104 e CD120, quase 50% ainda não estão caracterizadas, ou seja, não tem função conhecida e estão descritas na tabela como proteínas não caracterizadas ou apenas apresentam descrição de domínios (TABELA 3 a 8 e TABELA SUPLEMENTAR 1 a 8).

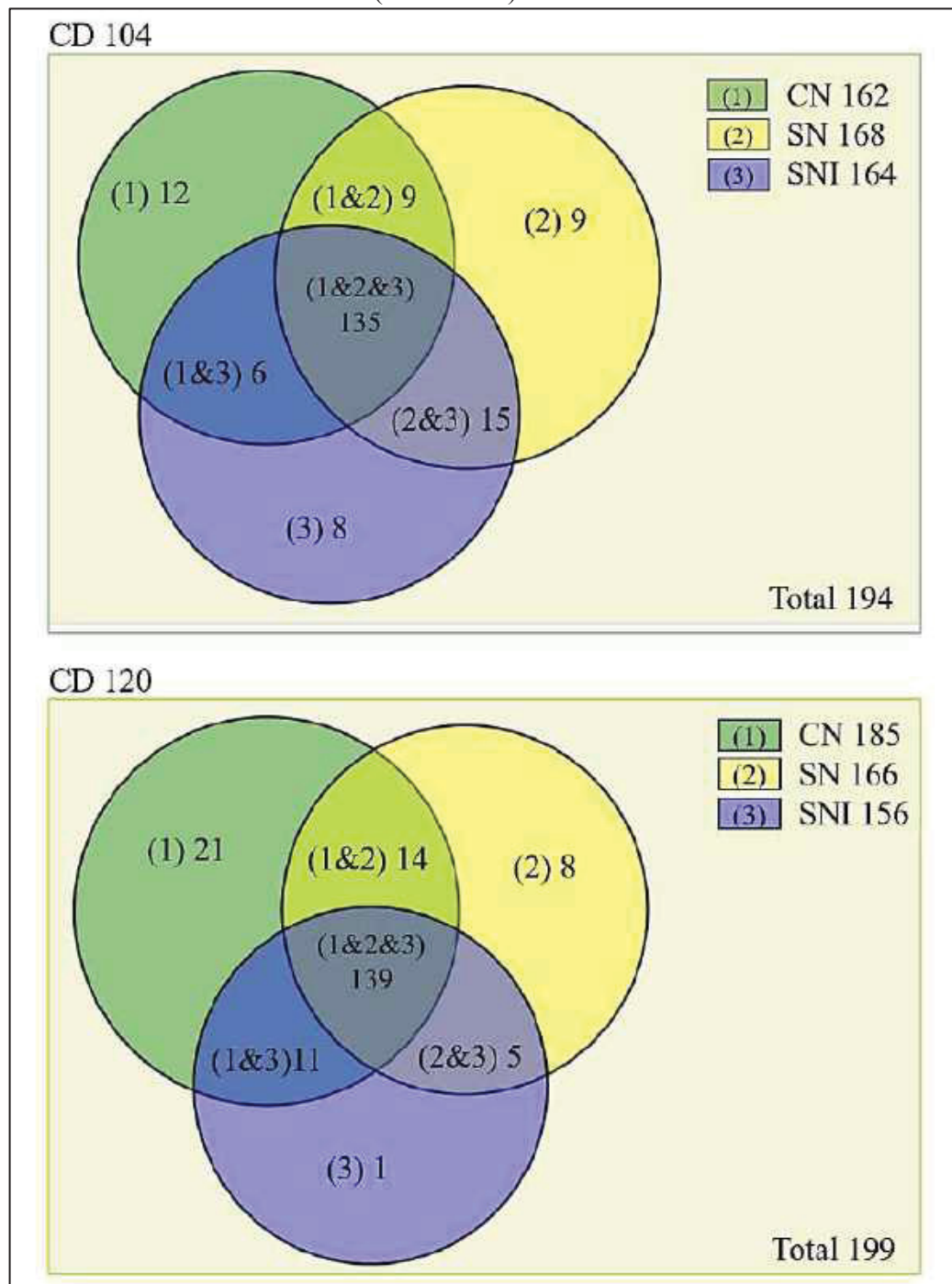
Identidades de proteínas oriundas de grupo de máxima parcimônia foram incluídas nas tabelas de dados. Neste, as proteínas funcionalmente relacionadas são agrupadas para melhorar a compreensão dos resultados. Isto porque uma lista de várias IDs pode ser oriunda das identificações por peptídeos em espectros LC – MS / MS e a análise crítica de dados proteômicos é necessário, especialmente quando se trata de banco de dados grande como o do trigo. Então, “como uma sequência de peptídeo pode ser mapeada para várias proteínas em um banco de dados, a montagem de proteínas pode superestimar substancialmente o número de proteínas encontradas nas amostras” (ZHANG, BING; CHAMBERS; TABB, 2007) assim sendo, consideradas IDs ou grupos de proteínas a partir de peptídeos exclusivos daquele grupo de máxima parcimônia ou proteína.

4.5.1 Resposta da cv. de trigo CD104 nos diferentes tratamentos

Proteínas (ou grupos de proteínas) expressas de modo exclusivo na cv. CD104 no tratamento CN, somam 12 proteínas distintas ou IDs do UNIPROT- ID (TABELA 3). Destas 12, apenas 5 apresentam alguma descrição de função como proteína do choque térmico 90 (A0A3B6KHN4), cisteína sintase (P38076), cetol-ácido redutoisomerase (A0A3B5Z5S1), 4-hidroxi-7-metoxi-3-oxo-3,4-di-hidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il glucosídeo beta-D-glucosidase 1a cloroplástica (GLU1A) (Q1XIR9) e lipoxigenase (A0A3B6KP36). Já no tratamento SN (TABELA 4), foram observadas 9 IDs, sendo destas 5 proteínas não caracterizadas e 4 descritas como uma anidrase carbônica (A0A3B6RQ40), cisteína sintase (A0A3B6EB15), subunidade V do centro de reação do fotossistema I cloroplástica (PSI-G) (A0A3B6MT63) e nucleosídeo difosfato cinase (A0A3B6JED8).

Em relação as enzimas cisteínas sintases identificadas nesses dois tratamentos, a presente em CN, trata-se de uma proteína do banco de dados do SwissProt, com ID P38076 enquanto a presente no tratamento SN, A0A3B6EB15, refere-se a uma proteína em que foi atribuída a função por homologia. O alinhamento das sequências mostra que entre elas o *score* é de 1235, com cobertura de 73,5%, e 61,2% de identidade, sendo que P38076 e A0A3B6EB15, apresentam 325 e 389 aminoácidos, respectivamente. A maior parte da diferença se encontra na região N-teminal. Desta forma podem ter a mesma atividade, porém oriundas de expressões distintas (FIGURA 8).

FIGURA 7 - DIAGRAMA DE VENN GERADO A PARTIR DA ANÁLISE DOS RESULTADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM PEPTÍDEOS ESPECÍFICOS, PELO SOFTWARE PATTERNLAB (V.4.1.1.18).



FONTE: o Autor (2020). Análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) das cultivares CD104 e CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

TABELA 3 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD104** PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS COM NITROGÊNIO (CN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais relacionadas em grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/ proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6QJ10	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G07938 1_P01	86	1006.5	NIR	Ferredoxina - nitrato redutase, cloroplástico
2	A0A3B6KHN4	Proteína do choque térmico 90		3702.AT5G56010.1	87	1016.1	HSP81-3	Proteína de choque térmico 90-3
3	A0A3B6RA72	Proteína contendo domínio VWFA	A0A3B6I7E8, A0A3B6TB53, A0A3B6T7D9	4577.GRMZM2G11056 7_P01	48	409.1		Família de proteínas <i>Zinc finger</i> (tipo C3HC4)
4	A0A3B5ZTJ6	Proteína não caracterizada		3702.AT1G06950.1	53	273.5	TIC110	Translocon 110, membrana interna do cloroplasto
5	P38076	Cisteína sintase		4565.Traes_5BS_1AC8 D3009.2	98	620.5	CYS1	Cisteína sintase
6	A0A3B6I7E8	Proteína contendo domínio VWFA		4577.GRMZM2G11056 7_P01	49	407.9		Família de proteínas <i>Zinc finger</i> (tipo C3HC4)
7	A0A3B5Z5S1	Cetol-ácido redutoisomerase		4577.GRMZM2G00438 2_P01	86	993.4	KARI	Cetol-ácido redutoisomerase

8	A0A3B6AS69	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM5G85677 7_P01	92	156.4	PSBC	Proteína CP43 do centro de reação do fotossistema II
9	Q1XIR9	4-hidroxi-7-metoxi-3-oxo-3,4-di-hidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il glucosídeo beta-D-glucosidase 1a, cloroplástico	4565.Traes_2AL_AEB1 1A672.1	93	1103.2	GLUID	Beta-glucosidase 1d
10	A0A3B6UD03	Proteína não caracterizada	A0A3B6MJL1, A0A3B6HU90, A0A3B6ITI8, A0A3B6DRJ7	99	270.4	ATPE	Cadeia épsilon ATP sintase cloroplástica
11	A0A3B6PRH7	Proteína não caracterizada	A0A3B6PQS3, A0A3B6NUX9	80	999.2	NIR	Ferredoxina - nitrato reductase, cloroplástico
12	A0A3B6KP36	Lipoxigenase	4565.Traes_5BL_304F AFA26.1	101	1731.8	LOX	Lipoxigenase

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CDI04, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose com nitrogênio (CN) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*T. aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arábido (pse) (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

7	A0A3B6JED8	Proteína contendo domínio PsbP	3702.AT3G55330.1	63	236.9	PPL1	Proteína semelhante a PsbP, cloroplástica;	1
8	A0A3B6MNV5	Nucleosídeo difosfato quinase	4565.Traes_5DS_922F3 F6EA.1	98	416.8	NDK	Nucleosídeo difosfato quinase	
9	A0A3B6D5X5	Proteína semelhante a germin	3702.AT5G20630.1	60	220.3	GER3	Subfamília 3 da proteína semelhante a germin, membro 3;	3

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CDI04, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose e sem fonte de nitrogênio (SN) mantidas em sala de crescimento a 24 ($\pm$ 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*T. aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arábidoopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA 5 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD104 PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA (*Herbaspirillum seropedicae* Smr1) (SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.**

item	ID UNIPROT	Descrição	ID adicionais em relação a máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	Símbolo	Anotação STRING
1	A0A3B6MT74	Proteína contendo domínio CYTB_NTER		4565.Traes_5BL_EEB8 BBB6B.1	97	443.4	PETB	Citocromo b6 componente
2	Q4JH28	Beta-1,3-glucanase		4577.GRMZM2G12503 2_P01	72	473.4	glucA (GHF17)	Beta-1,3-glucanase; Pertence à família da glicosil hidrolase 17
3	A0A3B5ZTF9	Proteína não caracterizada		4565.EPITAEP0000001 0048	91	363.6	PSAB	Apoproteína A2 da clorofila a do fotossistema I P700;
4	A0A3B6KQR8	Malato desidrogenase	A0A3B6LSL8, A0A3B6KMJ6, A0A3B6LTW4, A0A341V0H6	4565.Traes_5BL_8A99 D83A5.1	99	685.3	MDH	Malato desidrogenase
5	A0A3B6PND9	Proteína não caracterizada		4565.EPITAEP0000001 0026	98	1110.1	PSAA	apoproteína A1 da Clorofila a do fotossistema I P700
6	A0A3B5ZNM9	Peptidil-prolil cis-trans isomerase		4565.Traes_1DS_4FC8 BB7AD.1	97	372.1	PPIase	peptidil-prolil cis-trans Isomerase;
7	A0A341ZKM1	Proteína não caracterizada		4565.EPITAEP0000001 0026	99	1538.1	PSAA	apoproteína A1 da Clorofila a do fotossistema I P700

8	Q5YL57	Proteína de ligação a ToxA Ptr no localizada no cloroplasto 1	A0A2X0S4F1	4565.Traes_2BS_C7E82 EE7A.1	100	550.4	Thfl	Proteína 1 de ligação a Ptr localizada no cloroplasto; Proteína não caracterizada
---	--------	---	------------	-----------------------------	-----	-------	------	---

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, sem fonte de nitrogênio e inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*T. aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

FIGURA 8 - ALINHAMENTO ENTRE SEQUÊNCIAS DE DUAS CISTEÍNAS (P38076) E (A0A3B6EB15) PRESENTE EM DOIS TRATAMENTOS DA CULTIVAR CD104, CN E SN, RESPECTIVAMENTE.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

TR|A0A3B6EB15|A0A3B6EB15_WHEAT MAPWTPSPVAAAAQAQFGFSAARPAQARQAVALLPPLARRFPGSSLLAVNAPAPAPSWRR 60
SP|P38076|CYSK_WHEAT -----

TR|A0A3B6EB15|A0A3B6EB15_WHEAT HALATEVEGLNIADVDVTLIGKTPMVYLNKIVKGCVANVAAKLEIMEPCCSVKDRIGISM 120
SP|P38076|CYSK_WHEAT ---MGEASSPAIAKDVTELIGNTPLVYLNKVTGDCVGRVAAKLESMEPCCSVKDRIGISM 57
      *... ** *... ** *... ** *... ** *... ** *... **

TR|A0A3B6EB15|A0A3B6EB15_WHEAT ISDAEEKGLITPGKSVLVEATSGNTGIGLAFIAASRGYKLILTMPTSMEMRRVLLKAFG 180
SP|P38076|CYSK_WHEAT ITDAEEKGFIVPGKSVLIEPTSGNTGIGLAFMAAAKGYRLVLTMPASMSMERRIILKAFG 117
      *... ** *... ** *... ** *... ** *... ** *... **

TR|A0A3B6EB15|A0A3B6EB15_WHEAT AELVLTDAAKGMKALDKATEILNKTPNSYMLEQFDNPANPKVHYETTGPETWEDSKGKV 240
SP|P38076|CYSK_WHEAT AELILTDPLLGMKAVQKAEELAAKTPNSYILQQFENANPKIHYETTGPETWKGTTGKI 177
      *** ** *... ** *... ** *... ** *... ** *... **

TR|A0A3B6EB15|A0A3B6EB15_WHEAT DIFIGGIGTGGTISGAGRFLKEKNPDVKVIGVEPTESNILSGGKPGPHKIQIGIGAGFVPR 300
SP|P38076|CYSK_WHEAT DGLVSGIGTGGTITGTGKYLQEQNPNIKLYVEPTESAILNGGKPGPHKIQIGIGAGFIPG 237
      * :. *... ** *... ** *... ** *... ** *... ** *... **

TR|A0A3B6EB15|A0A3B6EB15_WHEAT NLDSDVLNEVIEISSDEAVETAKKLALQEGLLVGISGAAAAAAIKVAQRPENAGKLIVV 360
SP|P38076|CYSK_WHEAT VLDVDIIDETIQVSSDESIEMAKSLALKEGLLVGISGAAAAAAIKVAQRPENAGKLFVV 297
      ** *... ** *... ** *... ** *... ** *... ** *... **

TR|A0A3B6EB15|A0A3B6EB15_WHEAT VFPSFGERYLSSVLFQSIREECEKMEAEA 389
SP|P38076|CYSK_WHEAT VFPSFGERYLSSVLFHSIKKEAESMVE- 325
      ***** *... ** *... **

```

FONTE: o Autor (2020). Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) das cultivares CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio, mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. Alinhamento realizado na plataforma do UNIPROT/align (CONSORTIUM, 2019).

Quanto ao tratamento SNI na cv. CD104, das 8 proteínas identificadas, 4 não possuem as suas funções descritas e 4 tem funções descritas como beta-1,3-glucanase (Q4JH28), peptidil-prolil cis-trans isomerase (A0A3B5ZNM9), malato desidrogenase (A0A3B6KQR8) e proteína 1 ligante de ToxA Ptr (sistema de transporte) localizada no cloroplasto (Q5YL57) (TABELA 5).

A distribuição dessas proteínas nas Funções Moleculares (*Molecular Function* - MF), Processos Biológicos (*Biological Process* - BP) e Componente Celular (*Cellular Component* - CC) foi levantada na base de dados do *GENE ONTOLOGY* (GO) (ASHBURNER *et al.*, 2000; CARBON *et al.*, 2019) através da plataforma Panther v. 14.0 (MI; MURUGANUJAN; EBERT; *et al.*, 2019).

Em relação ao tratamento CN na cv. CD104, das 12 ID, duas não foram encontradas no banco de dados do trigo (*T. aestivum*) utilizado na busca pelo Panther v.14.0. Das demais 10 IDs, uma não apresentou classificação no GO de MF, duas no GO de BP e 5 no GO de CC.

Portanto foram correlacionadas 9, 8 e 5 IDs entre as diversas MF, BP e CC, respectivamente (FIGURA 9).

No que se refere a MF de nível parental de complexidade (FIGURA 9A), algumas IDs apresentaram maior número de acertos (*hits*) em atividade oxidoredutase (GO: 0016491), ligação do cluster ferro-enxofre (GO: 0051536), ligação de íons metálicos (GO: 0046872) e ligação de heme (GO: 00230037), sendo a maioria proteínas não caracterizadas nesse banco de dados. Entretanto, nos níveis secundários, ou mais específicos, encontramos a atividade de beta-D-glucosidase de glicosídeo DIMBOA (GO: 0102726), atividade da cetol-ácido redutoisomerase (GO: 0004455), atividade da cisteína sintase (GO: 0004124) e atividade de dioxigenase (GO: 0051213).

Quanto a BP (FIGURA 9B), as IDs que apresentaram maior número de *hits*, indicaram que este grupo de proteínas está relacionada à processo de oxiredução (GO: 0055114) e processo biossintético de aminoácidos celular (GO: 0008652), seguido pela classificação mais específica em processo biossintético de cisteína a partir de serina (GO: 0006535), cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos (GO: 0009767), processo metabólico (GO: 0008152), processo biossintético de isoleucina (GO: 0009097), processo biossintético de ácidos graxos (GO: 0006633) e processo metabólico de carboidratos (GO: 0005975).

Em termos de CC (FIGURA 9C), ainda para o tratamento CN, as IDs se distribuíram em proteínas presentes no cloroplasto (GO: 0009507), como sendo especificamente do fotossistema (GO: 0009521) e do complexo de ATP sintase de transporte de prótons, núcleo catalítico F (1) (GO: 0045261). Também estão presentes CC do citoplasma (GO: 0005737) e da mitocôndria (GO: 0005739).

O tratamento SN da cv. CD104, das 9 IDs, duas não foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado pelo Panther v.14.0. Das demais (7 IDs), 2 não tiveram classificação no GO de MF e 3 em BP e CC. Portanto as demais IDs, 5 em MF e 4 em BP e CC apresentaram atribuições de GO (FIGURA 10).

Em MF de nível parental de complexidade (FIGURA 10A), as IDs, se distribuíram em várias MF com uma ID proteica em cada. Nos níveis secundários, encontramos atividade da cisteína sintase (GO: 0004124), atividade da glutathione desidrogenase (ascorbato) (GO: 0045174), atividade de hidrolase, hidrolisando compostos de O-glicosil (GO: 0004553) e ligação de íon zinco (GO: 0008270).

Referente a BF (FIGURA 10B), as IDs se distribuíram em vários grupos, sendo a classificação mais específica em processo biossintético de cisteína a partir de serina (GO: 0006535), desintoxicação de oxidante celular (GO: 0098869), exportação de subunidade

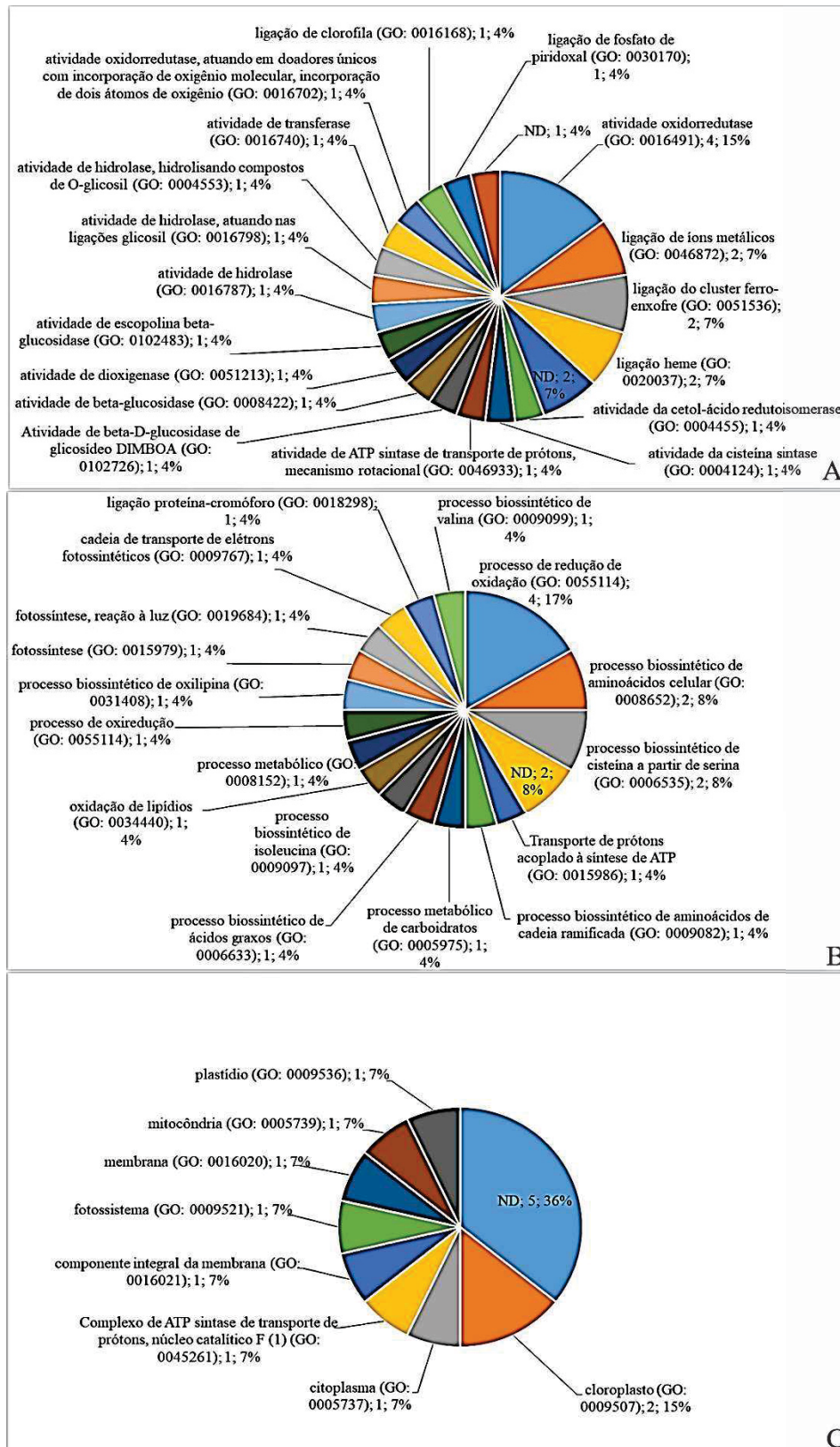
ribossômica do núcleo (GO: 0000054), glutationilação de proteínas (GO: 0010731) e fotossíntese (GO: 0015979). Em termos de CC, as IDs se distribuíram em GO mais específicos em proteínas da região extracelular (GO: 0005576), fator 3 do complexo de iniciação de tradução eucariótica (GO: 0005852), fotossistema I (GO: 0009522) e parede celular (GO: 0005618) (FIGURA 10C).

No tratamento SNI da cv. CD104, das 8 IDs, duas não foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado pelo Panther v.14.0. Das demais 6 IDs, duas não apresentaram classificação no GO de MF. Portanto em cada grupo foram correlacionadas, entre as diversas, 4 em MF, 6 em BP e CC (FIGURA 11).

As IDs que apresentaram *hits* em MF foram para ligação de íons metálicos (GO: 0046872), seguida da classificação secundária em atividades de transferência de elétrons (GO: 0009055) e atividade de hidrolase, hidrolisando compostos de O-glicosil (GO: 0004553) (FIGURA 11A). Quanto a BP (FIGURA 11B), esta apresentou maior número de *hits* em fotossíntese (GO: 0015979), seguido das classificações secundárias em processo metabólico (GO: 0008152), processo metabólico de carboidratos (GO: 0005975), cadeia de transporte de elétrons respiratórios (GO: 0022904), importação de proteína na membrana do tilacóide do cloroplasto (GO: 0045038), importação de proteína no estroma do cloroplasto (GO: 0045037) e montagem do fotossistema II (GO: 0010207).

Em termos de CC (FIGURA 11C), o maior número de *hits* foi em componente integral da membrana (GO: 0016021) com 4 IDs e em tilacóides (GO: 0009579) com 3 IDs, seguido de 1 ID em componente ancorado da membrana plasmática (GO: 0046658) e 1 ID em membrana tilacóide de cloroplasto (GO: 0009534).

FIGURA 9 – ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD104**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO COM NITROGÊNIO (CN), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor

(2020).

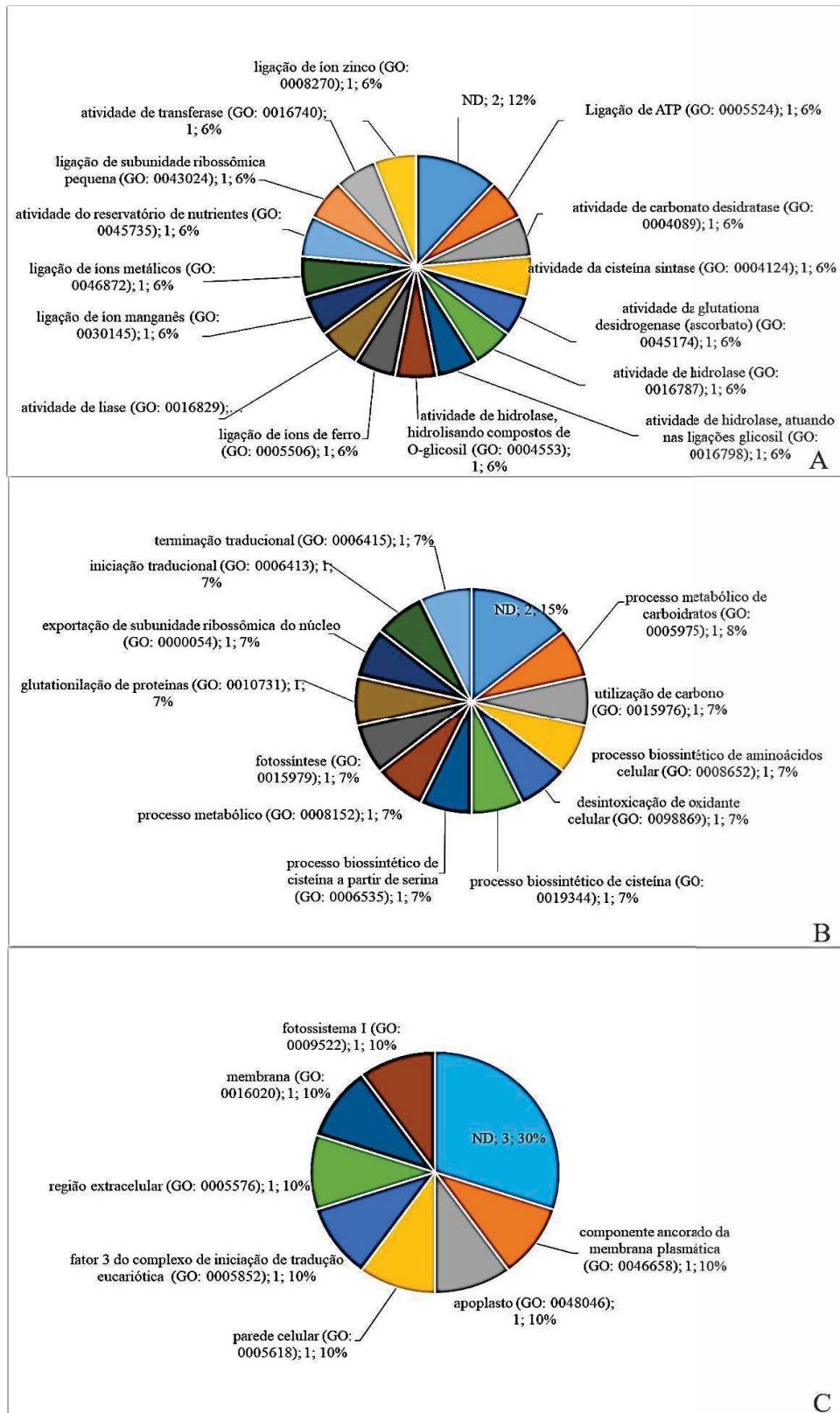
Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *GENE ONTOLOGY* (GO).

O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados no Pantherdb.

ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com nitrogênio (CN), mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

FIGURA 10 – ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD104**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SEM NITROGÊNIO (SN), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor

(2020).

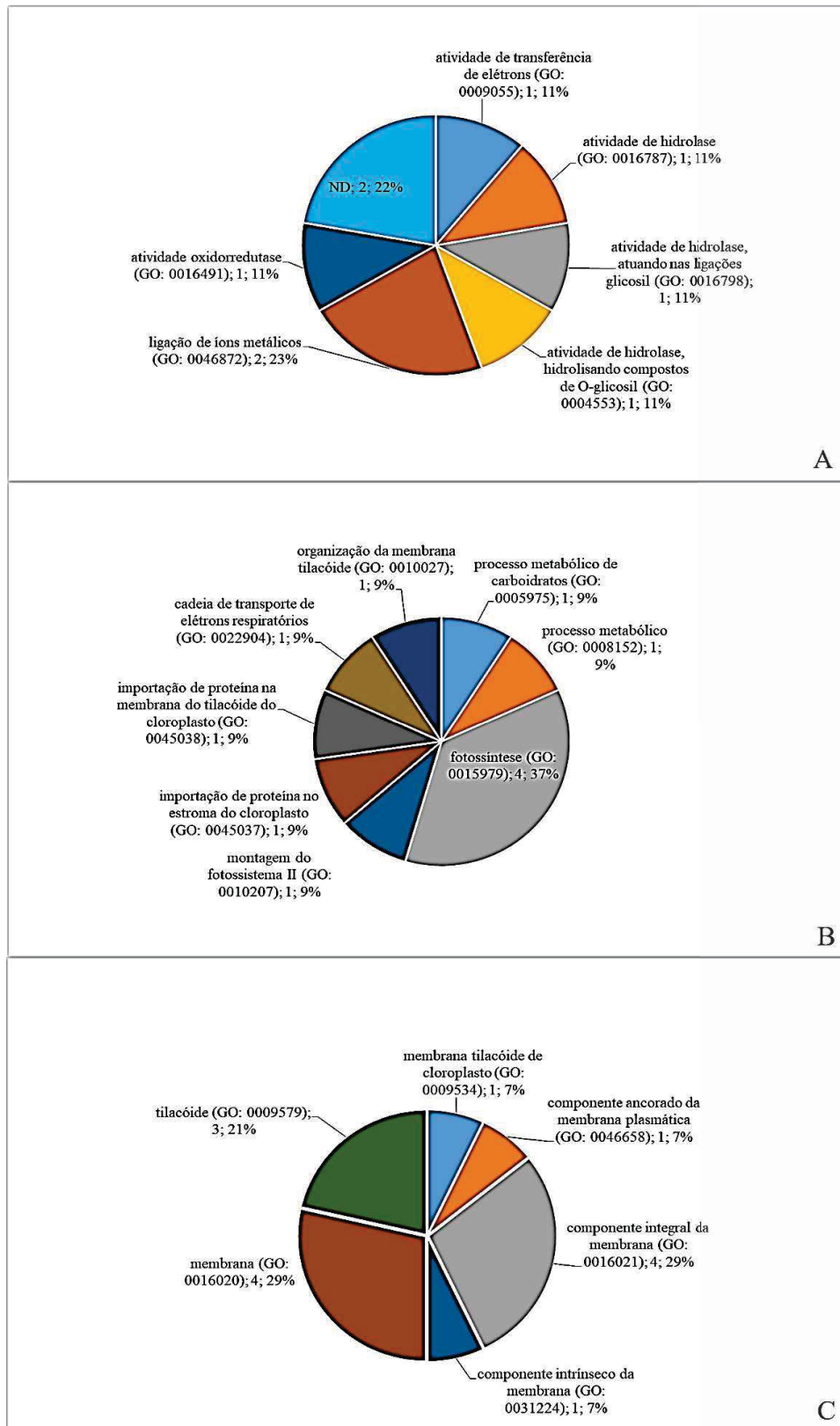
Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *GENE ONTOLOGY* (GO).

O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados no Pantherdb.

ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose e sem fonte de nitrogênio (SN), mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

FIGURA 11 – ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD104**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM BACTÉRIA (SNI), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor (2020).

Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos – BP (B) e Componentes Celulares – CC (C) da base de dados do *GENE ONTOLOGY* (GO).

O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados no Pantherdb.

ND corresponde a proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, sem fonte de nitrogênio e inoculadas com *Herbaspirillum seropadicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

A partir dos diagramas de Venn oriundos do software PatternLab (v.4.1.1.18), também foi possível verificar proteínas (ou grupos de proteínas) presentes exclusivamente nas interseções entre os tratamentos da cv. CD104 (FIGURA 7). Na interseção entre os tratamentos CN e SN (CN&SN) da cv. CD104, verificou-se 9 proteínas ou IDs do UNIPROT- ID (TABELA SUPLEMENTAR 1). Destas 9, apenas 2 se apresentaram caracterizadas em funções biológicas, sendo elas frutose-bisfosfato aldolase (A0A3B6RJK8) e anidrase carbônica (A0A3B6SS13). As demais IDs foram de proteínas não caracterizadas. Já, na interseção entre SN e SNI (SN&SNI), foram encontradas 15 proteínas ou identificações do UNIPROT- ID (TABELA SUPLEMENTAR 2). Destas 15, apenas 2 se apresentam caracterizadas em funções biológicas, sendo elas a cadeia alfa da tubulina (Q9ZRB7) e proteína 2 - carreadora ADP/ATP, mitocondrial (Q41630). As demais IDs foram de proteínas não caracterizadas.

Por fim, na interseção CN e SNI (CN&SNI), foram encontradas 6 proteínas distintas ou IDs do UNIPROT- ID (TABELA SUPLEMENTAR 3). Destas 6, apenas 3 se apresentam caracterizadas em funções biológicas, sendo elas: aminometiltransferase (A0A3B6CFK1), ATP sintase subunidade alfa (A0A3B6D6H2) e fosforibulocinase cloroplástica (P26302). As demais IDs foram de proteínas não caracterizadas.

Ao analisar os dados das interseções pela plataforma Panther v.14.0, notou-se que na interseção CN&SN cv CD104 (FIGURA SUPLEMENTAR 1), das 9 IDs identificadas no diagrama de Venn, 3 não foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado na busca feita pelo Panther v.14.0. Das demais 6 IDs, duas não apresentaram classificação no GO de MF e uma no GO de CC. Portanto 4, 6 e 5 IDs foram correlacionadas entre as diversas MF, BP e CC.

Em MF de nível parental de complexidade (FIGURA SUPLEMENTAR 1A), algumas IDs se apresentaram distribuídas em atividade de liase (GO: 0016829), atividade oxidoredutase (GO: 0016491), atividade transportador transmembrana de prótons (GO: 0015078), ligação de fosfato de piridoxal (GO: 0030170) e ligação FMN (GO: 0010181). Entre os níveis secundários, encontramos atividade transaminase (GO: 0008483), mais especificamente atividade glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase (GO: 0042286), e ainda atividade catalítica (GO: 0003824), atividade de carbonato desidratase (GO: 0004089), atividade de glicolato oxidase (GO: 0008891).

Considerando BP (FIGURA SUPLEMENTAR 1B), as IDs que apresentaram maior número de *hits* foram em importação de proteína no estroma do cloroplasto (GO: 0045037), seguido do processo biossintético de compostos contendo porfirina (GO: 0006779), processo de redução de oxidação (GO: 0055114), transporte de prótons acoplado à síntese de ATP (GO: 0015986), transporte de íons (GO: 0006811) e utilização de carbono (GO: 0015976).

Em termos de CC, (FIGURA SUPLEMENTAR 1C), as IDs apresentaram maior número de *hits* em cloroplasto (GO: 0009507) e TOC-TIC supercomplexo I (GO: 0061927), destacando ainda IDs presentes em complexo de ATP sintase de transporte de prótons, fator de acoplamento F (o) (GO: 0045263), componente integral de membrana (GO:0016021) e peroxissomo (GO: 0005777).

Ao analisar a interseção SN&SNI cv CD104, das 15 IDs, todas foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado na busca pelo Panther v.14.0, apesar do grande número de proteínas não caracterizadas neste banco de dados. Quatro não tiveram atribuições de BP e três não estão caracterizadas em CC. Portanto, em cada grupo de MF, BP e CC foram correlacionadas 15, 11 e 12 IDs (FIGURA SUPLEMENTAR 2).

Com um número maior de IDs identificadas nessa interseção (SN&SNI), várias MF puderam ser atribuídas (FIGURA SUPLEMENTAR 2A), se destacando, com maior número de *hits* em nível parental, ligação heme (GO: 0020037), atividade oxidoredutase (GO: 0016491) e atividade transportador transmembrana (GO: 0022857). Nos níveis secundários, encontramos atividade da álcool desidrogenase (NADP⁺) (GO: 0008106), alditol: atividade de NADP⁺ 1-oxidoredutase (GO: 0004032), atividade da peroxidase (GO: 0004601), atividade do transportador transmembrana de ATP (GO: 0005347), ADP/ATP: atividade antiporter (GO: 0005471), atividade da glutathione transferase (GO: 0004364), atividade GTPase (GO: 0003924), ligação de RNA (GO: 0003723) e constituinte estrutural do citoesqueleto (GO: 0005200), entre outras.

Referente a BP (FIGURA SUPLEMENTAR 2B), as IDs apresentaram maior número de *hits* em processo de oxiredução (GO: 0055114), desintoxicação de oxidante celular (GO: 0098869), resposta ao estresse oxidativo (GO: 0006979), transporte ATP (GO: 0015867) e fotossíntese (GO: 0015979), e ainda *hits* em processo catabólico de glicerol (GO: 0019563). Nos níveis mais específicos, e relacionados aos parentais destacados, o transporte de elétrons fotossintéticos no fotossistema I (GO: 0009773), processo metabólico da glutathione (GO: 0006749), e também outros como gliconeogênese (GO: 0006094), organização do citoesqueleto de microtúbulos (GO: 0000226) e ciclo celular mitótico (GO: 0000278).

Em termos de CC (FIGURA SUPLEMENTAR 2C), as IDs se distribuíram de modo que 4 são exclusivas do citosol (GO: 0005829). Destacando-se ainda as proteínas do fotossistema I (GO: 0009522), Complexo de ATP sintase de transporte de prótons, núcleo catalítico F (1) (GO: 0045261), membrana plasmática (GO: 0005886), e microtúbulo (GO: 0005874).

Analizando a interseção CN&SNI (FIGURA SUPLEMENTAR 3), das 6 IDs identificadas, todas foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado na busca pelo Panther v.14.0. Mesmo que metade das proteínas sejam não caracterizadas, todas tiveram atribuições de MF, BP e CC.

Apesar do número de IDs identificadas nessa interseção, 6 IDs, várias MF foram atribuídas (FIGURA SUPLEMENTAR 3A), isto é, 5 IDs tiveram mais de dois *hits* em MF distintas (dado não apresentado). Destacando maior número de *hits* em ligação de ATP (GO: 0005524) e atividade de transferase (GO: 0016740). Nos níveis secundários, se destacam ligação de ATP (GO: 0005524), atividade transaminase (GO: 0008483), atividade de fosfoglucomutase (GO: 0004614), atividade de fosforibulocinase (GO: 0008974) e atividade de homodimerização de proteína (GO: 0042803), entre outras que são correlacionadas.

Em BP (FIGURA SUPLEMENTAR 3B), as IDs apresentaram maior número de *hits* em fotossíntese (GO: 0015979), se destacando por seus papéis fisiológicos as BP de ciclo redutivo de pentose-fosfato (GO: 0019253), descarboxilação de glicina via sistema de clivagem de glicina (GO: 0019464), transporte de prótons acoplado à síntese de ATP (GO: 0015986) e dobramento de proteínas (GO: 0006457) entre outras.

Quanto a CC (FIGURA SUPLEMENTAR 3C), as IDs se distribuíram com maior número de *hits* em cloroplasto (GO: 0009507). Destacando-se ainda a distribuição em membrana plasmática (GO: 0005886), citosol (GO: 0005829), mitocôndria (GO: 0005739), fotossistema II (GO: 0009523), membrana de tilacóide de cloroplasto (GO: 0009535), estroma de cloroplasto (GO: 0009570), complexo de ATP sintase de transporte de prótons, núcleo catalítico F (1) (GO: 0045261) e complexo supramolecular (GO: 0099080).

Ao avaliar a interseção entre todos os tratamentos da cv. CD104 (CN&SN&SNI), foi possível verificar, pelo diagrama de Venn, um total de 135 identificações (IDs) (FIGURA 7). Destas, 35 estão descritas no banco de dados do UNIPROT como não caracterizadas. Destacam-se as 22 proteínas ligantes da clorofila a-b, as 16 subunidade beta da ATP sintase, as 4 unidades da fosfoglicerato cinase (de citoplasma e cloroplasto), as 4 gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (TABELA SUPLEMENTAR 4). Na busca no Panther v.14.0, 12 IDs não foram mapeadas, restando 123 IDs mapeadas. Destas, 113 são proteínas não caracterizadas. Doze não tiveram atribuição em MF, 8 em BP e 17 em CC (FIGURA SUPLEMENTAR 4).

Analizando MF notou-se que se destacaram: 25 *hits* em ligação de clorofila (GO: 0016168), 21 em atividade oxidoredutase (GO: 0016491), 14 em atividade de ATPase (GO: 0016887), 11 em atividade de transporte de prótons da ATP sintase de mecanismo rotacional (GO: 0046933), 11 em ligação de íons metálicos (GO: 0046872), 9 em atividade de transferase

(GO: 0016740), 7 em ligação ADP (GO: 0043531), 7 em atividade de liase (GO: 0016829), 7 em atividade da peroxidase, 6 em atividade quinase (GO: 0016301), 6 em atividade ribulose-bisfosfato carboxilase (GO: 0016984), 5 em ligação heme (GO: 0020037), 5 em Ligação NAD (GO: 0051287), 4 em ligação NADP (GO: 0050661), 4 em transportador de elétrons, transferindo elétrons dentro da via de transporte cíclico de elétrons da atividade de fotossíntese (GO: 0045156) e 4 em atividade antioxidante (GO: 0016209). Sendo que 30 são de ligação de ATP (GO: 0005524), 26 de ligação de nucleotídeo (GO: 0000166), 12 em atividade catalítica (GO: 0003824) e 3 são chaperona de dobramento de proteína (GO: 0044183) (FIGURA SUPLEMENTAR 4A).

Em BP destacaram-se 42 em fotossíntese (GO: 0015979) sendo 13 em coleta de luz no fotossistema I (GO: 0009768), 27 em processo de redução de oxidação (GO: 0055114), 25 em ligação proteína-cromóforo (GO: 0018298), 14 resposta ao estímulo de luz (GO: 0009416), 11 em transporte de prótons acoplado à síntese de ATP (GO: 0015986) sendo 9 em processo biossintético de ATP (GO: 0006754), 10 em resposta ao estresse oxidativo (GO: 0006979), 7 em desintoxicação de oxidante celular (GO: 0098869), 6 em processo catabólico de peróxido de hidrogênio (GO: 0042744), 6 em fixação de carbono (GO: 0015977), 6 em redobramento de proteína (GO: 0042026) e 5 em homeostase redox celular (GO: 0045454). Com menor número de *hits*, entretanto demonstrando o estado metabólico que complementa o estado fotossintético observado, notou-se 3 em fotorrespiração (GO: 0009853), 5 em gliconeogênese (GO: 0006094), 4 em processo metabólico da glicose (GO: 0006006), 4 em regulação positiva da fosforilação oxidativa (GO: 1903862) e 3 em alongamento translacional (GO: 0006414) (FIGURA SUPLEMENTAR 4B).

É notável a quantidade de IDs, 19 (A0A3B6PLM0, A0A3B6N0I8, A0A3B6TJG2, A0A1D5RS51, A0A3B5Z2Y2, A0A3B6HUR4, A0A3B6PJG4, A0A3B6RH69, A0A3B6NM91, A0A3B6AWZ1, A0A3B6MZT6, A0A3B5Y384, A0A3B6MSB3, A0A3B5ZZX3, W5F8Z5, A0A3B6RIZ5, A0A3B6C6E5 e W5FIZ2, A0A3B6KSA1) que estão descritas como proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica que está em BP fotossíntese, coleta de luz (GO: 0009765) e destas, 10 (A0A3B6PLM0, A0A3B6TJG2, A0A1D5RS51, A0A3B6HUR4, A0A3B6RH69, A0A3B6MSB3, W5F8Z5, A0A3B6RIZ5, A0A3B6C6E5 e W5FIZ2) localizadas como fotossíntese, coleta de luz no fotossistema I (GO: 0009768) (dados não mostrados extraído da classificação do GO).

Quanto a CC (FIGURA SUPLEMENTAR 4C), destacaram-se 44 proteínas de membrana (GO: 0016020), sendo 41 da membrana de tilacóide de cloroplasto (GO: 0009535) e ainda com 1 do lúmen do tilacóide do cloroplasto (GO: 0009543). Onze ID do citosol (GO:

0005829), 1 de citoesqueleto (GO: 0005856), 1 glioxissoma (GO: 0009514) e 1 intracelular (GO: 0005622). E ainda 3 proteínas em região extracelular (GO: 0005576), sendo elas 2 peroxidase (A0A3B6RFK1 e A0A3B6NKJ7) e uma Superóxido dismutase [Cu-Zn] (A0A3B6QCL7).

4.5.2 Respostas da cv. de trigo CD120 nos diferentes tratamentos

As proteínas (ou grupos de proteínas) expressas de modo exclusivo nas folhas da cv. CD120 no meio MS sem sacarose, com fonte de N (tratamento CN) foram 21 proteínas distintas ou IDs do UNIPROT- ID (TABELA 6). Destas, apenas 9 têm descrição de função biológica como a lipoxigenase (A0A3B6KP36), 2 anidrase carbônica (A0A3B6SS13 e A0A3B6RQ40), sacarose sintase (A0A3B6REV7), 4-hidroxi-7-metoxi-3-oxo-3,4-di-hidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il glucosídeo beta-D-glucosidase 1a, cloroplástico (GLU1A) (Q1XIR9), Cetol-ácido redutoisomerase (A0A3B5Z5S1), tioredoxina tipo M (Q9ZP21), beta-amilase (BMY1) (P93594) e proteína de choque térmico 90 (A0A3B6KHN4). E oito foi o número de IDs verificadas no tratamento SN na mesma variedade, sendo destas uma apenas tem descrição de catalase (A0A3B6PE57) entretanto, as proteínas não caracterizadas A0A3B6MT63, A0A3B5XVD9 e A0A3B6IXK7 (TABELA 7), também estão presentes no mesmo tratamento para a cv. CD104 (TABELA 74). Apenas uma proteína uma ID foi encontrada como presente exclusivamente no SNI e esta foi descrita como uma proteína não caracterizada contendo domínio PsbP (A0A3B6JED8) (TABELA 8 TABELA 8).

Da mesma forma como feito para o CD104, a distribuição destas proteínas nas MF, BP e CC, foi levantada na base de dados do GO (ASHBURNER *et al.*, 2000; CARBON *et al.*, 2019) através da plataforma Panther v. 14.0 (MI; MURUGANUJAN; EBERT; *et al.*, 2019).

Na cv. CD120 no tratamento CN, das 21 IDs, duas não foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado na busca utilizando o Panther v.14.0. Das demais 19 IDs, 3 não apresentaram classificação no GO de MF, 2 no GO de BF e 10 no GO de CC. Portanto em cada grupo foram correlacionadas entre as diversas, 16 em MF, 17 em BP e 9 em CC (FIGURA 12).

Com um número tão expressivo de IDs neste tratamento, apesar de muitas encontradas como não caracterizadas na busca no Panther v.14.0, a distribuição em MF, BP e CC se tornou complexa, em especial para GO em MF (FIGURA 12A). Em nível parental de complexidade, algumas IDs apresentaram maior número de *hits* nas MF de atividade de hidrolase, atuando nas ligações glicosil (GO: 0016798), atividade oxidoredutase (GO: 0016491), ligação de íon zinco (GO: 0008270), ligação do cluster ferro-enxofre (GO: 0051536), ligação de rRNA de

subunidade ribossômica pequena (GO: 0070181). Entretanto nos níveis secundários, ou mais específicos, encontramos principalmente as MF: atividade de carbonato desidratase (GO: 0004089), constituinte estrutural do ribossomo (GO: 0003735), atividade da cetol-ácido redutoisomerase (GO: 0004455), atividade de fosfatase ácida (GO: 0003993), atividade da proteína serina/ treonina quinase do receptor transmembrana (GO: 0004675), atividade da amilopectina maltohidrolase (GO: 0102229), atividade de beta-D-glucosidase de glicosídeo DIMBOA (GO: 0102726) (FIGURA 12A). Em BP (FIGURA 12B), o maior número de *hits* foi em processo de redução de oxidação (GO: 0055114), seguidos de fotossíntese (GO: 0015979) utilização de carbono (GO: 0015976), processo metabólico de carboidratos (GO: 0005975) e tradução (GO: 0006412). Em níveis mais específicos, encontramos duas IDs distintas para desfosforilação (GO: 0016311) e via de sinalização da proteína serina/ treonina quinase de receptor transmembrana (GO: 0007178); a lipoxigenase atribuída, entre outros, a processo biossintético de ácidos graxos (GO: 0006633); e cetol-ácido reducto-isomerase atribuída a processo biossintético de aminoácidos de cadeia ramificada (GO: 0009082). Além destas, ainda processo catabólico de polissacarídeo (GO: 0000272) e processo metabólico de sacarose (GO: 0005985), sendo esta última, uma sacarose sintase. De modo bastante interessante, se encontra também uma ID (A0A3B6NMG8) de proteína não caracterizada que está atribuída a 3 GO em BP, sendo os de resposta de defesa (GO: 0006952), resposta de defesa à bactéria (GO: 0042742) e resposta de defesa a oomicetos (GO: 0002229). Apesar de nesse tratamento, CN, não poder ser atribuída qualquer agente de infecção (FIGURA 12B). E ainda, em termos de CC (FIGURA 12C), se observa que 10 IDs (30%) deste grupo não apresentaram atribuição à localização celular e estas IDs são as que tem função biológica já anotada no banco de dados do trigo, sendo elas, duas anidrase carbônica (2), uma beta-amilase; BMY1, sacarose sintase, lipoxigenase e 4-hidroxi-7-metoxi-3-oxo-3,4-di-hidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il glucosídeo beta-D-glucosidase. As demais IDs, estão distribuídas por todas as localizações celulares comuns: tilacóide (GO: 0009579), fotossistema (GO: 0009521), membrana plasmática (GO: 0005886), mitocôndria (GO: 0005739), subunidade ribossômica pequena citosólica (GO: 0022627), plastídio (GO: 0009536) e nucléolo (GO: 0005730) (FIGURA 12C).

Na cv. CD120, no tratamento SN, das 8 IDs buscadas no Panther v.14.0, uma não foi encontrada no banco de dados do trigo utilizado. Das demais 7 IDs, 3 não tiveram classificação no GO de MF, uma em BP e 3 em CC. Sendo assim, 4 IDs apresentaram mapeamento em MF, 6 em BP e 4 em CC (FIGURA 13). As 4 IDs mapeadas em MF, tiveram suas atribuições em atividade de transferência de elétrons (GO: 0009055), atividade da glutatona desidrogenase (ascorbato) (GO: 0045174), atividade de fosfoglucomutase (GO: 0004614) e atividade de ATP

sintase de transporte de prótons, mecanismo rotacional (GO: 0046933) (FIGURA 13A). Em BP, se destaca a mesma ID (A0A3B6NUT1) como proteína do transporte de elétrons fotossintéticos no fotossistema II (GO: 0009772), transporte de elétrons fotossintéticos no fotossistema I (GO: 0009773) e do transporte de prótons acoplado à síntese de ATP (GO: 0015986). Das demais, as BP mais significativas são glutationilação de proteínas (GO: 0010731), homeostase redox celular (GO: 0045454), processo metabólico de carboidratos (GO: 0005975) e fotossíntese (GO: 0015979) (FIGURA 13B). Em relação a CC, uma é do citosol (GO: 0005829) e três IDs são membrana (GO: 0016020), sendo elas mais especificamente de fotossistema I (GO: 0009522), componente intrínseco da membrana (GO: 0031224) e Complexo de ATP sintase de transporte de prótons, núcleo catalítico F (1) (GO: 0045261) (FIGURA 13C).

No tratamento SNI do CD120 apenas um ID de proteína foi exclusiva, sendo ela uma proteína não caracterizada (A0A3B6JED8) contendo domínio PsbP. Usando o UNIPROT foi possível fazer as seguintes atribuições: esse domínio em MF é de ligante de cálcio (GO:0005509), relacionado ao BP fotossíntese (GO:0015979) e como CC do complexo de evolução de oxigênio do fotossistema II (GO:0009654) (FIGURA 14A, B e C).

TABELA 6 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD120** PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS COM NITROGÊNIO (CN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais	relacionadas em grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6RQ40	Anidrase carbônica			4577.GRMZM2G34 8512_P05	67	287	CA	Anidrase carbônica
2	A0A3B6QJ10	Proteína não caracterizada			4577.GRMZM2G07 9381_P01	86	1006. 5	NIR	Ferredoxina - nitrato reductase cloroplástica
3	A0A3B6KHN4	Proteína de choque térmico 90			3702.AT5G56010.1	87	1016. 1	HSP81-3	Proteína de choque térmico 90-3
4	A0A3B6RA72	Proteína contendo domínio VWFA	A0A3B6I7E8, A0A3B6TB53, A0A3B6T7D9		4577.GRMZM2G11 0567_P01	48	409.1		Proteína da família de dedo de zinco (do tipo C3HC4 ring finger)
5	A0A3B5ZTF9	Proteína não caracterizada			4565.EPIT AEP00000 010048	91	363.6	PSAB	Apoproteína A2 da clorofila a do fotossistema I P700
6	A0A3B6IX07	Proteína não caracterizada			4577.GRMZM2G11 9471_P01	86	386.3	RPL5	Proteína ribossomal L5 50S
7	W5FV77	Proteína não caracterizada			4577.GRMZM2G08 4465_P01	99	283.9	RPS23B	Proteína S23-2 do ribossoma 40S. Pertence a família uS12 de proteínas ribossomais
8	W5I035	Proteína contendo domínio Ribossomal_S13_N			4577.GRMZM2G15 8034_P01	96	290.4	PRS13	Proteína S13 do ribossoma 40S; Pertence à família da proteína

							ribossômica universal uS15
9	A0A3B6I7E8	Proteína contendo domínio VWFA	4577.GRMZM2G11 0567_P01	49	407.9		Proteína da família de dedo de zinco (tipo C3HC4 finger ring)
10	Q9ZP21	Tioredoxina tipo M, cloroplástico	4565.Traes_5BS_B7 2CD04F2.1	100	364.8	TRX-M	Tioredoxina tipo M, cloroplástica
11	P93594	Beta-amilase OS = Triticum aestivum BMY1	4565.Traes_2DS_D1 4ABD1DB.1	100	1050. 4	BMY1	Beta-amilase
12	A0A3B5Z5S1	Cetol-ácido redutoisomerase	4577.GRMZM2G00 4382_P01	86	993.4	KARI	Cetol-ácido redutoisomerase Pertence à família da cetol-ácido redutoisomerase
13	A0A3B6AS69	Proteína não caracterizada	4565.Traes_3DL_0A 92A2224.1	96	161	CP43 (PSII)	Proteína CP43 do centro de reação do fotossistema II ;
14	Q1XIR9	4-hidroxi-7- metoxi-3-oxo-3,4- di-hidro-2H-1,4- benzoxazin-2-il glucosídeo beta- D-glucosidase 1a, cloroplástico (GLU1A)	4565.Traes_2AL_AE B11A672.1	93	1103. 2	GLU1D	Beta-glucosidase 1d
15	A0A3B6PND9	Proteína não caracterizada	4565.EPITAEP00000 010026	98	1110. 1	PSAA	Apoproteína A1 da clorofila a do fotossistema I P700
16	A0A3B6NMG8	Proteína contendo domínio PKS_ER	A0A3B6QBT9, A0A3B6PIU3	77	489.6	AOR	NADPH-dependente oxidoredutase 2-alcenal redutase, cloroplástico

17	A0A3B6I3M3	Proteína não caracterizada	A0A3B6U5R3, A0A3B6IW47	4577.GRMZM2G00 1508_P02	65	340.1	VSP2	Proteína de armazenamento vegetativo 2 (provável fosfatase ácida)
18	A0A3B6REV7	Sacarose sintase		4565.Traes_7DS_52 9BAB150.1	100	1632.8	SUS	Sacarose sintase
19	A0A3B6SS13	Anidrase carbônica		4565.Traes_7DL_B2 28E9EA8.2	98	417.2	CA	Anidrase carbônica
20	A0A3B6PRH7	Proteína não caracterizada	A0A3B6PQS3, A0A3B6NUX9	4577.GRMZM2G07 9381_P01	80	999.2	NIR	Ferredoxina - nitrato reductase, cloroplástico
21	A0A3B6KP36	Lipoxigenase		4565.Traes_5BL_30 4FAFA26.1	101	1731.8	LOX	Lipoxigenase

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose com nitrogênio (CN) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições, n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arábida (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA 7 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD120** PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO (SN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

Item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais relacionados em grupo de máxima parcinônia	ID STRING	Identidade (%)	bitscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6MT74	Proteína contendo domínio CYTB_NTER		4565.Traes_5BL_EE_B8BBB6B.1	97	443.4	Cit b6	Citocromo b6
2	A0A3B5XVD9	Proteína não caracterizada	A0A3B5YRG3, A0A3B5YRG4	3702.AT1G75270.1	72	308.1	DHAR 2	Glutathione S-transferase
3	A0A3B6IXK7	Proteína contendo domínio AAI		3702.AT2G45180.1	71	122.5		Inibidor bifuncional / proteína de transferência de lipídios / proteína da superfamília de albumina 2S de armazenamento de sementes;
4	A0A3B6MT63	Proteína não caracterizada		4565.Traes_5BL_6E_029E99B.1	97	259.2	PSSV-1B	Subunidade V do fotossistema I; Proteína não caracterizada
5	A0A3B6HW60	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G02_3289_P01	91	1066.6	PGM2	Fosfoglucomutase citoplasmática 2
6	A0A3B6PE57	Catalase	A0A3B6NJS8, F1DKC1, A0A3B6PHD6, A0A3B6Q9M2,	4565.Traes_6DS_35_22B8EF6.2	100	1003.4	CAT	Catalase

A0A3B6QCB0, A0A3B6NKD6						
7	A0A3B6B5J2	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G04 8324_P01	70	813.5	NRX1 Nucleoredoxina 1
8	A0A3B6NUT1	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G02 5171_P01	84	307.8	ATPD ATP sintase subunidade delta cloroplástica

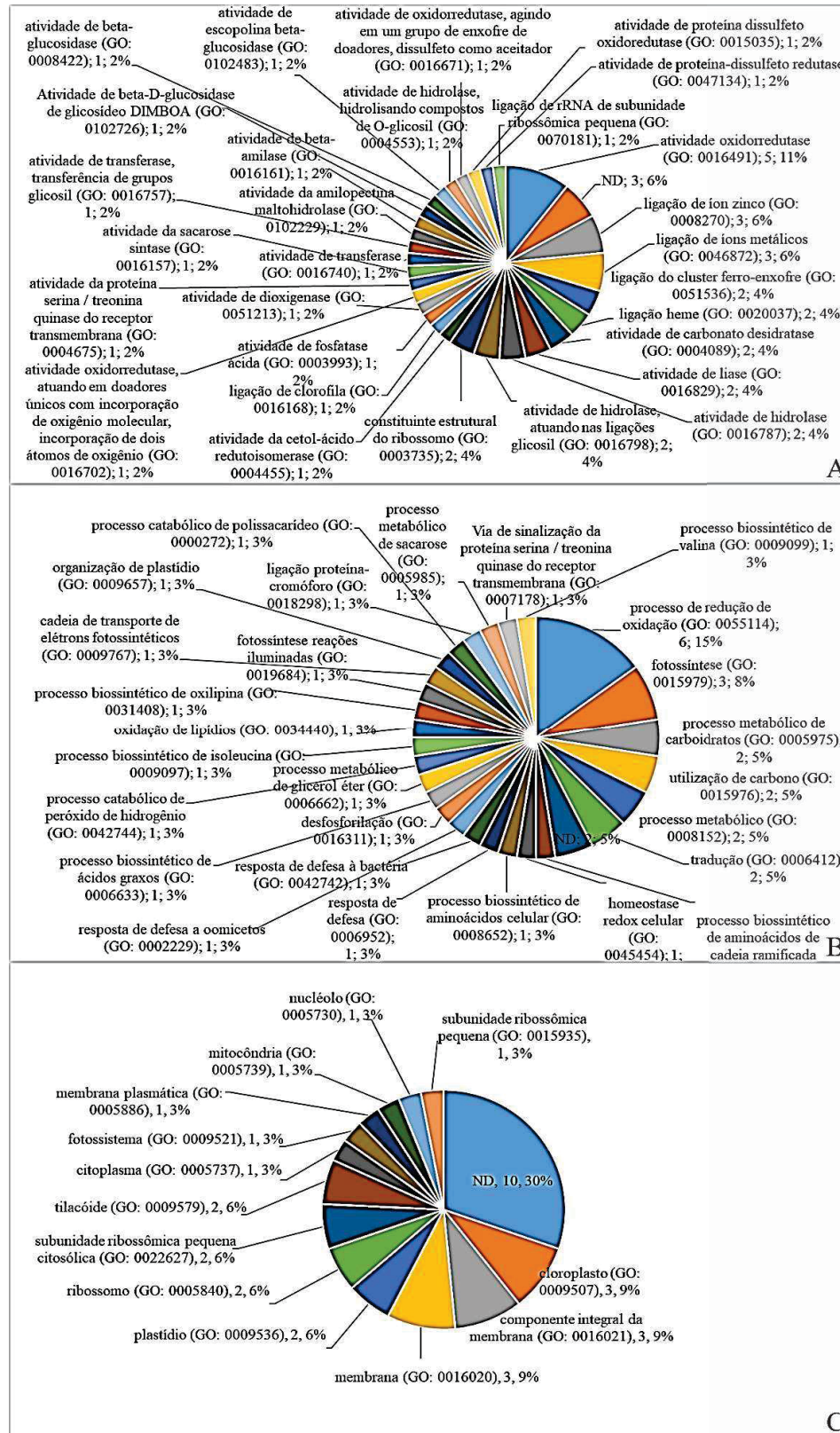
FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CDI20, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose e sem fonte de nitrogênio (SN) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA 8 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD120** PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA (*Herbaspirillum seropedicae* Smr1) (SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais	grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6JED8	Proteína contendo domínio PsbP			4577.GRMZM2G17 6840_P01	72.	278.5		Complexo de evolução de oxigênio do cloroplasto / proteína luminal do tilacóide 25,6 kDa; Proteína não caracterizada
					3702.AT3G55330.1	64	236.9	PPL1	Proteína 1 semelhante a PsbP, cloroplástica; necessária para o reparo eficiente de PSII fotodanificado, mas não fortemente associado ao complexo
					3702.AT2G39470.1	38,5	129	PnsL1	Subunidade NDH fotossintética de localização luminal

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, sem fonte de nitrogênio e inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativos ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

FIGURA 12 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD120**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO COM NITROGÊNIO (CN), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor

(2020).

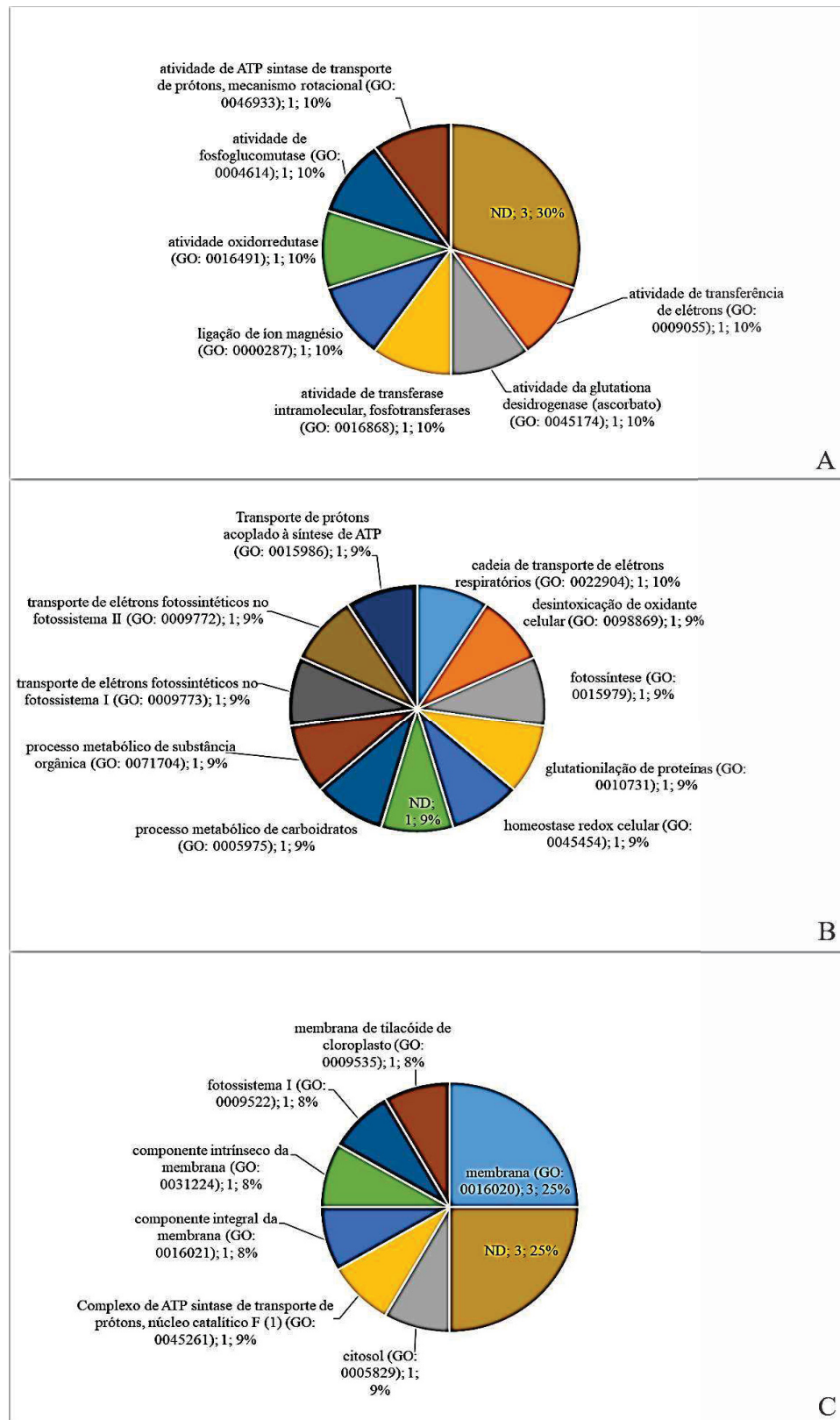
Funções moleculares
- MF (A), Processos
Biológicos – BP (B)
e Componentes
Celulares – CC (C)
da base de dados do
Gene Ontology
(GO).

O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados no Pantherdb.

ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com nitrogênio (CN), mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

FIGURA 13 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD120**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SEM NITROGÊNIO (SN), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES



FONTE: o Autor (2020).

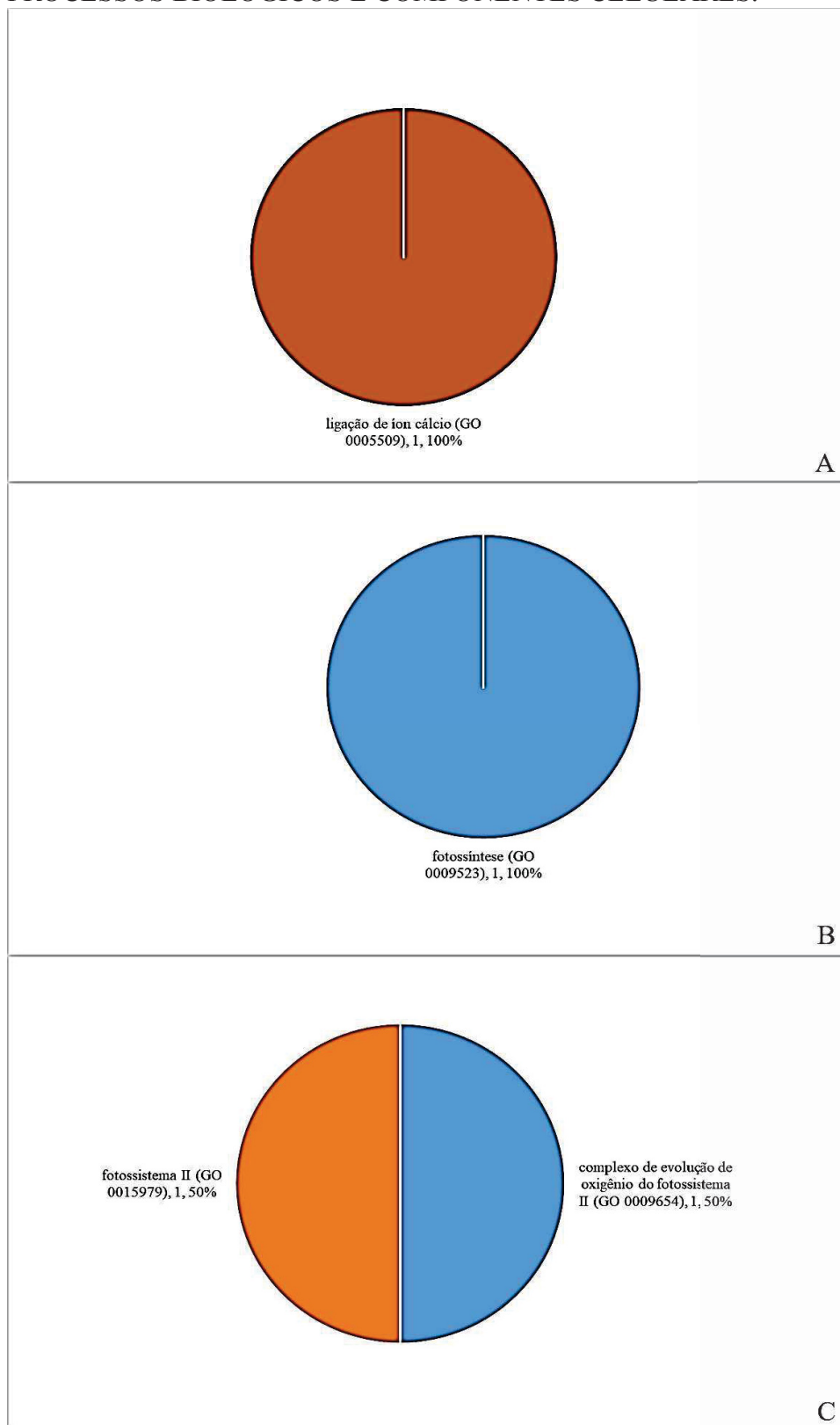
Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO).

O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados no Pantherdb.

ND corresponde a proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose e sem fonte de nitrogênio (SN), mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

FIGURA 14 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD120**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM BACTÉRIA (SNI), A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor (2020).

Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO).

O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados no Pantherdb.

ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, sem fonte de nitrogênio e inoculadas com *Herbaspirillum seropadicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 ($\pm$ 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

Proteínas (ou grupos de proteínas) expressas pelas plantas da cv. CD120 na interseção CN&SN, foi de 14 proteínas distintas ou identificações do UNIPROT- ID (FIGURA 7 e TABELA SUPLEMENTAR 5). Destas, apenas 4 se apresentam descritas, sendo elas a subunidade alfa da proteína de ligação à subunidade grande da RuBisCO (P08823), plastocianina (A0A3B6R9W0), nucleosídeo difosfato cinase (A0A3B6MNV5) e catalase-1 (Q43206). As demais IDs foram de proteínas não caracterizadas. Sendo que a proteína não caracterizada (A0A3B6KCB6) também aparece na mesma interseção para a cv. CD104. Na interseção SN&SNI, foram encontradas 5 IDs proteicas (TABELA SUPLEMENTAR 6). Destas, apenas uma possui função descrita, sendo uma proteína-2 transportadora de ADP/ATP da mitocôndria e está entre as IDs da mesma interseção para a cv. CD104. Na interseção CN&SNI da cv. CD120 foram encontradas 11 proteínas distintas ou IDs do UNIPROT-ID (TABELA SUPLEMENTAR 7). Destas 11, apenas 3 apresentam descrição sendo elas uma malato desidrogenase (A0A3B6KQR8) e duas cisteína sintase (P38076 e A0A3B6EB15). As demais IDs foram de proteínas não caracterizadas e a ID A0A3B6MN25 também é descrita entre as IDs na mesma interseção da cv. CD104.

Na interseção CN&SN, das 14 IDs, duas não foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado na busca feita pelo Panther v.14.0. Das demais 12 IDs, uma não apresentou classificação no GO de MF, duas em BP e 4 em CC. Portanto, em cada grupo foram correlacionadas entre as diversas, 11 em MF, 10 em BP e 8 em CC (FIGURA SUPLEMENTAR 5).

Em MF de nível parental de complexidade, algumas IDs se apresentaram distribuídas em atividade oxidoredutase (GO: 0016491) e ligação de íons metálicos (GO: 0046872). Nos níveis secundários, se destacam ligação de ATP (GO: 0005524), atividade de transferência de elétrons (GO: 0009055), atividade da catalase (GO: 0004096), ligação de íon cobre (GO: 0005507), atividade da glicerato desidrogenase (GO: 0008465), atividade de glicolato oxidase (GO: 0008891), ligação de nucleotídeo (GO: 0000166), atividade da peroxidase (GO: 0004601) e atividade de UDP-glicosiltransferase (GO: 0008194) (FIGURA SUPLEMENTAR 5A). Em BP, as IDs que apresentaram maior número de *hits* foram processo de redução de oxidação (GO: 0055114) e fotossíntese (GO: 0015979) e ainda em níveis pouco mais específicos se encontram processo de redobramento de proteína (GO: 0042026), ritmo circadiano (GO: 0007623), transporte de elétrons fotossintéticos no fotossistema I (GO: 0009773), resposta ao ácido abscísico (GO: 0009737) e resposta ao estresse oxidativo (GO: 0006979). Sendo que a mesma ID (Q43206), catalase-1, também é atribuída à resposta à bactéria (GO: 0009617) e resposta à privação de água (GO: 0009414), entretanto, nesta condição não se aplica (FIGURA

SUPLEMENTAR 5B). Quanto a CC, as IDs se encontram distribuídas em membrana de tilacóide de cloroplasto (GO: 0009535), citosol (GO: 0005829), glioxissoma (GO: 0009514), fotossistema I (GO: 0009522) e complexo de ATP sintase de transporte de prótons, núcleo catalítico F (1) (GO: 0045261) (FIGURA SUPLEMENTAR 5C).

Na interseção SN&SNI, das 5 IDs, todas foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado na busca feita pelo Panther v.14.0, sendo que 4 retornam como proteínas não caracterizadas. Duas não tiveram atribuições em MF e 3 em BP. Portanto, em cada grupo foram correlacionadas 3 em MF, 2 em BP e 5 em CC (FIGURA SUPLEMENTAR 6).

Em MF se destaca a atividade de transportador transmembrana de ATP (GO: 0005347), ligação de íon manganês (GO: 0030145) e atividade do reservatório de nutrientes (GO: 0045735). Em BP, apenas o transporte de ADP (GO: 0015866) e de ATP (GO: 0015867) representam melhor as identificações. Em CC, duas IDs se encontram em membrana mitocondrial interna (GO: 0005743), uma em componente ancorado da membrana plasmática (GO: 0046658) e componente de parede celular (GO: 0005618) (FIGURA SUPLEMENTAR 6 A, B e C).

Referente a interseção CN&SNI, das 11 IDs, 9 foram encontradas no banco de dados do trigo utilizado na busca do Panther v.14.0, apesar que a única atividade biológica foi das cisteínas sintase e as demais proteínas não caracterizadas. Das nove IDs mapeadas, três não tiveram atribuição em MF e uma em CC. Portanto, em cada grupo foram correlacionadas 6 em MF, 9 em BP e 8 em CC (FIGURA SUPLEMENTAR 7).

Apesar do baixo número de IDs, várias MF foram atribuídas, destacando-se maior número de *hits*, no nível parental, em atividade de ATPase (GO: 0016887) e atividade de transferase (GO: 0016740). Apresentado em níveis mais específicos, as MF em GO de atividade da cisteína sintase (GO: 0004124), ligação de íons de ferro (GO: 0005506), atividade GTPase (GO: 0003924) e atividade do fator de alongamento da tradução (GO: 0003746) (FIGURA SUPLEMENTAR 7A). Em BP, as IDs apresentaram maior número de *hits* no processo biossintético de cisteína (GO: 0019344) e importação de proteína no estroma do cloroplasto (GO: 0045037), sendo em níveis secundários, processo biossintético de aminoácidos celular (GO: 0008652), processo biossintético de cisteína a partir de serina (GO: 0006535), dobramento de proteínas (GO: 0006457), exportação de subunidade ribossômica do núcleo (GO: 0000054), alongamento translacional (GO: 0006414) e 2 IDs em iniciação (GO: 0006413) e rescisão translacional (GO: 0006415) (FIGURA SUPLEMENTAR 7B). Quanto a CC, duas IDs foram mapeadas como componentes de cloroplasto (GO: 0009507) e TOC-TIC supercomplex I (Go: 0061927). Destacando-se ainda a distribuição de IDs distintas em

complexo de ATP sintase de transporte de prótons, núcleo catalítico F (1) (Go: 0045261), complexo de fator de iniciação de tradução eucariótica 3 (GO: 0005852) e citoplasma (GO: 0005737) (FIGURA SUPLEMENTAR 7C).

A interseção entre os tratamentos CN, SN e SNI (CN&SN&SNI) no CD120 apresentou um total de 139 identificações (IDs). Destas, 37 estão descritas no banco de dados do UNIPROT como não caracterizadas. Destacam-se as 23 proteínas ligantes da clorofila a-b, as 5 IDs para a descrição ‘subunidade beta da ATP sintase’, as 4 IDs para a fosfoglicerato cinase (de citoplasma e cloroplasto), as 4 IDs de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 4 IDs de frutose-difosfato aldolase, 4 IDs de ‘subunidade alfa da ATP sintase’ (TABELA SUPLEMENTAR 8). Na busca de GO no Panther v.14.0, 13 IDs não foram mapeadas, restando 126 IDs mapeadas. Destas, 112 são proteínas não caracterizadas. Onze não tiveram atribuição (ND) em MF, 11 em BP e 16 em CC (FIGURA SUPLEMENTAR 8).

Em MF (FIGURA SUPLEMENTAR 8A) se destacam 24 IDs que apresentaram *hits* em ligação de clorofila (GO: 0016168), 18 IDs em atividade oxidorreductase (GO: 0016491), 14 IDs em atividade de ATPase (GO: 0016887), 11 IDs em atividade de transporte de prótons da ATP sintase, mecanismo rotacional (GO: 0046933), 10 IDs em ligação de íons metálicos (GO: 0046872), 11 IDs em atividade de transferase (GO: 0016740), 8 IDs em ligação ADP (GO: 0043531), 7 IDs em atividade de liase (GO: 0016829), 7 IDs em atividade cinase (GO: 0016301), 6 IDs em atividade ribulose-bisfosfato carboxilase (GO: 0016984), 4 IDs em ligação heme (GO: 0020037), 4 IDs em ligação NAD (GO: 0051287), 4 IDs em ligação NADP (GO: 0050661), 4 IDs em transportador de elétrons, transferindo elétrons dentro da via de transporte cíclico de elétrons da atividade de fotossíntese (GO: 0045156), 3 IDs em atividade antioxidante (GO: 0016209). Sendo que, 29 IDs são de ligação de ATP (GO: 0005524), 27 IDs de ligação de nucleotídeo (GO: 0000166), 14 IDs em atividade catalítica (GO: 0003824) e 3 IDs são chaperona de dobramento de proteína (GO: 0044183). Ao comparar com os dados de interseção de todos os tratamentos CS&SN&SNI da cv. CD104, é possível observar a semelhança entre os dados nas funções moleculares onde se encontram os principais *hits* comparando com a cv. CD120 (FIGURAS SUPLEMENTARES 4 e 8).

Em BP destacam-se 43 IDs em fotossíntese (GO: 0015979), 13 IDs em coleta de luz no fotossistema I (GO: 0009768), 24 IDs em processo de redução de oxidação (GO: 0055114), 24 IDs em ligação proteína-cromóforo (GO: 0018298), 13 IDs de resposta ao estímulo de luz (GO: 0009416), 14 IDs em transporte de prótons acoplado à síntese de ATP (GO: 0015986), 10 IDs em processo biossintético de ATP (GO: 0006754), 4 IDs em resposta ao estresse oxidativo (GO: 0006979) (cv CD104 são 10 ID), 5 IDs em desintoxicação de oxidante celular

(GO: 0098869), 4 IDs em processo catabólico de peróxido de hidrogênio (GO: 0042744), 6 IDs em fixação de carbono (GO: 0015977), 3 IDs em redobramento de proteína (GO: 0042026) e 3 IDs em homeostase redox celular (GO: 0045454) (cv. CD104 são 5 ID). Com menor número de *hits*, se observa 3 IDs em fotorrespiração (GO: 0009853), 6 IDs em gliconeogênese (GO: 0006094), 4 IDs em processo metabólico da glicose (GO: 0006006), 4 IDs em regulação positiva da fosforilação oxidativa (GO: 1903862) e 2 IDs em alongamento translacional (GO: 0006414) (FIGURA SUPLEMENTAR 8B).

Em CC (FIGURA SUPLEMENTAR 8C), se destacam 46 proteínas de membrana (GO: 0016020), sendo 41 ID da membrana de tilacóide de cloroplasto (GO: 0009535) e ainda com 1 ID do lúmen do tilacóide do cloroplasto (GO: 0009543). Dezesete IDs do citoplasma (GO: 0005737) com 10 IDs do citosol (GO: 0005829), 2 IDs de citoesqueleto (GO: 0005856) e 1 intracelular (GO: 0005622). E ainda, 3 proteínas em região extracelular (GO: 0005576), sendo elas 2 peroxidase (A0A3B6RFK1 e A0A3B6NKJ7) e uma superóxido dismutase [Cu-Zn] (A0A3B6QCL7). É notável a quantidade de IDs, 19 ao todo, (A0A3B6PLM0, A0A3B6N0I8, A0A3B6TJG2, A0A1D5RS51, A0A3B5Z2Y2, A0A3B6HUR4, A0A3B6PJG4, A0A3B6RH69, A0A3B6NM91, A0A3B6AWZ1, A0A3B6MZT6, A0A3B5Y384, A0A3B6MSB3, A0A3B5ZZX3, W5F8Z5, A0A3B6RIZ5, A0A3B6C6E5 e W5FIZ2, A0A3B6KSA1), que estão descritas como proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica que estão em CC do fotossistema I (GO: 0009522) e fotossistema II (GO: 0009523). Dados não apresentados, mas que foram obtidos junto as análises do Panther v.14.0.

4.5.3 Anotação e rede de interação proteína-proteína

Com o objetivo de contribuir na discussão fisiológica das proteínas encontradas nos sistemas impostos pelos tratamentos nas cv.s CD104 e CD120, e possivelmente em anotação do genoma do trigo a partir das proteínas encontradas no proteoma, foi usada a plataforma do String v.11.0 (SZKLARCZYK *et al.*, 2019) localizada na página www.string-db.org. O foco dessa busca foi contribuir com a atribuição de função às proteínas não caracterizadas, ou que se encontravam anotadas parcialmente através de informação de domínio, ou até mesmo confirmar as funções já descritas. Para isto, a função de mapeamento (*mapping*) do String v.11.0, foi usando a partir dos FASTAS das proteínas de cada tratamento acessados através do UNIPROT (*Retrieve/ID mapping*) e organizados em arquivos txt. Foi realizada a busca no banco de dados da plataforma NCBI de trigo (Wheat – *Triticum aestivum* identificador taxonômico: 4565), milho (Maize - *Zea mays*; identificador taxonômico 4577) e de Arabidopsis

(*Arabidopsis thaliana*; identificador taxonômico 3702). Por meio dos critérios utilizados de maior identidade e diferença menor que 10% entre os *bitscore*, foram selecionadas anotações que estão apresentadas nas TABELAS 3 a 8 e TABELAS SUPLEMENTARES 1 a 8. As informações referentes a estas descrições de função biológicas para as IDs do STRING, assim como o percentual de identidade e *bitscore* de identificação e a descrição estão localizadas nas tabelas em questão.

As proteínas caracterizadas, não caracterizadas e anotadas parcialmente por existência de domínio ou por pertencerem a famílias de proteínas, tiveram homologia com outras proteínas do banco de dados do trigo (parálogos) e bancos de dados do milho e *Arabidopsis* (ortólogos), cujas funções estavam caracterizadas ou parcialmente caracterizadas. Nesses bancos de dados foram encontradas proteínas cujas funções foram atribuídas por homologia entre eles. Portanto, a proposta de anotação se torna mais importante para as não caracterizadas no banco de dados do trigo no UNIPROT e onde homologia pôde ser atribuída. Ainda assim, proteínas não caracterizadas foram encontradas entre as ortólogas com alta identidade. Para dar melhor anotação, foi então atribuída a descrição que apresentava a melhor caracterização e com alta identidade da sequência.

Portanto, ao observar a TABELA 3 para dados de proteínas exclusivas no tratamento CN da cv. CD104, as proteínas não caracterizadas IDs A0A3B6QJ10 e A0A3B6PRH7, puderam ser consideradas Ferredoxina - nitrito redutase, cloroplástica (NIR), A0A3B5ZTJ6 uma translocon 110 de membrana interna do cloroplasto; A0A3B6AS69 uma proteína CP43 do centro de reação do fotossistema II e A0A3B6UD03, à cadeia épsilon da ATP sintase cloroplástica. Quanto às possíveis anotações para as ID A0A3B5XVD9 e A0A3B6H1A8, encontradas como não caracterizadas no grupo de exclusivos do CD104 no tratamento SN (TABELA 4), verificamos homologia com a glutathione S-transferase DHAR2 e com a beta-1,3-glucanase, respectivamente. A proteína com domínio AAI (ID A0A3B6IXK7), apresentou homologia com um inibidor bifuncional/ proteína de transferência de lipídios/ armazenamento de sementes proteína da superfamília de albumina 2S, o que implica em uma função não caracterizada. Para o grupo de proteínas do grupo CD104 exclusivas no tratamento SNI (TABELA 5), às proteínas não caracterizadas A0A3B5ZTF9, A0A3B6PND9 e A0A341ZKM1, foi possível atribuir as seguintes anotações: uma apoproteína A2 da clorofila a, e 2 distintas apoproteína A1 da Clorofila a do fotossistema I P700, respectivamente. Essas últimas, diferem entre si, pela presença de uma sequência de 200 aminoácidos a mais na região N-terminal da proteína A0A341ZKM1, dados obtidos a partir do UNIPROT/align.

A interseção CD104 CN&SN apresentou as anotações Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, enolase 2, duas proteínas TIC110 cloroplástica, e uma subunidade B/B' do complexo FO-ATPase do cloroplasto, para as respectivas ID A0A3B6TQD5, A0A3B6KCB6, A0A3B5XZJ7, A0A3B5YVW2 e A0A3B6LGE1. As proteínas contendo domínios de Transket_pyr e de hidroxíácido desidrogenase FMN (A0A3B6RC85 e A0A3B6CD34) apresentaram as possíveis anotações transcetolase cloroplástica e (S)-2-hidroxi-ácido oxidase peroxisomal (TABELA SUPLEMENTAR 1).

A interseção CD104 SN&SNI apresentou prováveis anotações para algumas das proteínas não caracterizadas: proteína transportadora 2 ADP/ATP mitocondrial; ATP sintase subunidade alfa cloroplástica, glutathione S-transferase, triosefosfato isomerase citosólica (A0A3B6NT53, A0A3B5Z3H2, A0A3B6LUL8 e A0A3B6GQZ6). As demais, incluindo as com domínios descritos, não estão bem caracterizadas, exceto a ID A0A3B6EFN6 que é paróloga da cadeia grande da ribulose bifosfato carboxilase (RBLC) – RuBisCO (TABELA SUPLEMENTAR 2). A proteína de ligação a RNA cloroplástico (CP31B) (A0A3B6RIX9), é descrita como ortóloga em *Arabidopsis*, sendo equivalentes funcionais de hnRNPs nuclear citosólica (dado não mostrado).

A interseção CN&SNI apresentou as seguintes anotações para as proteínas não caracterizadas: proteína H do centro de reação do fotossistema II, fosfoglucomutase (PRK) 2 citoplasmática e proteína 6 de *Heat shock*, 70 kDa, cloroplástica (A0A3B5YS83, A0A3B6HW60 e A0A3B6MN25, respectivamente). As demais, já apresentaram função atribuída e encontraram homologia que confirmaram (TABELA SUPLEMENTAR 3).

Nos dados de proteínas exclusivas no tratamento CN da cv. CD120 (TABELA 6), foi observado que as proteínas não caracterizadas encontram anotações possíveis como: ferredoxina - nitrito redutase cloroplástica (A0A3B6QJ10 e A0A3B6PRH7), apoproteína A2 da clorofila a do fotossistema I P700 (A0A3B5ZTF9), Proteína ribossomal L5 50S (A0A3B6IX07), proteína S23 do ribossoma 40S pertencente da família da proteína ribossômica universal uS12 (W5FV77), proteína CP43 do centro de reação do fotossistema II (A0A3B6AS69), apoproteína A1 da clorofila a do fotossistema I P700 (A0A3B6PND9), proteína de armazenamento vegetativo 2 - provável fosfatase ácida (A0A3B6I3M3). Uma proteína contendo domínio Ribossomal_S13_N (W5I035) indicando uma proteína S13 do ribossoma 40S; pertence à família da proteína ribossômica universal uS15. Entretanto, ainda não foram bem anotadas outras IDs como as proteínas contendo domínio VWFA (A0A3B6RA72 e A0A3B6I7E8), contendo domínios *Zinc finger*. A proteína contendo domínio

PKS_ER (A0A3B6NMG8) apresentou-se como uma possível atividade alcenal/ oxidoredutase dependente de NADPH, cloroplástico (TABELA 6).

Quanto às possíveis anotações para as IDs A0A3B5XVD9, A0A3B6MT63, A0A3B6HW60, A0A3B6B5J2 e A0A3B6NUT1) encontradas como não caracterizadas no grupo de exclusivos da cv. CD120 no tratamento SN, verificamos homologia com uma glutathione S-transferase DHAR2; a subunidade V do fotossistema I; uma atividade fosfoglucomutase 2 citoplasmática, uma nucleoredoxina 1 e uma ATP sintase subunidade delta cloroplástica (TABELA 7).

Já o tratamento SNI da cv. CD120, não houve melhora na descrição da função, por não ter tido grande ortologia significativa com outras proteínas descritas. Foi então encontrada ortologia (72%) com milho, que descreve uma proteína do complexo de evolução de oxigênio do cloroplasto / proteína luminal do tilacóide 25,6 kDa, não bem caracterizada. Com banco de dados de Arabidopsis (64%), uma com proteína 1 semelhante a PsbP, cloroplástica; necessária para o reparo eficiente de PSII fotodanificado, mas não fortemente associado ao complexo e ainda, com 38%, uma subunidade NDH fotossintética de localização luminal. Todas pouco descritas e caracterizadas (TABELA 8).

A interseção CD120 CN&SN apresentou as anotações para as proteínas não caracterizadas como: cadeia épsilon ATP sintase cloroplástica, subunidade alfa da proteína de ligação à subunidade grande da RuBisCO cloroplástica, enolase, glicerato desidrogenase HPR peroxissomal, apoproteína CP43 clorofilica do fotossistema II e uma apoproteína de centro de ferro-enxofre do fotossistema I (A0A3B6UD03, 0A1D5UV66, A0A3B6KCB6, A0A3B6NGZ5, A0A3B6DMK0 e A0A3B6LN04, respectivamente). E ainda a proteína contendo domínio de hidroxíácido desidrogenase FMN (A0A3B6CD34) como provável atividade (S) -2-hidroxi-ácido oxidase (GLO1) de peroxissoma (TABELA SUPLEMENTAR 5).

Em relação a interseção CD120 SN&SNI, esta apresentou prováveis anotações para proteínas não caracterizadas: duas proteína-1 de ligação a cátion associada à membrana plasmática (proteína DREPP4), ainda não caracterizada (A0A3B6EFP8 e A0A3B6FNR1) e uma proteína-2 transportadora de ADP / ATP mitocondrial (A0A3B6NT53), sendo esta mesma função que a ID Q41630 (TABELA SUPLEMENTAR 6).

Já a interseção CN&SNI, também CD120, apresentou as seguintes anotações para as proteínas não caracterizadas: subunidade alfa da ATP sintase cloroplástica, 2 proteínas TIC110 cloroplásticas e proteína-6 da HSP 70 kDa cloroplástica (A0A3B5Z3H2, A0A3B5XZJ7, A0A3B5YVW2 e A0A3B6MN25, respectivamente). As proteínas contendo domínios Transket

pyr, UVR, G tipo Tr e ATP-synt_ab_N, puderam ser atribuídas as possíveis funções: transcetolase cloroplastica, proteína chaperonaClpC1 cloroplastica, proteína da família do fator de alongamento G / III / V e ATP sintase subunidade beta (TABELA SUPLEMENTAR 7).

Nas interseções gerais das cv.s CD104 e CD120, das 34 e 37 proteínas não caracterizadas, respectivamente, tiveram homologia alta com várias proteínas. Entre as proteínas dessa interseção, 3 apresentaram-se iguais entre as duas cv.s, inclusive na homologia e nos percentuais de identidade baixos, sendo elas as IDs A0A3B6PUD8, A0A3B6QMM8 e A0A3B6C475 com 62, 66 e 71% de identidade, respectivamente. Estas foram descritas como uma subunidade PsbR de 10 kDa do fotossistema II (PSII) PSBR, um polipeptídeo de 10 kDa do fotossistema II PSB3 e proteína 3-1 intensificadora de evolução de oxigênio cloroplástica PSBQ (TABELA SUPLEMENTAR 4 e 8).

Usando a plataforma do String V.11.0, também foi possível obter redes de interação proteína-proteína (IPP). Entretanto, esta foi baseada nas informações contidas para os acessos em banco de dados do trigo. As redes de interação representam as conexões de proteínas, indicando que elas estejam envolvidas em vias do metabolismo em comum. Uma das formas de validação dos dados das redes, o *textmining*, traz informações de estudos de proteoma onde essas proteínas estiveram relacionadas, além é claro, de informação de banco de dados de interação, sendo que estas informações quando não haviam dados relevantes em trigo (*T. aestivum*) eram encontrados em outros organismos, por modo *default* pelo String v.11.0. Encontramos redes de interação para as proteínas presentes no CD104 no tratamento CN, SN e SNI (FIGURA 15).

A rede IPP do CD104 CN, indica interação: entre a proteína indicada a ferridoxina nítrico redutase (NIR) e a cisteína sintase (CYS1). Está descrito na literatura, que seus genes foram mais expressos sob estresse por frio em trigo (ZHANG, NING *et al.*, 2017). A co-expressão também foi mostrada para CYS1 e NIR em outros organismos. Estas atividades indicam envolvimento em uma via de assimilação de sulfato e biossíntese do aminoácido cisteína (FIGURA 15A).

Em relação a rede IPP do CD104 SN, esta apresenta nós de interação entre as proteínas Subunidade V do centro de reação do fotossistema I, cloroplástico (PSAG) e uma proteína semelhante a PsbP, descrita como necessária para o reparo eficiente de PSII fotodanificado, mas não fortemente associado ao complexo (PPL1) e de PPL1 com a uma nucleosídeo difosfato cinase, envolvida na transferência de fosfato beta (NDPK). Não são descritas interações obtidas por banco de dados, mas principalmente por co-expressão em outros organismos como *A. thaliana* e *Z. mays* (FIGURA 15B).

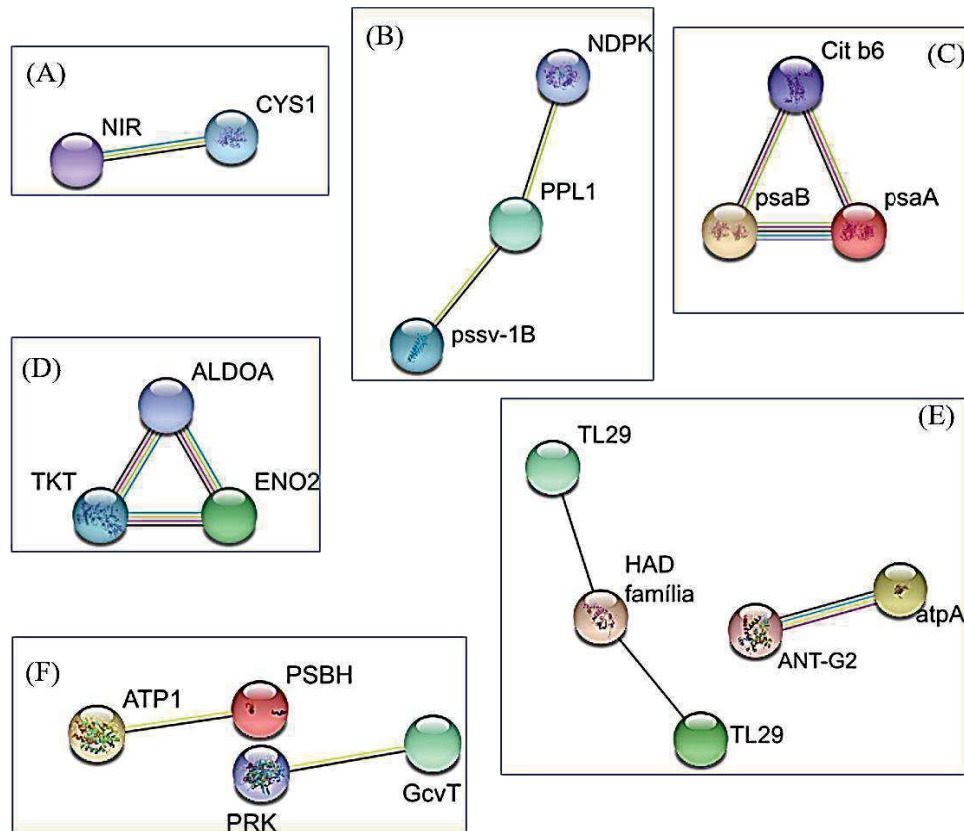
A IPP no tratamento SNI, apresenta 3 nós conectados entre si: apoproteína A1 e A2 da clorofila 'a', fotossistema I P700 e citocromo b6. Está descrito na literatura, que presença das proteínas do PSI indicaria um transporte de elétrons cíclico para ganho na eficiência da fotossíntese (HOLÁ *et al.*, 2017) corroborado pelo cit b6 (FIGURA 15C).

Quanto a IPP da interseção CN&SN, esta apresentou três nós com as funções frutose bifosfato aldolase (ALDOA), enolase (ENO2) e a transcetolase cloroplastica (TKT). A co-expressão não está descrita em trigo, mas descrito para milho e *Arabidopsis*, entretanto, em banco de dados experimentais em humanos, foi observado a maior quantidade de informação (YANG, XIAOLI *et al.*, 2010). Essas enzimas se conectam na direção glicolítica e na direção da fixação de carbono (FIGURA 15D).

A interseção SN&SNI apresentou descrição em co-expressão entre as prováveis peroxidases e atividade hidrolase haloácido desalogenase, descrita em *A. thaliana* entre outros. As informações de IPP entre ANT-G2 e ATPA, entretanto, se destaca a descrição de que estão envolvidas no controle da morte celular, em especial a apoptose (WRZESINSKI; FEY, 2018) (FIGURA 15E).

A IPP apresentada na interseção CN&SNI do CD104 apresentou dois grupos de interação. Um, entre uma ATP sintase (ATP1) e a proteína H do centro de reação PSII (PSBH). Estas proteínas são descritas com outras, como importantes para caracterizar o processo fotossintético se a ATP sintase fosse de cloroplasto (WANG *et al.*, 2016). Outra interação verificada foi entre fosforibulocinase (PRK) e uma aminometil transferase da família GcvT (sistema de degradação de glicina), e são descritas como correlacionadas no metabolismo sob estresse térmico e/ou a recuperação (LIU, GUO-TIAN *et al.*, 2014). Estes pares foram bem descritos para co-expressão em *A. thaliana* e *O. Sativa* (FIGURA 15F).

FIGURA 15 - IMAGENS DAS REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA OBTIDOS NO STRING V.11.0 A PARTIR DAS ID UNIPROT OBTIDAS DE FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. CD104 DOS TRATAMENTOS CN, SN, SNI, INTERSEÇÕES DE TRATAMENTOS CN&SN, SN&SNI E CN&SNI.



FONTE: o Autor (2020). Tratamentos CN (A), SN (B), SNI (C), interseções de tratamentos CN&SN (D), SN&SNI (E) e CN&SNI (F). NIR: Nitrito redutase, CYS: Cisteína sintase; NDPK: Nucleosídeo difosfato cinase; PPL1: Proteína 1 semelhante a PSBP; pssv-1B: PSAG – Subunidade V, CR PSI; Cit b6: Componente do Citocromo b6, PETB; psaA: Apoproteína A1 do PSI, PSAA; psaB: Apoproteínas A2 do PSI, PSAB; ALDOA: Frutose difosfato aldolase; TKT: Transcetolase; ENO2: Enolase; TL29: Proteína do lúmen da tilacóide de 29KDa; HAD família: Hidrolase do tipo haloácido desalogenase; ANT-G2: Transportador ADP/ ATP, mitocôndria; atpA: Subunidade alfa ATPsintase, cloroplasto; ATP1: Subunidade alfa ATP sintase, mitocondrial; PSBH: Proteína H do PSII; PRK: fosforibulocinase, cloroplasto; GcvT: Aminometil transferase (sistema T de clivagem de glicina) mitocondrial. Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. As abreviaturas usadas foram obtidas do UNIPROT ou da anotação do STRING, obtidas dos de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*). ‘Nós’ interligados por linhas amarela, preta, rosa e azul, indicam que a informação da interação é tem origem da literatura (PubMed), dados de coexpressão, experimentalmente obtido e em banco de dados curados de interação proteína-proteína.

Relacionado ao CD120, a rede IPP do CN apresentou maior número de nós e redes, o que é devido ao grande número de identificações deste tratamento. A interação entre uma possível quinona oxidoreductase e uma tioredoxina (tipo M) acompanhada de outras enzimas, são descritas como afetadas no cloroplasto sob estresse abiótico (KOSOVÁ *et al.*, 2018). A interação entre a apoproteína A1 do PSI e a CP43 do PSII, é descrita entre os inúmeros transcritos em *Jatropha curcas* (KUMAR *et al.*, 2017). As proteínas de ribossomos 40S e 50S são descritos como relacionadas a montagem de ribossomo no banco de dados de rede e a reação (FIGURA 16A).

A IPP para o CD120 SN, apresentou interação entre uma subunidade delta da ATP sintase (ATPD) com subunidade V do PSI (PSSV-1B) e entre as proteínas catalase (CAT) e fosfoglicomutase (PGM2) (FIGURA 16B). A co-expressão em *O. Sativa* e *A. thaliana* explicam a interação entre ATPD e PSSV-1B. Para a CAT e PGM2, dados experimentais e de banco de dados, relacionam estas proteínas envolvidas em exocitose de proteínas do lúmen de grânulos ricos em ficolina (String v.11.0 (SZKLARCZYK *et al.*, 2019)) e ainda são descritas como proteínas envolvidas no estresse por calor e recuperação em uva (LIU, GUO-TIAN *et al.*, 2014).

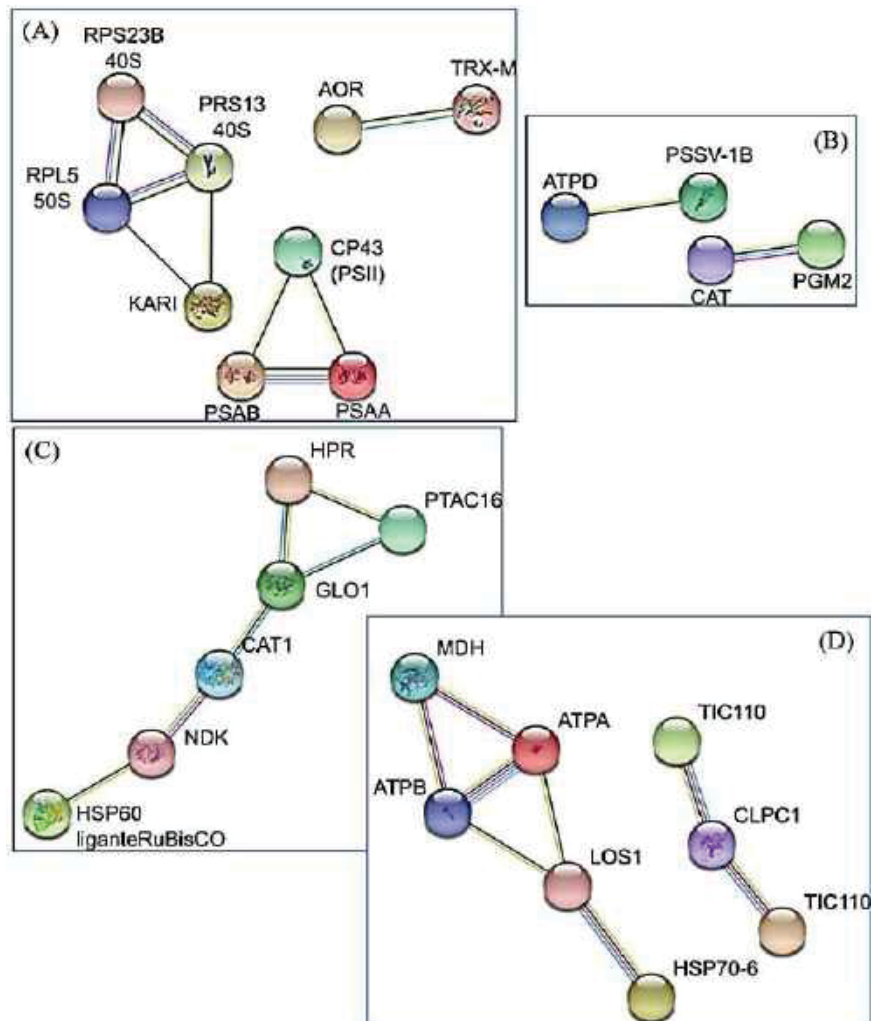
Não houve descrição de IPP para CD120 SNI. Evidentemente a proteína do complexo de evolução do oxigênio do PSII está relacionada à outras, mas apenas esta foi encontrada no grupo de proteínas exclusivas deste tratamento.

Em relação as interseções, para CN&SN, também CD120, obteve-se uma rede formada por vários nós. Entre as atividades glioxalato oxidase (GLO1), catalase-1 (CAT1) e nucleotídeo difosfato cinase (NDK) se encontram correlações que são mais bem explicadas. Todos os nós são explicados por co-expressão em no mínimo *A. thaliana*, exceto o existente entre CAT1 e NDK, porém para esta interação, verifica-se evidências em banco de dados da IPP (FIGURA 16C).

Entretanto, para a interseção SN&SNI do CD120 nenhuma interação entre as proteínas foi verificada no String v.11.0. O que pode estar relacionado ao fato do conjunto de proteínas ser bastante pequeno (ou seja, menos de 5 proteínas – sendo 2 ANT – G2 proteína-2 transportadora de ADP / ATP mitocondrial), ou que este grupo de proteínas não está muito bem conectado nos bancos de dados e fontes de informações utilizadas, não indicando falta de significado, mas sim, que essas proteínas, ou não foram muito estudadas ou suas interações podem ainda não ser conhecidas pelo String v.11. 0. Como já foi observado no estudo de GO, essas proteínas são na maioria componentes de membrana ou de parede celular.

A interseção de CD120, CN&SNI (FIGURA 16D), apresentou interações entre grupos distintos e todas são explicadas por co-expressão. Entre as proteínas TIC110 e chaperona CLPC1, ambas cloroplásticas, *em A. thaliana*, associadas também em uma rede de importação e controle de qualidade do estroma (RICHARDSON; SINGHAL; SCHNELL, 2017). Para a interação entre as subunidades alfa e beta da ATP sintase (ATPA e ATPB) e a malato desidrogenase (MDH) são descritas no conjunto de proteínas que tem sua atividade aumentada como resposta e tolerância ao estresse por seca em cereais, assim como proteínas ribossomais (GHATAK; CHATURVEDI; WECKWERTH, 2017).

FIGURA 16 - IMAGENS DAS REDES DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA OBTIDOS NO STRING V.11.0 A PARTIR DAS ID UNIPROT OBTIDAS DE FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. CD120 DOS TRATAMENTOS CN, SN, INTERSEÇÕES DE TRATAMENTOS CN&SN E CN&SNI.



FONTE: o Autor (2020). Tratamentos CN (A), SN (B), interseções de tratamentos CN&SN (C) e CN&SNI (D), SNI não apresentou rede. RPS23B 40S: Proteína S23-2 do ribossoma 40S; PRS13 40S: Proteína S13 do ribossoma 40S; RPL5 50S: Proteína ribossomal L5 50S; KARI: Cetol-ácido reductoisomerase; AOR: NADPH-dependente oxidorreductase 2-alcenal redutase, cloroplástica; TRX-M: Tioredoxina tipo M, cloroplástica; PSAA: Apoproteína A1 do PSI; PSAB: Apoproteínas A2 do PSI, CP43 (PSII): Proteína CP43 do centro de reação do fotossistema II; ATPD: Subunidade delta da ATP sintase do cloroplasto; PSSV-1B: Subunidade V do fotossistema I; CAT: Catalase; PGM2: Fosfoglicomutase; HPR: Glicerato desidrogenase, peroxisomal; PTAC16: Proteína transcricionalmente ativa de plastídio 16, cloroplástico; GLO1: Glioxalato oxidase (GOX), CAT1: Catalase-1; NDK: Nucleosídeo difosfato cinase (NDPK); HSP60 ligante de RuBisCO: Subunidade alfa da proteína de ligação à subunidade grande da RuBisCO, cloroplástica; MDH: Malato desidrogenase; ATPB e ATPA: Subunidades alfa e beta da ATP sintase; LOS1: Proteína ribossomal S5 / proteína da família do fator de alongamento G / III / V; HSP70-6: Choque térmico 70 kDa proteína 6 cloroplástica; TIC110: Proteína TIC110 cloroplástica; CLPC1: Proteína chaperona ClpC1, cloroplastica. Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN) e sem (SN) adição de fontes de nitrogênio e, SN inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. As abreviaturas usadas foram obtidas do UNIPROT ou da anotação do STRING, obtidas dos de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*). ‘Nós’ interligados por linhas amarela, preta, rosa e azul, indicam que a informação da interação é tem origem da literatura (PubMed), dados de coexpressão, experimentalmente obtido e em banco de dados curados de interação proteína-proteína.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho buscou-se entender a fisiologia de plantas de trigo em estágios iniciais de desenvolvimento inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* através das proteínas presentes. A premissa inicial se baseou em trabalhos anteriores onde as respostas distintas das cv.s CD104 e CD120 à mesma bactéria, tanto em estudos *in vitro*, quanto em vaso (NEIVERTH *et al.*, 2014). O estudo das proteínas presentes em condições onde fontes de N não fossem fornecidas, seria importante para avaliar a interação e observar indícios de efeito da bactéria em promover o crescimento e possivelmente de FBN.

Esse estudo foi realizado *in vitro*, visto que, estudos nessas condições podem proporcionar um meio efetivo de avaliar os efeitos da ausência N inoculação bacteriana. A grande vantagem de estudos de *in vitro* de tecido vegetal é obter plantas de selecionada qualidade e livre de patógenos (MURASHIGE, T., 1977). Grande número de experimentos *in vitro* e em condições gnotobióticas com vários intuitos têm sido realizados. Dentre eles, o estudo de genótipos de plantas responsivas a inoculação com algumas PGPR, seleção de PGPR mais eficazes nos seus efeitos de promoção no crescimento, estudos de diversos efeitos das PGPR com efeito de biocontrole, atividades antifúngicas, indução de resposta sistêmica (*Induced Systemic Resistance* - ISR) entre outros. (SAHARAN; NEHRA, 2011).

Para conhecer as proteínas que seriam características de cada tratamento a análise proteômica baseado na identificação de proteínas por espectrometria de massas (MS) associada ao fracionamento das proteínas por SDS-PAGE antes da MS foi usada. A partir disso foi possível identificar um grande número de proteínas (1015 para CD104 e 1048 para CD120). Na proteômica com base no fracionamento de proteínas por SDS-PAGE, após o fracionamento das proteínas em SDS-PAGE, as frações tripsinizadas seguem para um equipamento de MS que é precedido por cromatografia líquida em C18 (fase reversa). Esse fracionamento, separa os peptídeos oriundos das frações, que seguem então para o espectrômetro de massas.

Em trabalho que compara o fracionamento prévio com SDS-PAGE e com um cromatógrafo líquido de alta performance de fase reversa (*Reverse-phase high performance liquid chromatograph* – RPLC) foi mostrada a eficiência de cobertura em número de peptídeos maior para o prévio fracionamento com SDS-PAGE sobre o RPLC. Ambos os pré-fracionamentos, seguiram para separação em sistema RPLC acoplada a MS (Nano-UHPLC usando C18) (YIN, XUEFEI *et al.*, 2015). Além disso, essa metodologia proteômica com base no fracionamento de proteínas por SDS-PAGE foi mostrada como de fácil execução e reprodutibilidade em experimento usando folhas de arroz (PRIETO *et al.*, 2018).

Outros trabalhos ainda mostraram que comparação dos dados obtidos do uso da eletroforese 1D SDS-PAGE-LC-MS/MS e 2DE não-desnaturante LC-MS/MS foi realizada para células de músculo liso bronquial humano e indicou que, para o protocolo de obtenção de amostras, onde uma foi a fração solúvel e a outra fração *debrée* solubilizada, houve um maior número de identificações no conjunto em 1D-SDS-PAGE do que no 2DE desnaturante-LC-MS/MS. Entretanto destaca que foram comparadas amostra com preparo diferente (JIN *et al.*, 2019). Em estudos de identificação de proteínas de membrana de bactérias patogênicas a técnica de 1D SDS-PAGE-LC-MS/MS (ou proteômica com base no fracionamento de proteínas por SDS-PAGE seguida de LC-MS/MS) se mostrou mais eficiente inclusive na separação de outros proteomas subcelulares e independente da espécie bacteriana (THEIN *et al.*, 2010).

Pode-se observar que em trabalhos que usam 1D SDS-PAGE-LC-MS/MS o número de proteínas identificadas está mais relacionada as amostras e ao equipamento de MS do que com a técnica de separação (FRITZ *et al.*, 2012; MASCHIO *et al.*, 2018).

5.1 *Avaliando dados proteômicos e fisiológicos*

O N desempenha um papel importante no crescimento das plantas e geralmente é absorvido como nitrato ou íons de amônio, que são considerados elementos essenciais do metabolismo e muito importantes para a formação de proteínas, enzimas e estruturas como da clorofila entre outras (BATRA *et al.*, 2018). Como principal componente da molécula de clorofila, pode determinar, em grande parte, a cor da folha e a saúde de uma gramínea (JIANG *et al.*, 2016). E, dependendo da dose fornecida a uma planta, pode ocasionar amplas variações no crescimento e nas respostas fisiológicas (YAO *et al.*, 2019). O que estaria de acordo com as observações das plantas do tratamento SN de CD104 e CD120 por terem apresentado valores menores para o comprimento da parte aérea, massa fresca e seca comparados ao tratamento CN (FIGURA 1 e 2). E ainda, o amarelamento das folhas, a diminuição dos índices de clorofila (CHL) e do índice de nitrogênio (NBI) visto nas análises realizadas (FIGURA 4).

Por meio de análises agronômicas, fisiológicas e proteômicas em trigo, pesquisadores verificaram que o conteúdo total de clorofila, conteúdo de N, a eficiência fotossintética, o peso, tempo de desenvolvimento, tempo de estabilidade da massa e a expressão de proteínas envolvidas na fotossíntese são influenciados pela presença ou ausência de N. Sendo significativamente superior na presença de N e diminuídos na ausência (SHANGGUAN; SHAO; DYCKMANS, 2000; ZHU *et al.*, 2020). O baixo teor ou ausência de N também causaram reduções na altura, biomassa da parte aérea, número de afilhos, clorofila e conteúdo

de N em outras espécies de gramíneas como no azevém (JIANG *et al.*, 2016; YAO *et al.*, 2019), sorgo e arroz (OKAMOTO; OKADA, 2004).

Outros pesquisadores verificaram também, aumento de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs), envolvidas no metabolismo do amido e da sacarose, metabolismo lipídico e metabolismo da proteína em sementes de trigo com 72 h de germinação, oriundas de sementes que foram obtidas de plantas cultivadas com adição de fertilizante nitrogenado comparado ao de plantas onde não foi adicionado fertilizante nitrogenado. Observaram o aumento na abundância de proteínas envolvidas na fotossíntese (GO: 0015979), constatando que sementes oriundas de maior conteúdo de N desenvolvem maior capacidade fotossintética e podem promover o crescimento das plântulas. (WEN *et al.*, 2021).

Em nosso experimento, verificando a presença e ausência de proteínas identificadas em folhas de trigo, notou-se no tratamento CN, de ambas cultivares, a presença de proteínas envolvidas nos processos biológicos relacionados a fotossíntese, metabolismo de carboidratos, ácidos graxos e biossíntese de aminoácidos (FIGURA 9 e 12) para ambas cultivares. Ou seja, mesmo perfil de função citado pelos pesquisadores acima (JIANG *et al.*, 2016; OKAMOTO; OKADA, 2004; YAO *et al.*, 2019).

No entanto, CD120 apresentou maior número de proteínas nesta condição CN do que CD104 (FIGURA 7). Além de proteínas inter-relacionadas à montagem de ribossomo e para o complexo de iniciação da tradução (FIGURA 16). Esses dados correlacionados aos encontrados por Wen e colaboradores (WEN *et al.*, 2021), e as respostas vistas nas análises da fluorescência da clorofila (TABELA 2), indicam plantas em fase de crescimento aparentemente normal nesse tratamento, independente da cultivar, sem prejuízos fisiológicos aparentes causados pelo próprio ambiente *in vitro*.

Para o tratamento SN de ambas as cv.s (CD104 e CD120), de acordo com os resultados obtidos, foram observadas proteínas relacionadas a fotossíntese (TABELA 4 e 7, FIGURA 10 e 13). Observando que os dados da taxa de transporte de elétrons não sofreram alterações, além do aumento de Y(II) em CD120 e se mantido em CD104, comparado ao CN (TABELA 2), ambos genótipos continuam realizando fotossíntese, mesmo com a diminuição da clorofila (CHL) e de N (NBI).

Em experimentos de senescência em plantas de trigo submetidas a privação de N, foram observadas a diminuição da clorofila ao longo do tempo e também a degradação da RuBisCO por diminuição na intensidade de todas as bandas polipeptídicas, incluindo ambas as subunidades RuBisCO (cadeia grande e pequena) por SDS-PAGE, no entanto, nenhuma mudança substancial foi observada no perfil de proteínas das folhas das plantas no tratamento

não submetidas a privação de N (CRIADO *et al.*, 2007). Nesse sentido, ao analisar os géis de acrilamida do nosso experimento (FIGURA 6), aparentemente ou visualmente não foi observada a alteração na intensidade das bandas de nenhum tratamento, assim como visto por Criado e colaboradores (CRIADO *et al.*, 2007), reforçando a ideia de que a fotossíntese em nosso modelo experimental não foi afetada pela ausência de N.

Entretanto, foi observado, entre as proteínas identificadas para o tratamento SN de ambas cultivares, a presença de proteínas do metabolismo antioxidante como a catalase (A0A3B6PE57) e Nucleoredoxina (A0A3B6B5J2) na cv. CD120 e Glutathione S-transferase (A0A3B5XVD9) em ambas as cultivares (TABELA 4 e 7).

Os estresses ambientais muitas vezes aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem resultar em danos para biomoléculas como lipídios, DNA, proteínas e até mesmo levar a morte celular (YAO *et al.*, 2019). O metabolismo antioxidante desempenha um papel importante na minimização da toxicidade causada por ROS, quando aumentam além dos níveis basais. As principais enzimas que limpam, decompõem ou removem essas moléculas reativas são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e ascorbato peroxidase (APX). Suas atividades antioxidantes são alteradas em resposta a deficiência ou excesso de N (LIAO *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2019), assim como observado no tratamento SN da cv CD120 com a presença da CAT e sua ausência no tratamento CN.

As CAT são enzimas de oxiredução que não necessitam de um redutor, por isso se destacam entre as demais enzimas do sistema antioxidante, pois catalisam uma reação de dismutação. “Junto com APX, as catalases também se distinguem de muitas outras enzimas que metabolizam peróxidos por sua alta especificidade para H_2O_2 , mas fraca atividade contra peróxidos orgânicos”. As catalases são enzimas altamente expressas, particularmente em certos tipos de células vegetais e, portanto, são parte integrante do sistema antioxidante das plantas (MHAMDI *et al.*, 2010).

Neste trabalho, no tratamento SN, foi verificada a presença de CAT na cv. CD120, mas não na cv. CD104. A ausência nesta cv. pode estar relacionado a uma resposta particular do genótipo à duração da deficiência de N, diferente da cv. CD120 que poderia ser considerada mais tolerante a deficiência de N, mesmo não havendo diferenças significativas entre as cultivares, nesse tratamento relacionadas aos dados de desenvolvimento das plantas, como comprimento da parte aérea, massa fresca e seca. Em outra pesquisa, a deficiência de N aumentou significativamente as atividades de SOD, APX e CAT em folhas de trigo (*T. aestivum* L.) após 21 dias de cultivo (POLESSKAYA; KASHIRINA; ALEKHINA, 2004). No entanto, as atividades de enzimas antioxidantes podem ser influenciadas pelo tempo de duração da

deficiência de N e pelo genótipo/espécie, com já observado em trigo, onde a atividade da CAT foi semelhante até o dia 6 nas plantas com e sem N e após, a atividade diminuiu em plantas sem N, embora permanecesse quase constante nas plantas com N (CRIADO *et al.*, 2007). Em arroz, enzimas como SOD, POD, CAT, diminuíram com a duração da deficiência de N após 20 dias, o que por sua vez agravou a peroxidação das membranas e degradação de grandes biomoléculas, como ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) e clorofila (HUANG, Z. A. *et al.*, 2004). Em azevém, também houve a redução de CAT na cultivar susceptível, após 20 dias de deficiência de N em diferentes localizações subcelulares, levando ao declínio do crescimento das plantas (YAO *et al.*, 2019).

Entretanto, ao analisarmos os resultados da extinção não-fotoquímica Y(NPQ) (TABELA 2), notamos um incremento para CD104 e nenhuma alteração para CD120 neste tratamento (SN) comparados ao tratamento controle (CN), indicando ativação do mecanismo de fotoproteção, conforme descrito na literatura (KLUGHAMMER; SCHREIBER, 2008; PASCHENKO *et al.*, 2016). Assim é possível indicar uma possível tolerância de CD120 a ausência de N comparada ao CD104. Como demonstrado nos dados de IPP para a cv. CD120, em que CAT e PGM2 foram descritas em uva como proteínas de recuperação do estresse (LIU, GUO-TIAN *et al.*, 2014)

A presença da glutathione S-transferase (DHAR), (GST - A0A3B5XVD9) em ambos os genótipos sob o mesmo tratamento (SN) é observada. Estas enzimas são presentes em todas as partes celulares e codificadas por uma família multigênica divididas em 14 classe em plantas terrestres. São induzidas por várias condições de estresse (bióticos e abiótico) e apresentam papel celular no metabolismo primário e secundário. O estresse oxidativo é particularmente indutor de algumas GST e sua função mais conhecida como de desintoxicação de substâncias tóxicas por sua conjugação com a glutathione e atenuação do estresse oxidativo pode ser somada participação no transporte hormonal. As DHAR são uma classe entre várias específicas de planta e são Cys-GST que contém um resíduo de cisteína no sítio ativo (FOYER; NOCTOR, 2011; GULLNER *et al.*, 2018; SYLVESTRE-GONON *et al.*, 2019). A busca por homologia no UNIPROT/blast, indicou maior semelhança com uma DHAR de citosol.

A nucleoredoxina 1 (A0A3B6B5J2) (GO: 0045454) observada apenas no tratamento SN do CD120 (TABELA 7) está associada a presença de CAT. Foi verificado que nas células vegetais a oxidoredutase Nucleoredoxina 1 (NRX1) protege enzimas antioxidantes como a CAT da oxidação induzida por ROS, e este efeito protetor da NRX1 aumentou a capacidade de desintoxicação por H₂O₂ da CAT, protegendo assim a célula vegetal do estresse oxidativo (KNEESHAW *et al.*, 2017).

No tratamento SN do CD104 (TABELA 4), foi encontrada a enzima anidrase carbônica (A0A3B6RQ40) (GO: 0015976). A anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima que contém zinco e está presente em uma variedade de tecidos vegetais. No mesofilo da planta C3, a AC está localizada principalmente no estroma do cloroplasto e no citosol. No estroma do cloroplasto, tem associação específica com a RuBisCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase), permitindo que o CO₂ interaja com ela, facilitando o equilíbrio do estoque de carbono inorgânico e a transferência de CO₂ através da membrana do cloroplasto, garantindo o suprimento de CO₂ para RuBisCO (DAS *et al.*, 2016; FLORYSZAK-WIECZOREK; ARASIMOWICZ-JELONEK, 2017; RUDENKO *et al.*, 2015). A presença da mesma AC (A0A3B6RQ40) no tratamento CN da CD120 indicaria o mesmo efeito (TABELA 6).

Já atividade da AC no citoplasma, parece estar vinculada a ação de hormônios, como o ácidos abscísico e jasmônico, e esse fato permite classificar as ACs citoplasmáticas como enzimas significativas para a resposta ao estresse das plantas, além das suposições de que estão envolvidas no transporte de carbono inorgânico para os cloroplastos e aparentemente mitigam as mudanças de pH sob a influência de fatores externos e protegem as enzimas do estroma contra a desnaturação durante mudanças rápidas e drásticas nas condições de luz (FLORYSZAK-WIECZOREK; ARASIMOWICZ-JELONEK, 2017; RUDENKO *et al.*, 2015).

A expressão elevada da AC na célula aumenta sua resistência às concentrações citotóxicas de H₂O₂. Sua expressão regulada positivamente alivia as concentrações citotóxicas de H₂O₂ durante o estresse hídrico e protegeu a planta do estresse oxidativo (DAS *et al.*, 2016). Isso poderia explicar a presença da AC (A0A3B6RQ40) exclusivamente no tratamento SN e não no tratamento CN da cultivar CD104, indicando ação antioxidante. Entretanto é mais difícil justificar sua presença no tratamento CN do CD120 e ausência no tratamento SN. Apesar de que, realizando busca no UNIPROT/blast, houve 72,6% de identidade com uma AC de cloroplasto de *Hordeum vulgare*(M0W433), uma proteína acurada do UNIPROTKB.

Além das proteínas do metabolismo antioxidante, também foram identificadas a beta 1,3 glucanase (A0A3B6H1A8) em CD104 e a fosfoglucomutase (A0A3B6HW60) em CD120, proteínas essas, classificadas pelo Panther no processo biológico do metabolismo de carboidratos (GO: 0005975). A beta 1,3 glucanase, aqui classificada como do metabolismos de carboidrato, pertence ao 2º grupo de 17 de proteínas relacionadas à patogenicidade (*pathogenesis related protein* – proteínas PR) e, como glicosidase é descrita por hidrolisar β-1,3-glucana da parede celular de fungos como uma forma da planta se defender contra infecções (ENOKI *et al.*, 2017). Essas enzimas têm papel importante descrito em várias fases de desenvolvimento e no alongamento de plantas, como descrito para segmentos de coleóptilo de

aveia por afrouxamento da parede celular induzida por auxina (MASUDA; WADA, 1967; RAMPITSCH *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2019). Neste tratamento, SN do CD104, essa proteína não poderia ter correlação à patogenicidade pelo fato do ambiente *in vitro* desse tratamento ser inócuo.

Como a defesa induzível por estresse é custosa para a planta, condições de N provavelmente afetariam o equilíbrio entre o crescimento e a defesa (MAGLOVSKI *et al.*, 2017). De acordo com esses mesmos autores, quitinases (EC 3.2.1.14) e glucanases (EC 3.2.1.39) são enzimas de defesa típicas pertencentes ao grupo de proteínas PR com funções múltiplas nas plantas.

Estudos têm mostrado que ambos os tipos de condições não ideais de N (alto ou baixo), alteram a capacidade das plantas de resistir a estresses ambientais e identificaram enzimas relacionadas à defesa, dependentes da nutrição com N. Uma correlação positiva com N excessivo foi encontrada para a atividade de quitinases e peroxidases nas folhas de *Arabidopsis* (DIETRICH; PLOSS; HEIL, 2004). Várias isoformas de quitinase e glucanase também responderam aos regimes fertilização com N em trigo. Houve um aumento significativo da atividade de quitinases e glucanases na ausência de N, nas folhas de trigo, comparado ao controle com N (dosagem recomendada) após 10 dias de cultivo (MAGLOVSKI *et al.*, 2017). Essas proteínas não só são influenciadas pela suplementação de N, como também por estresse abiótico, onde foi visto que o perfil de proteínas PR revelou que quitinases (EC 3.2.1.14) e glucanases (EC 3.2.1.39) foram ativadas no trigo por seca (GREGOROVÁ *et al.*, 2015).

O fato de proteínas PR serem influenciadas pela suplementação por N e por estresse ambiental, poderia explicar a presença de beta 1,3 glucanase no tratamento SN, para a cv. CD104, principalmente pelo fato de não ter sido identificada no tratamento CN da mesma cultivar. Como essas proteínas podem ser influenciadas em doses baixas ou excessivas de N, indicaria que em nosso experimento, a quantidade de N utilizada no meio de cultura do tratamento CN, não foi excessiva para nenhuma das cultivares, pois a cv. CD120 também não apresentou a beta 1,3 glucanase no tratamento CN. Já no tratamento SN, a cv. CD104 foi afetada pela ausência de N. Porém a cv. CD120, não respondeu da mesma forma no tratamento SN. Os possíveis papéis dessas enzimas na adaptação ao fornecimento de N ainda são desconhecidos, e seu papel como componentes de defesa ainda precisa ser elucidados (MAGLOVSKI *et al.*, 2017).

A fosfoglicomutase (A0A3B6HW60) identificada em plantas da cv. CD120 cultivadas na ausência de N (SN), participa tanto da degradação quanto da síntese de glicose (CONSORTIUM, 2019). Carboidratos são produzidos na fotossíntese, seus carbonos são base

para outras estruturas além de fonte de energia para vários processos biológicos. Esses carbonos são importantes reguladores do metabolismo do N nas plantas. Porém, diferentes fatores ambientais como a disponibilidade de N faz a fixação fotossintética de carbono vulnerável. (YANG, MIAO *et al.*, 2019).

Em plantas existem fosfoglicomutases de plastídios (pPGM) e do citosol (cPGM). As pPGM quando ausentes em mutantes, aparentemente diminuem a síntese de amido em folhas. As cPGM não apresentam muitos estudos, mas foi demonstrado que a sua ausência total (mutantes) seria letal à célula. Sua atividade é converter glicose-6-P (gli-6P) em glicose-1-P (gli-1P). E, juntamente com a fosfoglicoisomerase que realiza a reação $\text{gli-6P} \rightleftharpoons \text{Frutose-6-fosfato (Fru-6P)}$, mantêm o equilíbrio entre as principais vias catabólicas (glicólise, via das pentoses-fosfato,) e anabólicas (síntese de polissacarídeos, amido e da parede celular) (EGLI *et al.*, 2010). Como uma enzima de sentido metabólico duplo e citossólica, é importante poder entender qual o estado metabólico que prevalece entre as proteínas tanto no CD120 SN, como nas interseções CN&SN e SN&SNI (TABELA SUPLEMENTAR 5 e 6), assim como a interseção geral (CN&SN&SNI) (TABELA SUPLEMENTAR 8). Deste último, entre as enzimas citossólicas e processos da glicólise e gliconeogênese encontramos frutose-difosfato aldolase (W5EDL3, W5FL09 e A0A3B6FUA0), fosfoglicerato cinase (P12783, A0A3B5Z298 e A0A3B6RQL1) e triosefosfato isomerase (A0A3B6GQZ6). Considerando que a interseção geral apresenta predominantemente os processos biológicos fotossíntese, coleta de luz (GO: 0009765), síntese de ATP acoplado ao transporte de prótons (GO: 0015986), processo biossintético de UTP (GO: 0006228), processo biossintético de ATP (GO: 0006754), fixação de carbono (GO: 0015977), desintoxicação de oxidante celular (GO: 0098869), ciclo redutor de pentose-fosfato (GO: 0019253); é possível sugerir que a condição de cultivo *in vitro* esteja oferecendo condições normais de atividade biossintética e de desenvolvimento no momento em que a parte aérea das plantas de trigo foi coletada. E a presença desta fosfoglicomutase no tratamento SN do CD120 poderia estar relacionada à um acúmulo de gli-6P, que deve ser convertido à gli-1P, substrato para biossíntese de amido, como observado em sementes de arroz em desenvolvimento (CHANG *et al.*, 2017). Entretanto, não há outras evidências para suportar essa hipótese, além do fato de que as plantas apresentam energia para desenvolvimento mesmo nesse tratamento sem N. Com relação às interseções CN&SN CD120, não foram observadas proteínas de processos metabólicos de carboidratos e sim enzimas de processo fotossintético, e enovelamento e reenovelamento proteico (nenhuma classificada em processo glicolítico ou neoglicogenese), sendo a glicerato desidrogenase HPR anotada como peroxissomal. Em

SN&SNI CD120, estão apenas proteínas de transporte de ADP/ATP (FIGURA SUPLEMENTAR 5 e 6).

Uma segunda opção para explicar a presença de fosfoglicomutase no tratamento do CD120 SN, pode estar relacionada à via de Leloir. Esta via descreve a fosforilação da galactose por uma galactocinase e produz galactose-1-fosfato (gal-1P). Por sua vez, uma galactose-uridil transferase, transfere UMP a partir de glicose-1-UDP (gli-UDP) e forma galactose-1UDP e gli-1P. Entretanto, essa enzima só foi observada em 2 espécies vegetais, e pouca informação dessa via pôde ser observada em outras espécies vegetais. Para completar essa via, uma epimerase converte a gal-1UDP em gli-1UDP, realimentando o consumo de galactose. No entanto, a gli-1P formada poderá ser convertida pela fosfoglicomutase em gli-6P e seguir para vias de produção de energia ou reserva celular. Plantas superiores podem apresentar enzima para transformar um monossacarídeo-1-fosfato em monossacarídeo-1-UDP, que é por uma enzima conhecida como monossacarídeo UDP-pirofosforilase. O que explicaria a necessidade de uma fosfoglicomutase, seria o *turnover* de parede celular ou a degradação de arabinoglucano-proteínas que libera galactose em plantas, assim como, sob estresse as plantas acumulam oligossacarídeos da família das rafinoses - derivados alfa-galactosil da sacarose (CHANG *et al.*, 2017), o que seria uma fonte que justificaria a necessidade de fosfoglicomutase, para lidar com a gli-1P, oriunda da via, e uma fonte de N pela degradação de proteínas em um tratamento sem N, ou ainda, para formação desses oligossacarídeos da família das rafinoses. Entretanto, as demais enzimas da via de Leloir, proteases, alfa-galactosidases não foram detectadas neste tratamento (SN da cv. CD120), o que também não descarta a hipótese. A interseção CN&SN CD120 (TABELA SUPLEMENTAR 5) apresenta uma UDP-glicosiltransferase, que pode ser participante desta via tanto para fornecer a resposta necessária à condição SN e a outras funções para a condição em CN.

Para corroborar com os dados proteômicos no tratamento SN para ambas as cv.s, em que existe estresse pela falta de N, é possível associar o conteúdo de flavonoides (FIGURA 5A), onde os níveis foram superiores nos tratamentos SN em relação ao tratamento CN. De acordo com a literatura, o teor de compostos fenólicos se acumula nas folhas de trigo em resposta a deficiência de N, ataque de patógenos, dentre outros tipos de estresse (CARTELAT *et al.*, 2005; TREUTTER, 2006). O que também é corroborado pelo dado de dissipações não-fotoquímicas e fotoquímica, indicando que as plantas estariam sofrendo um nível de estresse nesse tratamento. O que não é observado nas plantas do tratamento CN para ambas as cultivares testadas.

Devido a grande importância do N para a cultura do trigo, como descrito até agora, surge a necessidade de requerer opções alternativas para o manejo do N. Bactérias associadas à raiz que podem fixar e fornecer N aos cereais é uma solução sustentável para o gerenciamento de N em uma escala de tempo mais curta (BLOCH *et al.*, 2020). Muito já é conhecido, no entanto, muito ainda precisa ser compreendido. Nesse sentido em nosso experimento, avaliamos os efeitos da presença da *H. seropedicae* na fisiologia e no proteoma de plantas de trigo cultivadas em meio de cultura com ausência N.

Normalmente, meios de cultivo de plantas *in vitro* possuem a presença de fonte de N e carbono (C), normalmente glicose ou sacarose. No entanto, sabe-se que componentes de meios de cultivo *in vitro* como N e C, podem interferir na fisiologia da planta e da bactéria, afetando a associação entre elas. Em estudos realizados, verificou-se que a maioria dos isolados de bactérias diazotróficas obtidos, foram a partir de plantas que não receberam fertilizante nitrogenado ou receberam na dose intermediária. E que altos níveis de N, resultaram em baixo número de isolados ou na inexistência (KIRCHHOF *et al.*, 1997; MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; LAKSHMINARASIMHAN, 1999; PEDROSA, FÁBIO DE OLIVEIRA; YATES, 1988; SALA *et al.*, 2005). Quanto a fonte de carbono, raízes de crescimento ativo nesses meios excretam várias fontes de C em exsudatos metabolizados por bactérias da rizosfera que podem afetar o funcionamento e a eficiência da associação raiz-bactérias (DUBROVSKY; PUENTE; BASHAN, 1994).

Nesse contexto, nenhuma fonte de carbono foi adicionada aos meios de cultivo, e fonte de N foi adicionada apenas no tratamento CN, para controle e possibilidade de comparação com dados da ausência de N com e sem a inoculação da bactéria *H. seropedicae*, que é uma bactéria diazotrófica endofítica para algumas variedades. Nesse sentido, a metodologia utilizada para cultivo das plantas em nossos experimentos, permitiu comparar o efeito da presença e ausência de N nas plantas de trigo. E, ao avaliar o tratamento que recebeu o inóculo bacteriano, foi possível comparar alterações fisiológicas e proteômicas àquelas vistas nos outros tratamentos, e associar à inoculação, o que de fato poderia estar correlacionado a ela, sem o efeito desses componentes adicionais.

Já foi confirmada a expressão de genes *nif* pela a bactéria *H. seropedicae* SmR1, aderida à raízes da cv de trigo CD104, em condições *in vitro* utilizando meio Hoagland, semelhantes a realizadas neste experimento (PANKIEVICZ *et al.*, 2016). A presença desses genes foi justificada pelas condições de micro oxigenação do modelo experimental usado, assim como, pela baixa concentração de N do meio Hoagland, que é quatro vezes menor que no meio MS. Extrapolando, podemos supor que nos tratamentos SN inoculados com *H. seropedicae* em

nosso experimento, que a bactéria esteja atuando como diazotrófica, para ambas as cv.s, o que também confirma a importância de excluir o N para o estudo em questão. É ainda importante observar que a bactéria na raiz do CD104 foi observada epifítica (PANKIEVICZ *et al.*, 2016) e que já foi mostrada a diferença de presença epifítica e endolítica das variedades CD104 e CD120 anteriormente (NEIVERTH *et al.*, 2014).

Relacionado aos resultados obtidos pela proteômica, observa-se que há uma resposta diferenciada entre as duas cultivares analisadas para o tratamento SNI. Primeiramente, o número de proteínas identificadas exclusivamente em cada uma, onde CD104 apresentou 8 proteínas contra apenas 1 em CD120 (FIGURA 7). Das 8 proteínas identificadas em CD104, 37% tiveram função atribuída ao processo de fotossíntese (GO0015979) (FIGURA 11). Após a anotação feita por identidade utilizando a sequência de aminoácidos (String v.11.0), foi possível verificar que das 8 proteínas de CD104, 62,5% das proteínas são relacionadas a fotossíntese. Dentre elas, observou-se proteínas como a PsaA e a PasB do fotossistema I (PSI), e a citocromo b6, como visualizado pela IPP (FIGURA 15C), o que indica um transporte de elétrons cíclico para ganho na eficiência da fotossíntese. A proteína identificada em CD120 foi classificada como proteína do PSII (GO 0015979) e atribuída ao BP fotossíntese (GO0015979), sendo do complexo de evolução de oxigênio do PSII (GO 0009654).

Em outro estudo, também utilizando a *H. seropedicae*, foi observado um efeito dela na ativação dos processos cloroplásticos de *A. thaliana* com ênfase na fotossíntese. Na sua presença, houve um acúmulo de proteínas relacionadas à fotossíntese nas folhas. Dentre essas, aproximadamente 78% (21 proteínas) estavam potencialmente envolvidas no estado redox do cloroplasto, incluindo 9 proteínas relacionadas à fotossíntese (LEANDRO *et al.*, 2019). Isso também foi observado, anteriormente, em milho inoculado com *H. seropedicae* (CANELLAS *et al.*, 2013).

Dentre as proteínas identificadas no tratamento SNI de CD104 (TABELA 5), estão as proteínas de ligação a ToxA Ptr localizada no cloroplasto 1(Q5YL57), malato desidrogenase (A0A3B6KQR8) e beta-1, 3-glucanase (Q4JH28) .

A Ptr ToxA ou apenas ToxA é uma toxina produzida pelo agente causador da mancha marron do trigo (*Pyrenophora tritici-repentis*). Estudos mostraram que após ser internalizada por células mesofílicas, a toxA se dirige ao cloroplasto de plantas de trigo sensíveis e se liga a uma proteína cloroplástica denominada de Proteína 1 de ligação a Ptr ToxA (ToxA binding protein 1 – ToxABP1), que possui uma região de ligação com a ToxA. A sua expressão é dependente de luz e possivelmente é um dímero associado a membrana do tilacóide que liga ToxA (MANNING; HARDISON; CIUFFETTI, 2007). A função da proteína ToxABP1 não

está clara na literatura, mas independente da sensibilidade da cv. à toxina ToxA, ou melhor, a doença, a ToxA é introduzida no cloroplasto e se ligará a ToxABP1. A atividade completa de ToxA ou dano causado por ToxA, depende da interação com a ToxABP1 e portanto a interação compromete a função de ToxABP1” (MANNING *et al.*, 2010). Estudos de *knockout* de genes homólogos em outras plantas também sugerem que “a interação de ToxA com a proteína ToxABP1, pode resultar na inibição da função de ToxABP1”. Nesses estudos, mutantes apresentaram redução da velocidade de crescimento, diminuição da atividade PSII com o aumento da intensidade da luz, além de redução de clorofila e desorganização do tilacóide. Efeitos compatíveis com o tratamento com ToxA em folhas de trigo sensível e especialmente relacionados ao PSII (MANNING; HARDISON; CIUFFETTI, 2007). No entanto, foi observado que um dos ortólogo a ToxABP1 é denominado de PSB29, uma proteína do PSII relacionada a sua biogenesis e relacionada ao complexo de evolução de oxigênio (MANNING *et al.*, 2010). O que sugere que essa denominação, isto é, ToxABP1, pode estar equivocada.

No tratamento CD104 SNI não existe o agente produtor (patógeno *P. tritici-repentis*) de uma toxina, semelhante a ToxA, portanto não se esperaria produção dessa proteína por essa razão, além de que parece estar presente tanto em trigo sensível e não sensível a ToxA. Sendo assim, o surgimento dessa proteína nesse tratamento parece indicar uma resposta destinada a melhorar a função do PSII. Nenhum trabalho da literatura indicou essa proteína como uma resposta a patogenicidade apesar de sua identificação estar relacionada a uma toxina de origem patogênica.

Outra proteína identificada em CD104, a malato desidrogenase (MDH), não teve sua identidade encontrada na plataforma Panther v.14.0, portanto não foi atribuída a um GO. Mas, uma proteína do grupo de máxima parsimônia (TABELA 5) é de cloroplasto A0A3B6KMJ6. As plantas superiores contêm múltiplas formas de MDH que exercem atribuições em vias distintas na célula e relativas a sua localização (NUNES-NESI *et al.*, 2005), por isso a localização dessa MDH é importante.

Em estudo voltado para a análise da importância da malato desidrogenase mitocondrial (mMDH) para o metabolismo fotossintético, observaram que plantas transgênicas de tomate (*Solanum lycopersicum*), que expressaram um fragmento do gene da mMDH, exibiram atividade reduzida desta isoforma de MDH, associada a atividade fotossintética aumentada (NUNES-NESI *et al.*, 2005). Isso fortalece a ideia de que a MDH encontrada em nosso experimento (CD104 – SNI) seja mesmo de cloroplasto, pois se correlacionarmos aos nossos resultados de fluorescência da clorofila, observamos que, mesmo não apresentando aumento de Y(II) e nem de ETR, houve um aumento de Fv/Fm e Fv/Fo em SNI de CD104 em relação ao

tratamento SN. A CD120 não apresentou exclusivamente essa proteína em nenhum tratamento, isso pode estar relacionado a uma característica do genótipo em lidar com as diferentes situações.

Em relação as MDH de cloroplasto, estudo em *A. thaliana* mostrou que a MDH-NAD dependente, além de trazer poder redutor do cloroplasto a partir de malato, é protegida de superoxidação em condições de estresse oxidativo, por conversão de uma forma dimérica não covalente à uma forma dimérica covalente (sulfonitrosilada), e que esta pode ser reduzida por tioredoxina (TRX) (BEELER *et al.*, 2014). Já a MDH-NADP do cloroplasto é entendida como uma forma de drenar o NADPH produzido em excesso ou não utilizado, convertendo oxaloacetato (OAA) em malato, mantendo o equilíbrio entre o estroma e o citosol, e essa MDH é ativada pelo conteúdo redox e ativada na luz (BEELER *et al.*, 2014; NUNES-NESI *et al.*, 2005).

Foi mostrado também que o *shuttle* do malato entre mitocôndria e cloroplasto, envolvendo MDH de ambas as organelas, estão envolvidas na ‘morte celular programada’ (MCP) e que em plantas a MCP está envolvida na organogênese, resposta ao estresse biótico/abiótico, diferenciação celular e respostas a hipersensibilidade (*Hypersensitivity Responses* - HR) (HUANG, JINGJING *et al.*, 2018).

Desta forma é difícil descrever a provável função da MDH identificada em nosso experimento (SNI de CD104), mas se associar com a ausência dela no tratamento SN, sua presença em SNI provavelmente não esteja relacionada ao estresse ocasionado pela ausência de N, e sim em resposta a presença da bactéria.

Em estudo realizado com *A. thaliana* inoculada também com *H. seropedicae*, observaram a partir de análise proteômicas das folhas, a regulação de proteínas relacionadas à defesa, sendo aumentadas na presença da bactéria. Os pesquisadores sugerem que a ativação de proteínas relacionadas à defesa contra o ataque de patógenos em folhas de plantas inoculadas com *H. seropedicae*, pode estar atuando na indução de uma resposta de resistência sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance* - SAR) em plantas de *A. thaliana* (LEANDRO *et al.*, 2019). Foi visto também que associações benéficas ou patogênicas entre plantas e os microrganismos, comumente levam a uma modulação dos mecanismos de defesa na planta hospedeira (SOTO *et al.*, 2009).

Se essa informação for associada a presença da beta 1,3 glucanase (Q4JH28), pode se dizer que a presença dela no tratamento SNI da CD104, não seria a mesma como suposto anteriormente para SN dessa mesma cv. Pela presença da bactéria no meio de cultivo, ela pode estar envolvida numa possível resposta de defesa. Nesse tratamento (SNI da cv. CD104), temos

uma bactéria que já foi descrita como um PGPR, não sendo detectada endofiticamente em raízes desta variedade (NEIVERTH *et al.*, 2014) e produtora de AIA (PEDROSA, FÁBIO O. *et al.*, 2011), o que indica um efeito provável da bactéria sobre esta variedade. Entretanto, o alongamento não foi visualizado em folhas quando comparado ao CD104 CN ou CD104 SN (FIGURA 2). Porém, essa enzima (beta 1,3 glucanase) já foi mostrada ser produzida em resposta a padrões moleculares associados patógenos/microorganismos (*microbe/pathogen - associated molecular patterns or PAMPs/MAMPs*), identificados como as beta-1, 3 glucanases, e que os produtos de hidrólise desencadeiam defesas estruturais, como o reforçamento da parede celular, associadas a proteínas não bem caracterizadas em folhas de trigo, como a proteína semelhante a germina.

Em trigo susceptível a fungo a adição da enzima conferiu resistência, e em trigo tolerante a expressão e abundância da enzima aumentaram durante o desenvolvimento (SHETTY *et al.*, 2009). Cana-de-açúcar transgênica para a produção dessa enzima, se tornou resistente a podridão vermelha (NAYYAR *et al.*, 2017). Entretanto, bactéria *H. seropedicae* (tratamento SNI) não produz beta-1, 3 glucanase, mas pode-se sugerir que algum outro receptor de padrão de reconhecimento (*pattern recognition receptors - PRR*) tenha sido sensibilizado e, em resposta do reconhecimento de uma PAMP para gerar reações de defesa tenham sido ativadas no trigo CD104 na condição SNI.

Infecção de *H. rubrisubalbicans* em sorgo, é dependente de genes de síntese de celulose, em especial uma beta-1, 4 glucanase, que compõem a formação e estabilidade do biofilme durante sua infecção patogênica (TULESKI *et al.*, 2019). Porém não foi descrito genes de síntese de celulose em *H. seropedicae* (PEDROSA, FÁBIO O. *et al.*, 2011) mas ainda assim, em arroz inoculado com a bactéria (aparentemente uma associação não patogênica) houve indução de expressão de uma β -D-xilosidase e repressão de poli-galacturonase (ambas beta-1, 4-glicosidases) sugerindo um remodelamento da parede celular vegetal. Neste modelo, a maioria dos genes reprimidos foram relativos à defesa, resistência a doença de plantas e outras enzimas envolvidas em síntese de flavonóides e isoprenoides (BRUSAMARELLO-SANTOS *et al.*, 2019).

Quanto a proteína identificada exclusivamente em SNI de CD120 (TABELA 8), esta foi caracterizada pelo banco de dados do trigo como proteína contendo domínio PsbP (A0A3B6JED8), localizada no complexo de evolução de oxigênio (OEC) do PSII. A proteína PsbP (20,2 kDa) é um componente extrínseco do fotossistema II que, juntamente com PsbO (26,5 kDa) e PsbQ (16,5 kDa), formam a parte luminal do tilacóide do OEC e são chamadas de Proteínas intensificadoras de evolução de oxigênio (OEEP). Essas proteínas OEEP,

desempenham um papel importante na atividade do OEC, realizada no complexo central PSII. Esse complexo central do PSII é composto pelas proteínas D1 e D2, as duas antenas principais CP43 e CP47 e as subunidades α e β do citocromo b559. É assim chamado, complexo central, porque a atividade de evolução do oxigênio não é possível sem qualquer uma dessas subunidades. No entanto, as OEEP também são necessárias para taxas máximas de evolução de O_2 , mas não cruciais, porque sua ausência afeta apenas modestamente a função do PSII e, portanto, não são classificadas como proteínas do complexo central. O papel dessas proteínas extrínsecas está provavelmente relacionado à modulação de cofatores inorgânicos (mangânês, cálcio e cloreto), que são requisitos para a atividade central máxima (HALL *et al.*, 2012; IFUKU, 2014; SOUZA, PEDRO F. N.; GARCIA-RUIZ; CARVALHO, 2019).

Na interseção geral (CN&SN&SNI) de ambas as cv.s, as demais proteínas intensificadoras do oxigênio são encontradas após anotação pelo String v.11.0, como apresentado anteriormente (TABELA SUPLEMENTAR 4 e 8). Além da proteína PsbP, existem outras proteínas homólogas que compõe a família PsbP acumuladas no lúmen do tilacóide.

Em *Arabidopsis*, pelo menos nove membros das proteínas dessa família, a PsbP mais oito homólogos de PsbP. Com base na similaridade da sequência de aminoácidos com PsbP, os homólogos de PsbP são classificados em duas proteínas semelhantes a PsbP (identificadas como PPL) e seis proteínas de domínio PsbP (PPD). Essas proteínas tem sido estudadas e algumas funções foram propostas. A PPL1 estaria relacionada a reparação do PSII, a PPL2 uma NAD(P)H desidrogenase, PPD1 proteína de montagem do PSI, PPD2 relacionada a sinalização de oxigênio singlete em *Chlamydomonas* e PPD5 na biossíntese de estrigolactona (HALL *et al.*, 2012; IFUKU, 2014).

A proteína encontrada em SNI de CD120, referida como Proteína contendo domínio PsbP (A0A3B6JED8), provavelmente seja uma dessas proteínas PPD homólogas a PsbP, no entanto se desconhece a função. Em nosso experimento, foi atribuída a fotossíntese com função molecular de ligação de íons cálcio (GO 0005509).

Em um estudo analisando estresse ocasionado por seca e calor em soja, foi observado que proteínas cruciais que regulam a atividade de transporte de elétrons como a subunidade alfa da ATP sintase, subunidade beta de ATP sintase, fator de estabilidade/ montagem do PSII HCF136, proteína intensificadora de evolução de oxigênio 2-1 e ferredoxina-NADP redutase, foram reguladas negativamente. Isso sugere que o estresse térmico afeta negativamente a atividade de transporte de elétrons, incluindo a regulação negativa do PSII, reduzindo o nível de fotossíntese em soja (DAS *et al.*, 2016). Ao correlacionar o fato de proteínas do grupo OEEP terem sido reguladas negativamente perante um efeito de estresse, com a presença da proteína

identificada na cv CD120 (SNI), pertencente à família das PsbP, que possivelmente também pertença a esse grupo, poderíamos sugerir que a presença da bactéria teria atenuado um possível efeito de estresse causado pela ausência de N, o que corrobora com os demais dados.

Ainda em relação a família das PsbP, foi observada a presença de uma outra proteína também pertencente a essa família, a Proteína 1 semelhante a PsbP cloroplástica (A0A3B6JED8), que por anotação foi identificada como PPL1, no tratamento SN da cultivar CD104. Essa proteína, como citada acima, foi proposta como sendo de reparação de PSII (IFUKU, 2014), e ao que tudo indica, pela sua presença, as plantas desse tratamento estariam sofrendo danos no PSII, reflexo desse, do estresse causado pela ausência de N no meio de cultura, corroborando com os dados da fluorescência de clorofila. Essa proteína (A0A3B6JED8) não observada na CD120 em nenhum tratamento.

5.2 *Discussão sobre massa fresca e seca*

Relacionado ao crescimento das plantas (CD104 e CD120), que receberam inoculação de *H. seropedicae* (SNI), verificou-se que não houve diferença no comprimento da parte aérea, nem na massa fresca (m.f.) e seca (m.s.) em relação ao tratamento SN, no entanto, ambas (SN e SNI) foram inferiores ao CN (FIGURA 2).

Esses dados corroboram em parte com experimentos anteriores (NEIVERTH *et al.*, 2014), que não apresentaram diferença significativa, entre controle e inoculado, para massa fresca (m.f.) (CD104 e CD120). Para massa seca (m.s.), plantas da cv.. CD104 inoculadas (SNI) apresentaram valor superior ao inoculado (SNI) da cv.. CD120. E este apresentou m.s. do inoculado igual ao do SN da cv.. CD120, que é igual a m.s. em SN da cv.. CD104. Os dados de m.s. e m.f. da parte aérea, concordam em parte com dados observados anteriormente. (NEIVERTH *et al.*, 2014), o que é devido a alteração feita na metodologia de obtenção das plantas e do co-cultivo, além da alteração no meio de cultura, onde houve a retirada de N do meio que recebeu a inoculação.

Da mesma forma, não corroboraram com observado em folhas de trigo na presença de *Azospirillum brasilense* em *beads* de alginato que apresentaram aumento significativo de m.s. usando meio Hoagland (BASHAN *et al.*, 2006). E ainda incrementos na m.f. e m.s. apenas em algumas associações testadas em solo em casa de vegetação foram observadas, pois foram dependentes do genótipo de trigo, da estirpe bacteriana e da condição de cultivo em que a planta se encontrava durante o co-cultivo (AKBARI *et al.*, 2020).

Em 2 genótipos de trigo inoculados com bactérias isoladas não foram evidenciadas diferenças significativas na massa comparada a testemunha (ambos com meio de cultivo sem N), (SALA *et al.*, 2005). Semelhante ao nosso trabalho, pois em ambas as cultivares, os tratamentos SNI e SN não foram distintos entre si para m.f. e m.s. O que mostra que é importante comparar os experimentos. A inoculação de bactérias diazotróficas associativas tem-se mostrado eficiente pelo potencial para aumentar o rendimento, promover o crescimento de plantas e pela a FBN (BATRA *et al.*, 2018). Mas deve ser observada a dependência dos genótipos e o efeito do meio/solo (AKBARI *et al.*, 2020; NEIVERTH *et al.*, 2014; SALA *et al.*, 2005; SCHLEMPER *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2016).

Em nosso experimento, mesmo sem diferenças significativas entre as m.f. e m.s., a diferença percentual (biomassa) entre a m.f. e m.s. se mostra maior nas plantas dos tratamentos SN e SNI comparado com CN de ambas cultivares, entretanto, dados estatísticos devem ser obtidos. Aparentemente esses cálculos estão concordando com experimento anterior (NEIVERTH *et al.*, 2014). Em sorgo foram observados incrementos de biomassa dependendo da cultivar e do inoculo bacteriano (SCHLEMPER *et al.*, 2018).

5.3 Índice de nitrogênio (NBI) e clorofila (CHL)

Os valores de índice de nitrogênio (NBI) e clorofila (CHL) (Fig. 3A e B) foram maiores para o tratamento CN de ambas cultivares. A cultivar CD104 apresentou maior NBI e de CHL do que CD120 em ambos os tratamentos com N (CN) e sem N (SN), demonstrando ser uma característica da cultivar, que apresenta maior porcentagem média de plântulas normais obtidas pelo teste de germinação das sementes (SMANHOTTO *et al.*, 2006), além de ser uma das cv.s de maior rendimento (COAN *et al.*, 2013) especialmente se comparada com a CD120 (COODETEC, 2010; MARCHIORO *et al.*, 2011). No entanto, os valores de NBI e CHL da cv.. CD120, no tratamento SNI, foram significativamente superiores aos do tratamento SN (64% e 66%, respectivamente) e iguais aos da cv.. CD104 no tratamento SNI (Fig. 3A e B). Mesmo que tenham sido observadas menores massas e comprimento da parte aérea para o tratamento SNI para CD120, esse aumento significativo nos dados de NBI e CHL, apontam para interação entre a *H. seropedicae* e a cv CD120.

Como N é fundamental para o desenvolvimento da planta, síntese e manutenção de componentes do aparato fotossintético e é o principal componente da molécula de clorofila (BATRA *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2016), o aumento visto de clorofila (SNI CD120) estaria

associado ao aumento de NBI; e como o meio de cultivo não continha fonte de N, este resultado estaria apontando para ocorrência de FBN, o que foi apontado Neiverth e colabores (2014).

Foi observado aumento de clorofila nas folhas da cultivar de trigo testada quando inoculada com *A. brasilense* (BASHAN *et al.*, 2006) assim como, em uma cultivar testada perante a inoculação de vários isolados bacterianos, em que foi observado que a quantidade acumulada de N na parte aérea do trigo foi maior na presença em um dos isolados testados comparado ao controle, confirmando a dependência da inoculação pelo genótipo da planta (SALA *et al.*, 2005). Concordando com nossos experimentos, em que essa resposta só foi vista numa das cultivares ensaiadas, a CD120.

Em outro estudo, também foi observado esse efeito, onde cepas de *Streptomyces* sp. que promovem o crescimento de plantas, estavam interagindo seletivamente com os cultivares de trigo, especialmente em condições de estresse salino, obtendo, além de outras respostas fisiológicas, o incremento de clorofila (AKBARI *et al.*, 2020). Nesse contexto, nota-se uma característica diferenciada entre as cv.s testadas, CD104 e CD120, não somente para a deficiência de N, mas também para a inoculação.

5.4 Análise de fluorescência

Para os resultados referentes às análises da fluorescência realizadas na ausência de luz (TABELA 2), notou-se que as plantas de ambas cultivares submetidas ao tratamento sem N inoculado com a bactéria *H. seropedicae* SmR1 (SNI), obtiveram valores de fluorescência inicial (F_o) iguais ao tratamento sem N (SN) e inferiores ao tratamento CN. Porém, houve uma diminuição da fluorescência máxima (F_m) para a cv.. CD104 no tratamento SNI comparado ao tratamento com N (CN), e não houve diferença significativa entre tratamentos do CD120 para essa variável. Conforme estudos, incrementos nos valores de F_o associados com reduções nos valores de F_m podem ser interpretados como uma indicação do dano no PSII (MELO; SOUZA; CUNHA, 2017) o que não corresponde com nossos resultados, indicando que nesse caso, não haveria indícios de dano ocorrido ao PSII em nenhum tratamento.

Em relação a máxima eficiência quântica do PSII (F_v/F_m) e a fluorescência mínima variável (F_v/F_o), notou-se que não houve redução nem em F_v/F_m e nem em F_v/F_o em nenhuma cv. no tratamento SN comparado o tratamento CN. É conhecido que F_v/F_m é a eficiência máxima em que a luz absorvida pelo PSII é usada para redução de Quinona A (Q_A) e é usada como um indicador sensível do desempenho fotossintético da planta. Quando as plantas são expostas a estresses abióticos e bióticos, frequentemente são observadas diminuições em

Fv/Fm. (BAKER, 2008). Experimentos avaliando o efeito da deficiência de N no trigo, observaram essas diminuições de Fv/Fm em tratamento com baixo teor de N comparado ao de alto. A deficiência de N diminuiu também significativamente Fv/Fo das folhas (SHANGGUAN; SHAO; DYCKMANS, 2000).

Apesar da ausência de N no meio SN, em nossos experimentos, houve aumento significativo na Fv/Fm e na Fv/Fo nos tratamentos SNI e SN para a cv.. CD120 em relação ao tratamento CN (TABELA 2). Quanto a cv.. CD104, também houve aumento significativo de Fv/Fm e Fv/Fo do tratamento SNI, mas comparado ao tratamento SN, porém igual ao tratamento CN.

Esse aumento de Fv/Fm e Fv/Fo nos tratamentos SNI e SN da cv.. CD120 aparentemente está relacionado a ausência de N no meio, onde a cultivar consegue superar a condição de estresse no tempo de cultivo de 21 dias (a partir da data de transferência para o tubo). Já o fato de Fv/Fo e Fv/Fm do tratamento SN de CD104 ser significativamente inferior ao do SNI, pode indicar que a eficiência do processo fotossintético de SN tenha sofrido algum efeito em decorrência a ausência de N no meio de cultura, o que não foi sentido em SNI. Apesar de não ter aumentado NBI e CHL nos tratamentos SN e SNI (CD104) e sim, terem sido menor que os de CN (FIGURA 4), esse resultado aparentemente indica atuação da bactéria *H. seropedicae* em minimizar os efeitos. É conhecido que redução do rendimento do fotossistema II está associado à degradação de clorofila (MELO; SOUZA; CUNHA, 2017) o que condiz com os resultados no tratamento SN do CD104. No entanto, o tratamento SNI, que também apresentou índices baixos NBI e CHL, iguais a SN, não teve Fv/Fo e Fv/Fm afetados, sugerindo, nesse caso, que a presença da bactéria pode ter inicialmente reduzido um possível efeito de estresse causado pela ausência de N nessa cultivar. Foi associado que o incremento de Fv/Fo, assim como de Fv/Fm, foi promovido pelas PGPR, como um efeito da cascata de reações induzidas pelas mesmas, porém, relacionado a chamada 'tolerância sistêmica induzida' (SAMANIEGO-GÁMEZ *et al.*, 2016).

O termo 'tolerância sistêmica induzida' (*Induced Systemic Tolerance* - IST) foi proposto para alterações físicas e químicas induzidas por PGPR em plantas que resultam em maior tolerância ao estresse abiótico. O estresse biótico é excluído do IST porque conceitualmente é parte do controle biológico e da resistência induzida. E algumas cepas de PGPR, produzem citocinina e antioxidantes como a CAT, que resultam no acúmulo de ácido abscísico e degradação de ROS, respectivamente (YANG, JUNGWOOK; KLOEPPER; RYU, 2009). A degradação do precursor de etileno ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) pela ACC desaminase bacteriana diminui o estresse da planta favorecendo o crescimento normal da

planta sob condições de estresse por seca e estresse salino. Compostos voláteis emitidos por PGPR regulam negativamente a expressão de *hkt1* (transportador 1 de K^+ de alta afinidade) nas raízes, mas regulam positivamente nos tecidos da parte aérea, orquestrando níveis mais baixos de Na^+ e recirculação de Na^+ em toda a planta sob condições de sal elevado. A produção de ácido indol acético (AIA) por PGPR pode aumentar o comprimento da raiz, a área da superfície da raiz e o número de pelos das raízes, levando a uma maior absorção de nitrato e fósforo (YANG, JUNGWOOK; KLOPPER; RYU, 2009). Assim, os incrementos de Fv/Fm e Fv/Fo vistos em nosso experimento (SNI CD104), podem ser reflexo de reações oriundas de uma interação benéfica entre o trigo, cv.. CD104, e a bactéria *H. seropedicae*.

Outra informação importante é que Fv/Fm é constante para diferentes espécies quando medido em condições sem estresse e quando o aparato fotossintético da planta está intacto, na faixa de $0,75 \leq Fv / Fm \leq 0,86$ (BJÖRKMAN; DEMMIG, 1987). Então, com base nessas informações e ao correlacionar com nossos resultados (valores entre 0,76 e 0,79) (TABELA 2), sugere-se que em nenhum dos tratamentos houve dano no PSII, mesmo que na ausência de N e/ou na presença da bactéria.

Quanto aos resultados das análises da fluorescência realizadas na presença de luz verificou-se que não houve alteração no rendimento quântico efetivo do PSII (Y(II)) e nem na taxa de transporte de elétrons (ETR) para cv.. CD104. No entanto, para a cv.. CD120, observou-se um aumento significativo do Y(II) para os tratamentos SN e SNI quando comparados ao CN, sem gerar alterações na taxa de transporte de elétrons.

Sabendo-se que a taxa de transporte de elétrons do PSII é inibida por estresse (HORTON *et al.*, 2008; LI; ZHANG; SHAN, 2007), e que seu aumento sugere que o receptor da quinona (Q_A) está altamente oxidado e sua energia de excitação está sendo utilizada no transporte de elétrons, evitando o foto-dano (MELIS, 1999). Entende-se que não há indícios de estresse ocasionados pela deficiência de N, em nenhuma das cv.s avaliadas em nosso experimento. Assim como visto em estudo realizado com arroz, onde durante a deficiência de N (20 dias), a eficiência de captura de excitação pelos centros PSII abertos e a energia usada para capacidade fotoquímica diminuíram gradativamente nas folhas das plantas sob estresse de N, o que levou ao acúmulo de excitação em excesso e, provavelmente, à superprodução subsequente de ROS (HUANG, Z. A. *et al.*, 2004).

No entanto, também não há indícios de promoção na capacidade fotossintética gerada pela inoculação, como os observados em estudo avaliando o efeito da inoculação de *Bacillus* spp. em pimenta. Nesse estudo verificaram aumento em ETR e em Y(II), indicando que as cepas avaliadas promoveram aumento na capacidade fotossintética (SAMANIEGO-GÁMEZ *et al.*,

2016). O aumento de Y(II) na cv. CD120 nos tratamentos SN e SNI, associados aos observados na ausência de luz, suportaria a ideia de uma resposta intrínseca do genótipo ao estresse gerado pela ausência de N.

Para analisar as respostas dos dados calculados para a extinção fotoquímica e não-fotoquímicas, é necessário entender que em altos níveis de excitação, nem toda a energia dos estados excitados do complexo antena, pode ser usada para a fotossíntese. O excesso de energia leva a mudanças destrutivas na cadeia de transferência de elétrons. Para evitar esse fenômeno, os organismos fotossintéticos desenvolveram mecanismos para dissipar a energia excessiva absorvida (PASCHENKO *et al.*, 2016).

O processo mais estudado, NPQ, opera no sistema de coleta de luz do PSII. Ocorre pela criação de *extintores* (que fazem a dissipação da energia) de energia após a mudança conformacional nos complexos de captação de luz, que é iniciada pelo aumento do gradiente de pH do tilacóide e controlada pelo ciclo da xantofila, ou seja, um alto nível de iluminação diminui o pH do lúmen do tilacóide e inicia o processo de desepoxidação da violaxantina em zeaxantina. E isso é facilitado pela proteína PsbS atuando como sensor de pH (HORTON *et al.*, 2008; KOTABOVÁ *et al.*, 2011; PASCHENKO *et al.*, 2016).

A extinção não-fotoquímica Y(NPQ), corresponde à fração de energia dissipada na forma de calor (dissipação de energia por radicais catiônicos do centro de reação do PSII) regulado por meio do mecanismo foto-protetor NPQ (KLUGHAMMER; SCHREIBER, 2008; PASCHENKO *et al.*, 2016). Já, a extinção fotoquímica Y(NO) “descreve as vias de reações combinadas para a desexcitação radiativa e não radiativa”, que não levam à conversão de energia fotoquímica e não envolvem o mecanismo NPQ, ou seja, corresponde à “soma da fração de energia que é dissipada passivamente na forma de calor não regulada e da emissão de fluorescência, principalmente devido aos centros de reação PSII estarem fechados.” E, Y (II) “corresponde à fração de energia que é fotoquimicamente convertida no PSII” (KLUGHAMMER; SCHREIBER, 2008).

De acordo com Klughammer e Schreiber (2008), valores de Y (NO) refletem a incapacidade de uma planta de se fotoproteger contra danos, no entanto valores de Y(NPQ) e NPQ indicam alta capacidade fotoprotetora. Esse balanço, nos permite avaliar a capacidade da planta de lidar com o excesso de energia de excitação.

Ao analisar os resultados obtidos, é possível observar aumento significativo de NPQ nos tratamentos SN e SNI comparando com o tratamento CN para a cv. CD104. Enquanto Y(NPQ) no tratamento SN é maior do que no tratamento CN e ambos são iguais ao tratamento SNI para a cv. CD104. Já na cv. CD120 é possível observar aumento de NPQ no tratamento SN

comparado ao tratamento CN, enquanto o tratamento SNI é igual aos tratamentos CN e SN. E, diminuição de Y(NPQ) em SNI quando comparados aos tratamentos CN e SN. Em relação a Y(NO), observou-se uma queda significativa nos valores de SN (CD104) e SNI (CD120) em relação a CN. Sendo assim, pode-se dizer esse aumento de NPQ e Y(NPQ), associado a diminuição ou não alteração em Y(NO), indicariam uma capacidade fotoprotetora das plantas em geral. Principalmente quando associados ao fato de que ETR não sofreu alterações em nenhum tratamento, pois o mecanismo fotoprotetor de NPQ é influenciado pelo gradiente de pH do tilacóide e o transporte de elétrons no complexo citocromo b é inibido se pH do lúmen baixar de 5,0 (HORTON *et al.*, 2008), efeito este não visto em nossos experimentos (TABELA 2).

Outro dado interessante que indicaria de forma abrangente, o destino da energia de excitação em PSII e bom funcionamento do mecanismos foto-protetor nas plantas, seria a soma dos parâmetros que sempre é igual a um (1) ($Y(II) + Y(NPQ) + Y(NO) = 1$) (KLUGHAMMER; SCHREIBER, 2008). Assim, ao analisar nossos resultados, verificou-se que independente do tratamento, o valor da soma sempre foi 1.

É possível verificar efeito benéfico da bactéria inoculada no tratamento SNI na cv. CD120 em que não houve incremento significativo de NPQ comparado ao tratamento CN e teve menor necessidade da resposta de fotoproteção por Y(NPQ). Além de menor dissipação de energia excedente não regulada por NPQ (Y(NO)) comparado ao tratamento SN e ao SNI da cv. CD104. Ou seja, não houve um efeito estressante excedente causado pela ausência de N ou pela presença da bactéria em CD120 SNI, a ponto de ativar o mecanismo de foto-proteção, pelo contrário, aparentemente foi reduzido qualquer efeito estressante na planta que fosse associado ao fotossistema. Principalmente se associarmos ao aumento observado de N e clorofila na folha e a ausência de proteínas relacionadas ao sistema antioxidante para esse tratamento (TABELA 2).

Apenas uma proteína foi identificada exclusivamente para esse tratamento (SNI cv. CD120) e está relacionada a fotossíntese e não ao mecanismo NPQ nem ao sistema antioxidante, por exemplo.

Em relação a quantificação de flavonoides de ambas as cultivares (FIGURA 5A), foi observado níveis de flavonoides significativamente iguais para os tratamentos SNI e SN e superiores ao tratamento CN. O teor de compostos fenólicos se acumula nas folhas de trigo em resposta a deficiência de N, ataque de patógenos e outros tipos de estresse (CARTELAT *et al.*, 2005; TREUTTER, 2006). Isso sugere que estão ocorrendo eventos relacionados ao estresse por deficiência de N nos tratamentos SN e SNI, mas a correlação desses dados com os dados

de crescimento vegetal, N e clorofila não está clara. Entretanto, existem flavonoides que podem ter função de sinalizadores que são estimuladores a colonização das raízes de trigo por bactérias diazotróficas (TREUTTER, 2006), tornando os dados obtidos inconclusivos para os tratamentos que receberam a inoculação, pois o teor de flavonoides no tratamento SNI para as cv.s CD104 e CD120 foram iguais ao SN, sendo que o tratamento SNI da cv. CD120 apresentou maior conteúdo de N.

Porém, se correlacionarmos aos dados observados para antocianinas (FIGURA 5B) (queda significativa no tratamento SNI para a cv. CD120 em relação ao tratamento CN), lembrando que as antocianinas, também são moléculas do sistema antioxidante e estão envolvidas nas respostas de defesa das plantas (LAN *et al.*, 2019; SHOEVA; KHLESTKINA, 2018) e estresse abiótico (BÜRLING *et al.*, 2013; WASTERNAK; STRNAD, 2019), notamos um forte indício de uma resposta de interação benéfica de CD120 com a *H. seropedicae*, corroborando com o efeito de estimuladores da colonização das raízes de trigo por bactérias diazotróficas (TREUTTER, 2006). Principalmente se associada a diminuição significativa em Y(NPQ) e Y(NO), a não identificação de proteínas exclusivas para SNI dessa cultivar associadas ao sistema redox, ao aumento do índice de nitrogênio e clorofila.

Pesquisadores verificaram que a inoculação de *Bacillus velezensis* 5113 em trigo, resultou em uma modulação metabólica significativa e afetou a abundância de várias proteínas nas folhas do trigo, ou seja, uma reprogramação metabólica. Indicaram que a bactéria utilizou estratégias regulatórias metabólicas e moleculares semelhantes para aumentar a tolerância do trigo exposto aos diferentes fatores de estresse abiótico testados (calor, frio e seca). O sucesso em melhorar a tolerância ao estresse abiótico parece estar relacionado, entre outros, à sua capacidade de ajuste da expressão de várias proteínas relacionadas à defesa contra o estresse, bem como ao fornecimento de energia. E, modular várias vias metabólicas de aminoácidos. Por outro lado, a capacidade de promover o crescimento das plantas pode estar relacionada ao aumento da fotossíntese (ABD EL-DAIM; BEJAI; MEIJER, 2019).

Frente a essas informações e dados obtidos e discutidos os resultados de CD120 para o tratamento SNI, sugerem a modulação, pela ausência de proteínas do metabolismo antioxidante (comparado ao SN), pelo aumento de Y(II) associado a redução de Y(NPQ) e Y(NO), pelo aumento de NBI e CHL e pela diminuição de antocianinas. Já para CD104 (tratamento SNI), de uma forma diferente, pelo aumento no número de proteínas identificadas relacionadas a fotossíntese, pela ausência das proteínas do metabolismo antioxidante que haviam sido identificadas em SN, pelo aumento de Fv/Fm e Fv/Fo em relação ao SN e pela manutenção de Y(NO).

6 CONCLUSÃO

É possível concluir que:

- Houve redução no crescimento vegetal e amarelamento das folhas nas plantas avaliadas frente a ausência de N no tratamento SN, para ambas cv.s (CD104 e CD120) ao final dos 21 dias de cultivo *in vitro*, demonstrando a importância do N no desenvolvimento do trigo mesmo nas fases iniciais.

- Não houve incremento na massa da parte aérea das plantas de trigo inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* ao final dos 20 dias de co-cultivo avaliado, tanto para CD104 como para CD120, indicando que o tempo avaliado pode não ter sido suficiente para visualizar efeitos da promoção de crescimento e da FBN na morfologia das plantas .

- Ao final dos 21 dias de cultivo *in vitro*, não houve danos morfológicos aparentes no crescimento das plantas de trigo, independente da cv., no tratamento controle CN, indicando que o ambiente *in vitro* não interferiu, no desenvolvimento das plantas.

- O ambiente *in vitro* foi capaz de garantir a inocuidade nos tratamentos avaliados (CN, SN) e garantir a presença apenas da bactéria inoculada no tratamento SNI, durante todo o período de avaliação.

- O não fornecimento de fonte de N no meio de cultivo influenciou diretamente o NBI e CHL das plantas (SN), para ambas cv.s, durante os 21 avaliados gerando diminuição significativa.

- A presença da bactéria *H. seropedicae* no meio de cultivo sem fonte de N, foi capaz de suprimir em parte, a necessidade de N nas plantas da cv CD120, durante os 20 dias avaliados, gerando aumento de NBI e consequentemente de CHL, comparados às plantas do tratamento SN.

- A ausência de N gerou aumento significativo de flavonoides nas plantas das duas cv.s independente da presença da bactéria durante o período de cultivo avaliado.

- A presença da bactéria no meio de cultivo foi capaz de reduzir significativamente as antocianinas no tratamento SNI de CD120 ao final dos 20 dias de co-cultivo.

- A presença da bactéria no meio de cultura (SNI) foi capaz de gerar aumento na eficiência do PSII nas plantas de CD104 durante o período de cultivo *in vitro*.

- As plantas de ambas cv.s apresentaram capacidade foto-protetora na presença da *H. seropedicae* comparado ao tratamento controle SN.

- As plantas da cv CD120 do tratamento SNI apresentaram menor efeito de estresse pela ausência de N indicados pela redução na extinção fotoquímica e não-fotoquímica.

- O ambiente *in vitro*, a ausência de N ou a presença da *H. seropedicae*, não foram capazes de afetar a taxa de transporte de elétrons das plantas de ambas cv.s, indicando a capacidade dos genótipos em garantir o funcionamento adequado do aparelho fotossintético durante o período de cultivo/co-cultivo avaliado, mesmo em condições adversas como na ausência de N.

- As cv.s apresentam perfil proteico diferente entre si, independente dos tratamentos avaliados, desde o número de proteínas, como nas proteínas identificadas.

- A ausência de N no meio de cultivo foi capaz de induzir respostas antioxidantes em ambas cv.s observadas pela presença de proteínas específicas do sistema antioxidante. No entanto, diferentes entre si, demonstrando que há diferenças genotípicas entre CD104 e CD120.

- A presença da bactéria indica estar induzir diferentes respostas para mitigação do estresse sem N, sendo que para a cv. CD104 há indícios de promoção de tolerância pela presença de proteína de defesa e a cv. CD120 apresenta indícios de obtenção de N a partir da FBN promovido pela bactéria, pela ausência de proteínas de defesa e associada ao incremento de NBI e CHL.

- Os resultados , tanto fisiológicos como proteômicos, indicam que a interação das cv.s com a bactéria *H. seropedicae* é genótipo dependente.

-A anotação de proteínas não caracterizadas a partir da plataforma String v.11.0, auxiliou na identificação de proteínas não caracterizadas, além de confirmar dados de proteínas já caracterizadas ou parcialmente caracterizadas. Demonstrando a grande importância desse tipo de estudo, pois auxiliou na discussão fisiológica das proteínas encontradas nos sistemas impostos pelos tratamentos nas cv.s CD104 e CD120, e pode contribuir na anotação do genoma do trigo em geral.

- É necessário a continuidade dos estudos proteômicos, fisiológicos e agronômicos relacionados a interação entre a *H. seropedicae* e o trigo, avaliando o efeito da interação nos demais estágios de desenvolvimento, não apenas *in vitro*, mas também em casa de vegetação e a campo. Buscando informações sobre a melhor forma de inoculação e fase de desenvolvimento, respostas da presença da bactéria na produtividade associada ou não a suplementação nitrogenada, para garantir posteriormente, seu uso eficiente na produção agrícola nacional.

7 REFERÊNCIAS

- ABD EL-DAIM, Islam A.; BEJAI, Sarosh; MEIJER, Johan. *Bacillus velezensis* 5113 induced metabolic and molecular reprogramming during abiotic stress tolerance in wheat. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 16282, 8 dez. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52567-x>>.
- ABITRIGO. *Estatística*. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/categoria-estatisticas/farinha-de-trigo/>>.
- AFRIDI, Muhammad Siddique *et al.* Induction of tolerance to salinity in wheat genotypes by plant growth promoting endophytes: Involvement of ACC deaminase and antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 139, n. March, p. 569–577, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.041>>.
- AHMAD, Maqshoof *et al.* Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. DEC, 5 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02992/full>>.
- AKBARI, Alireza *et al.* Plant growth promoting *Streptomyces* strains are selectively interacting with the wheat cultivars especially in saline conditions. *Heliyon*, v. 6, n. 2, p. e03445, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844020302905>>.
- ALBERTON, Dayane *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. 4757–4768, 18 nov. 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr400425f>>.
- ANTONELLA DI BENEDETTO, Nilde *et al.* The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *AIMS Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 413–434, jun. 2017. Disponível em: <<http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2017.3.413>>.
- ASHBURNER, Michael *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, v. 25, n. 1, p. 25–29, maio 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ng0500_25>.
- AWAN, Samrah Afzal *et al.* *Bacillus siamensis* reduces cadmium accumulation and improves growth and antioxidant defense system in two wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Plants*, v. 9, n. 7, p. 878, 11 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/9/7/878>>.
- BAKER, Neil R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, n. 1, p. 89–113, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>>.

- BALDANI, J. I. *et al.* Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 46, n. 3, p. 802–810, 1 jul. 1996. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-46-3-802>>.
- BALDANI, José I.; BALDANI, Vera L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 3, p. 549–579, set. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652005000300014&lng=en&tlng=en>.
- BALDANI, JoséI. *et al.* Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, maio 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071796002180>>.
- BARBOZA, Rodrigo *et al.* Can the false-discovery rate be misleading? *Proteomics*, v. 11, n. 20, p. 4105–4108, out. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201100297>>.
- BARNAWAL, Deepti *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1 / TaDREB2 expression. *Physiologia Plantarum*, v. 161, n. 4, p. 502–514, dez. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ppl.12614>>.
- BASHAN, Y. *et al.* Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils*, v. 42, n. 4, p. 279–285, 12 mar. 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00374-005-0025-x>>.
- BATRA, Priyanka *et al.* Endophytes: An environmental friendly bacteria for plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 7, n. 2, p. 1899–1911, 2018.
- BEELER, Seraina *et al.* Plastidial NAD-Dependent malate dehydrogenase is critical for embryo development and heterotrophic metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 164, n. 3, p. 1175–1190, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.113.233866>>.
- BERNARD, Stéphanie M.; HABASH, Dimah Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytologist*, v. 182, n. 3, p. 608–620, 16 maio 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-8137.2009.02823.x>>.

- BERTINI, Laura *et al.* Proteomic analysis of MeJa-induced defense responses in rice against wounding. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 10, p. 2525, 22 maio 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/10/2525>>.
- BETTI, Marco *et al.* Manipulating photorespiration to increase plant productivity: recent advances and perspectives for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, v. 67, n. 10, p. 2977–2988, maio 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erw076>>.
- BJÖRKMAN, Olle; DEMMIG, Barbara. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, v. 170, n. 4, p. 489–504, abr. 1987. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00402983>>.
- BLOCH, Sarah E. *et al.* Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 62, p. 181–188, abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.024>>.
- BRAMMER, Sandra Patussi *et al.* A potencialidade de *Agropyron*, espécie afim ao trigo cultivado, como fonte de introgressão de genes agronomicamente importantes. p. 8, 2001. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do08.htm>.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, Liziane Cristina Campos *et al.* Modulation of defence and iron homeostasis genes in rice roots by the diazotrophic endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 10573, 22 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-45866-w>>.
- BÜRLING, Kathrin *et al.* Fluorescence-based sensing of drought-induced stress in the vegetative phase of four contrasting wheat genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, v. 89, p. 51–59, maio 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098847213000166>>.
- CAMILIOS-NETO, Doumit *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, n. 1, p. 378, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/378>>
<<http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-378>>
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4042000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- CANDIANO, Giovanni *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v. 25, n. 9, p. 1327–1333, maio 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200305844>>.

- CANELLAS, Luciano Pasqualoto *et al.* A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, v. 366, n. 1–2, p. 119–132, 23 maio 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-012-1382-5>>.
- CARBON, S. *et al.* The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D330–D338, 8 jan. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D330/5160994>>.
- CARRIL, Pablo *et al.* An optimized in situ quantification method of leaf H₂O₂ unveils interaction dynamics of pathogenic and beneficial bacteria in wheat. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, n. June, p. 1–10, 23 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00889/full>>.
- CARTELAT, A. *et al.* Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, v. 91, n. 1, p. 35–49, 14 jan. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037842900400139X>>. Acesso em: 11 dez. 2019.
- CARVALHO, Paulo C *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nature Protocols*, v. 11, n. 1, p. 102–117, 10 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2015.133>>.
- CARVALHO, Paulo C *et al.* Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. *Proteomics*, v. 12, n. 7, p. 944–949, abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201100529>>.
- CARVALHO, T. L. G. *et al.* Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, n. 19, p. 5631–5642, 1 out. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/eru319>>.
- CHANG, Tao-Shan *et al.* Mapping and comparative proteomic analysis of the starch biosynthetic pathway in rice by 2D PAGE/MS. *Plant Molecular Biology*, v. 95, n. 4–5, p. 333–343, 8 nov. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11103-017-0652-2>>.
- CHEN, Shiming *et al.* Chapter 2 - Electrochemical Dinitrogen Activation: To Find a Sustainable Way to Produce Ammonia. In: ALBONETTI, STEFANIA; PERATHONER, SIGLINDA; QUADRELLI, ELSJE ALESSANDRA B T - STUDIES IN SURFACE SCIENCE AND CATALYSIS (Org.). *Horizons in Sustainable Industrial Chemistry and Catalysis*. [S.l.]: Elsevier, 2019. v. 178. p. 31–46. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64127-4.00002-1>>.

- CHEN, Yu *et al.* Examination of the leaf proteome during flooding stress and the induction of programmed cell death in maize. *Proteome Science*, v. 12, n. 1, p. 33, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4099015&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- CHENG, Zhenyu; MCCONKEY, Brendan J.; GLICK, Bernard R. Proteomic studies of plant–bacterial interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 10, p. 1673–1684, out. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.033>>.
- COAN, Marlon Mathias Dacal *et al.* Genótipos de trigo e fontes de nitrogênio mineral e biológica no plantio direto. *Revista de Ciências Agrárias - Amazon Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 56, n. 4, p. 292–298, 2013. Disponível em: <<http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rca.2013.044>>.
- CONSORTIUM, The UniProt. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 8 jan. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D506/5160987>>.
- COODETEC. *Guia de produtos trigo*. Cascavel, PR: Cooperativa de Pesquisa Agrícola do Paraná-Ltda, 2010.
- CRIADO, M. Victoria *et al.* Plant growth regulators and induction of leaf senescence in nitrogen-deprived wheat plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 26, n. 4, p. 301–307, 30 nov. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00344-007-9016-5>>.
- CRUZ, Cosme Damião. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 35, n. 3, p. 271–276, 11 jul. 2013. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/21251>>.
- CUI, Jing *et al.* What is the role of putrescine accumulated under potassium deficiency? *Plant, Cell & Environment*, v. 43, n. 6, p. 1331–1347, 19 jun. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pce.13740>>.
- CURÁ, José Alfredo *et al.* Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. *Microorganisms*, v. 5, n. 3, p. 41, 26 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-2607/5/3/41>>.
- CURTIS, B. C. ; RAJARAM, S. ; GÓMEZ MACPHERSON, H. *Bread wheat: improvement and production*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2002.
- DA FONSECA BREDÁ, Farley Alexandre *et al.* Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Archives of Microbiology*, v. 201, n. 4, p. 547–558, 17 maio 2019. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s00203-018-1594-z>>.

DALL'ASTA, Pâmela *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* promotes maize growth but fails to control the maize leaf anthracnose. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 25, n. 1, p. 167–176, 27 jan. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12298-018-0616-2>>.

DAS, Aayudh *et al.* Leaf proteome analysis reveals prospective drought and heat stress response mechanisms in soybean. *BioMed Research International*, v. 2016, p. 1–23, 2016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/6021047/>>.

DE CARVALHO, Thais Louise Gurjão; FERREIRA, Paulo Cavalcanti Gomes; HEMERLY, Adriana S. Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. *Tropical Plant Biology*, v. 4, n. 1, p. 31–41, 8 mar. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12042-011-9069-2>>.

DEFEZ, Roberto; ANDREOZZI, Anna; BIANCO, Carmen. The Overproduction of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Endophytes Upregulates Nitrogen Fixation in Both Bacterial Cultures and Inoculated Rice Plants. *Microbial Ecology*, v. 74, n. 2, p. 441–452, 14 ago. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00248-017-0948-4>>.

DHAWI, Faten; DATTA, Rupali; RAMAKRISHNA, Wusirika. Proteomics provides insights into biological pathways altered by plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhiza in sorghum grown in marginal soil. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1865, n. 2, p. 243–251, fev. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.11.015>>.

DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment*, v. 27, n. 7, p. 896–906, jul. 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2004.01195.x>>.

DIVAN BALDANI, V.L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*, v. 30, n. 5–6, p. 485–491, 3 mar. 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s003740050027>>.

DRIEVER, Steven M. *et al.* Increased SBPase activity improves photosynthesis and grain yield in wheat grown in greenhouse conditions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 372, n. 1730, p. 20160384, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28808101>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5566882%0Ahttp://rstb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1

098/rstb.2016.0384>.

DUBROVSKY, J.G.; PUENTE, M.Esther; BASHAN, Y. *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp-245 on root hair growth. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 26, n. 12, p. 1657–1664, dez. 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0038071794903182>>.

EGLI, Barbara *et al.* Loss of Cytosolic Phosphoglucumutase Compromises Gametophyte Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 154, n. 4, p. 1659–1671, dez. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1104/pp.110.165027>>.

ENOKI, Shinichi *et al.* High Constitutive Overexpression of Glycosyl Hydrolase Family 17 Delays Floral Transition by Enhancing FLC Expression in Transgenic *Arabidopsis*. *Plants*, v. 6, n. 4, p. 31, 25 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2223-7747/6/3/31>>.

FALEIRO, Alexandro César *et al.* Microscopic and proteomic analysis of *Zea mays* roots (P30F53 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, v. 18, n. 2, p. 63–71, 2015.

FALQUETO, Antelmo Ralph *et al.* Características da Fluorescência da Clorofila em Cultivares de Arroz Com Ciclo Precoce , Médio e Tardio. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, n. 2, p. 579–581, 2007.

FAOSTAT. *Compare Data*. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#compare>>.

FERNANDES, Maria Irene Baggio de Moraes *et al.* Cytogenetics and immature embryo culture at Embrapa Trigo breeding program: transfer of disease resistance from related species by artificial resynthesis of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). *Genetics and Molecular Biology*, v. 23, n. 4, p. 1051–1062, dez. 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572000000400051&lng=en&tlng=en>.

FERRARI, Cibele Santos *et al.* Expressed Proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in Maize (DKB240) Roots-Bacteria Interaction Revealed Using Proteomics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 174, n. 6, p. 2267–2277, nov. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-014-1197-3>>.

FLORYSZAK-WIECZOREK, Jolanta; ARASIMOWICZ-JELONEK, Magdalena. The multifunctional face of plant carbonic anhydrase. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 112, p. 362–368, mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.007>>.

FOYER, Christine H.; NOCTOR, Graham. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, v. 155, n. 1, p. 2–18, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.110.167569>>.

- FRITZ, Heather M. *et al.* Proteomic Analysis of Fractionated Toxoplasma Oocysts Reveals Clues to Their Environmental Resistance. *PLoS One*, v. 7, n. 1, p. e29955, 18 jan. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0029955>>.
- FURLAN, Fernando *et al.* Plant growth-promoting bacteria effect in withstanding drought in wheat cultivars. *Scientia agraria*, v. 18, n. 2, p. 104–113, 2017.
- GAO, L. *et al.* Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry*, v. 72, n. 10, p. 1180–1191, jul. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942210004723>>.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, Francisco *et al.* Multiple stresses occurring with boron toxicity and deficiency in plants. *Journal of Hazardous Materials*, v. 397, n. December 2019, p. 122713, out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122713>>.
- GHATAK, Arindam; CHATURVEDI, Palak; WECKWERTH, Wolfram. Cereal crop proteomics: systemic analysis of crop drought stress responses towards marker-assisted selection breeding. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. June, 2 jun. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00757/full>>.
- GOUDA, Sushanto *et al.* Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, v. 206, n. April 2017, p. 131–140, jan. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>>.
- GREGOROVÁ, Zuzana *et al.* Drought-induced responses of physiology, metabolites, and pr proteins in *Triticum aestivum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 37, p. 8125–8133, 23 set. 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.5b02951>>.
- GULLNER, Gábor *et al.* Glutathione S-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, v. 871, n. December, p. 1–19, 2018.
- GUO, Bin-Bin *et al.* Root and nitrate-N distribution and optimization of N input in winter wheat. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 18018, 29 dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54641-w>>.
- GURURANI, Mayank Anand; VENKATESH, Jelli; TRAN, Lam Son Phan. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Molecular Plant*, v. 8, n. 9, p. 1304–1320, set. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>>.
- HABBIB, Hazzar *et al.* In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), no-till improves photosynthetic nitrogen and water-use efficiency. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, v. 23, n. 1, p. 39–46, 2020.
- HALL, Michael *et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of PPD6, a PsbP-domain protein from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica Section F Structural*

Biology and Crystallization Communications, v. 68, n. 3, p. 278–280, 1 mar. 2012. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1744309111042023>>.

HAWKESFORD, Malcolm J.; GRIFFITHS, Simon. Exploiting genetic variation in nitrogen use efficiency for cereal crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 49, p. 35–42, jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526618301158>>.

HAWKESFORD, Malcolm J. Genetic variation in traits for nitrogen use efficiency in wheat. *Journal of Experimental Botany*, v. 68, n. 10, p. 2627–2632, 1 maio 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erx079>>.

HENRY, R. C. *et al.* Food supply and bioenergy production within the global cropland planetary boundary. *Plos One*, v. 13, n. 3, p. e0194695, 22 mar. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0194695>>.

HIREL, Bertrand *et al.* Improving Nitrogen Use Efficiency in Crops for Sustainable Agriculture. *Sustainability*, v. 3, n. 9, p. 1452–1485, 7 set. 2011. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2071-1050/3/9/1452>>.

HOLÁ, Dana *et al.* The disadvantages of being a hybrid during drought: A combined analysis of plant morphology, physiology and leaf proteome in maize. *Plos One*, v. 12, n. 4, p. e0176121, 18 abr. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0176121>>.

HORTON, Peter *et al.* Photosynthetic acclimation: Does the dynamic structure and macro-organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? *FEBS Journal*, v. 275, n. 6, p. 1069–1079, mar. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2008.06263.x>>.

HUANG, Jingjing *et al.* Self-protection of cytosolic malate dehydrogenase against oxidative stress in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, v. 69, n. 14, p. 3491–3505, 19 jun. 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/69/14/3491/4670922>>.

HUANG, Jun *et al.* Chlorophyll Content and Chlorophyll Fluorescence in Tomato Leaves Infested With an Invasive Mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Environmental Entomology*, v. 42, n. 5, p. 973–979, 1 out. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ee/article-lookup/doi/10.1603/EN12342>>.

HUANG, Z. A. *et al.* Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica*, v. 42, n. 3, p. 357–364, 1 set. 2004. Disponível em: <<http://ps.ueb.cas.cz/doi/10.1023/B:PHOT.0000046153.08935.4c.html>>.

IBORT, Pablo *et al.* Proteomic analysis reveals that tomato interaction with plant growth

promoting bacteria is highly determined by ethylene perception. *Journal of Plant Physiology*, v. 220, n. November 2017, p. 43–59, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2017.10.008>>.

IFUKU, Kentaro. The PsbP and PsbQ family proteins in the photosynthetic machinery of chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 81, p. 108–114, ago. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.001>>.

IJAZ, Muhammad *et al.* Combined application of biochar and PGPR consortia for sustainable production of wheat under semiarid conditions with a reduced dose of synthetic fertilizer. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 449–458, 23 abr. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s42770-019-00043-z>>.

JIANG, Yiwei *et al.* Leaf and Root Growth, Carbon and Nitrogen Contents, and Gene Expression of Perennial Ryegrass to Different Nitrogen Supplies. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 141, n. 6, p. 555–562, nov. 2016. Disponível em: <<https://journals.ashs.org/view/journals/jashs/141/6/article-p555.xml>>.

JIN, Ya *et al.* Comparison of the performance of 1D SDS-PAGE with nondenaturing 2DE on the analysis of proteins from human bronchial smooth muscle cells using quantitative LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 1105, p. 193–202, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.025>>.

KANT, Surya; BI, Y.-M.; ROTHSTEIN, Steven J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 4, p. 1499–1509, 1 fev. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erq297>>.

KARIM, Mohammad Rezaul *et al.* Physiological and proteomic dissection of the responses of two contrasting wheat genotypes to nitrogen deficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 6, p. 2119, 19 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/2119>>.

KIRCHHOF, G. *et al.* Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil*, v. 194, p. 45–55, 1997. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1004217904546#citeas>>.

KLASSEN, G *et al.* Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 9, p. 887–891, 1 set. 1997. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m97-129>>.

KLUGHAMMER, Christof; SCHREIBER, Ulrich. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the

Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*, v. 1, n. 1, p. 27–35, 2008. Disponível em: <<http://www.walz.com/>>.

KNEESHAW, Sophie *et al.* Nucleoredoxin guards against oxidative stress by protecting antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 31, p. 8414–8419, 1 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28724723>>. Acesso em: 8 out. 2020.

KONG, Fan-Jiang; OYANAGI, Atsushi; KOMATSU, Setsuko. Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1804, n. 1, p. 124–136, jan. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963909002714>>.

KONOTOP, Yevheniia *et al.* Defense responses of soybean roots during exposure to cadmium, excess of nitrogen supply and combinations of these stressors. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 12, p. 10077–10087, 1 dez. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-012-1881-8>>.

KOPER, Kaan *et al.* The rice plastidial phosphorylase participates directly in both sink and source processes. *Plant and Cell Physiology*, n. November, 25 nov. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/pcp/advance-article/doi/10.1093/pcp/pcaa146/6003007>>.

KOSOVÁ, Klára *et al.* Plant abiotic stress proteomics: The major factors determining alterations in cellular proteome. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. February, p. 1–22, 8 fev. 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00122/full>>.

KOTABOVÁ, Eva *et al.* Non-photochemical fluorescence quenching in *Chromera velia* is enabled by fast violaxanthin de-epoxidation. *FEBS Letters*, v. 585, n. 12, p. 1941–1945, 23 jun. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2011.05.015>>.

KUMAR JAT, Lokesh *et al.* Does integrated nutrient management, enhance agricultural productivity? *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 1211–1221, 2015.

KUMAR, Sumit *et al.* Molecular insights into photosynthesis and carbohydrate metabolism in *Jatropha curcas* grown under elevated CO₂ using transcriptome sequencing and assembly. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 11066, 11 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-017-11312-y>>.

KWON, Young Sang *et al.* Proteomic analyses of the interaction between the plant-growth promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 and *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, v. 16, n. 1, p. 122–135, jan. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201500196>>.

LADE, Sarah Boyd *et al.* Host-specific proteomic and growth analysis of maize and tomato

seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense* Sp7. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 129, n. June, p. 381–393, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.024>>.

LAEMMLI, U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAN, Chiu-Yueh *et al.* Protective Effects of Selenium on Wheat Seedlings under Salt Stress. *Agronomy*, v. 9, n. 6, p. 272, 30 maio 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4395/9/6/272>>.

LASTOCHKINA, O. *et al.* Plant growth-promoting bacteria: biotic strategy to cope with abiotic stresses in wheat. *Wheat Production in Changing Environments*. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 579–614. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-6883-7_23>.

LEANDRO, Mariana Ramos *et al.* Colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Herbaspirillum seropedicae* promotes its growth and changes its proteomic profile. *Plant and Soil*, v. 443, n. 1–2, p. 429–447, 8 out. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-019-04236-1>>.

LERY, Leticia M. S. *et al.* Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, v. 24, n. 5, p. 562–576, maio 2011. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-08-10-0178>>.

LI, Wenrao; ZHANG, Suiqi; SHAN, Lun. Responsibility of non-stomatal limitations for the reduction of photosynthesis—response of photosynthesis and antioxidant enzyme characteristics in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings to water stress and rehydration. *Frontiers of Agriculture in China*, v. 1, n. 3, p. 255–264, jul. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11703-007-0044-5>>.

LIAO, Ling *et al.* Antioxidant enzyme activity and growth responses of *Huangguogan citrus* cultivar to nitrogen supplementation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 83, n. 10, p. 1924–1936, 3 out. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2019.1634513>>.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.; KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{Fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, v. 43, n. 3, p. 379–393, 1 set. 2005. Disponível em: <<http://ps.ueb.cas.cz/doi/10.1007/s11099-005-0062-6.html>>.

LIU, Guo-Tian *et al.* Differential proteomic analysis of grapevine leaves by iTRAQ reveals

- responses to heat stress and subsequent recovery. *BMC Plant Biology*, v. 14, n. 1, p. 110, 2014. Disponível em: <<http://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-14-110>>.
- LIU, Hongwei *et al.* Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. DEC, p. 1–17, 19 dez. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02552/full>>.
- LUO, Gongwen *et al.* Organic amendments increase crop yields by improving microbe-mediated soil functioning of agroecosystems: A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 124, n. January, p. 105–115, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.06.002>>.
- MAGLOVSKI, Marína *et al.* Nutrition supply affects the activity of pathogenesis-related β -1,3-glucanases and chitinases in wheat. *Plant Growth Regulation*, v. 81, n. 3, p. 443–453, 25 abr. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10725-016-0222-7>>.
- MAHALINGAM, Ramamurthy. Phenotypic, physiological and malt quality analyses of US barley varieties subjected to short periods of heat and drought stress. *Journal of Cereal Science*, v. 76, p. 199–205, jul. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.007>>.
- MAIDA, Isabel *et al.* Antagonistic interactions between endophytic cultivable bacterial communities isolated from the medicinal plant *Echinacea purpurea*. *Environmental Microbiology*, v. 18, n. 8, p. 2357–2365, set. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12911>>.
- MANNING, Viola A. *et al.* Intracellular expression of a host-selective toxin, ToxA, in diverse plants phenocopies silencing of a ToxA-interacting protein, ToxABP1. *New Phytologist*, v. 187, n. 4, p. 1034–1047, set. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2010.03363.x>>.
- MANNING, Viola A.; HARDISON, Linda K.; CIUFFETTI, Lynda M. Ptr ToxA Interacts with a Chloroplast-Localized Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, v. 20, n. 2, p. 168–177, fev. 2007. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-20-2-0168>>.
- MARCHIORO, Volmir Sergio *et al.* CD 120 wheat cultivar, standard quality soft, for the Southern Region of Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 11, n. 4, p. 375–378, dez. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-70332011000400013&lng=en&tlng=en>.
- MARCOS, Fernanda Castro Correia *et al.* Endophytic bacteria affect sugarcane physiology without changing plant growth. *Bragantia*, v. 75, n. 1, p. 1–9, 24 nov. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-

87052016000100001&lng=en&tlng=en>.

MARX, Jean. The roots of plant-microbe collaborations. *Science*, v. 304, n. 5668, p. 234–236, 9 abr. 2004. Disponível em:

<<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.304.5668.234>>.

MASCHIO, Vinicius José *et al.* Comparative proteomic analysis of soluble and surface-enriched proteins from *Acanthamoeba castellanii* trophozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 225, p. 47–53, out. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685118300288>>.

MASUDA, Yoshio; WADA, Shunji. Effect of beta-1, 3-Glucanase on the elongation growth of oat coleoptile. *Botanical Magazine*, v. 80, p. 100–102, 1967.

MAXWELL, Kate; JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, n. 345, p. 659–668, abr. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/51.345.659>>.

MAYER, K. F. X. *et al.* A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, v. 345, n. 6194, p. 1251788–1251788, 18 jul. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1251788>>.

MELIS, Anastasios. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends in Plant Science*, v. 4, n. 4, p. 130–135, abr. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138599013874>>.

MELO, Hidelblandi F. De; SOUZA, Edivan R. De; CUNHA, Jailson C. Fluorescence of chlorophyll a and photosynthetic pigments in *Atriplex nummularia* under abiotic stresses. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 21, n. 4, p. 232–237, abr. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662017000400232&lng=en&tlng=en>.

MHAMDI, Amna *et al.* Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, out. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erq282>>.

MI, Huaiyu; MURUGANUJAN, Anushya; EBERT, Dustin; *et al.* PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D419–D426, 8 jan. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D419/5165346>>.

MI, Huaiyu; MURUGANUJAN, Anushya; HUANG, Xiaosong; *et al.* Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nature Protocols*, v. 14, n. 3, p. 703–721, 25 mar. 2019. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/s41596-019-0128-8>>.

MISHRA, Sandhya; SRIVASTAVA, Suchi; NAUTIYAL, Chandra Shekhar. Differential gene expression profile in *Pseudomonas putida* NBRIC19-treated wheat (*Triticum aestivum*) plants subjected to biotic stress of *Parthenium hysterophorus*. *Molecular Biology Reports*, v. 41, n. 3, p. 1385–1399, 10 mar. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-013-2983-7>>.

MOUTIA, J F Y *et al.* The role of diazotrophic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cane in Mauritius: Preliminary results. *AMAS - Food and Agricultural Research Council*, n. May 2003, p. 29–39, 2003.

MURASHIGE, T. Clonal Crops Through Tissue Culture. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H. (Org.). *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application: Proceedings in Life Sciences*. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg, 1977. p. 392–403. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-66646-9_33>.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biology and Fertility of Soils*, v. 29, n. 2, p. 157–164, 5 maio 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s003740050539>>.

MYRESIOTIS, Charalampos K; VRYZAS, Zisis; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, Euphemia. Enhanced root uptake of acibenzolar-S-methyl (ASM) by tomato plants inoculated with selected *Bacillus* plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Applied Soil Ecology*, v. 77, p. 26–33, maio 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.01.005>>.

NADEEM, Sajid Mahmood *et al.* The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 2, p. 429–448, mar. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497501300222X>>.

NAYYAR, Shivani *et al.* Red rot resistant transgenic sugarcane developed through expression of β -1,3-glucanase gene. *Plos One*, v. 12, n. 6, p. e0179723, 28 jun. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0179723>>.

NEHRA, Vibha; CHOUDHARY, Madhu. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. *Journal of Applied and Natural Science*, v. 7, n. 1, p. 540–556, 1 jun. 2015.

Disponível em: <<https://journals.ansfoundation.org/index.php/jans/article/view/642>>.

NEILSON, Karlie A.; MARIANI, Michael; HAYNES, Paul A. Quantitative proteomic analysis of cold-responsive proteins in rice. *Proteomics*, v. 11, n. 9, p. 1696–1706, maio 2011.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201000727>>.

NEIVERTH, Adeline *et al.* Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *European Journal of Soil Biology*, v. 64, p. 1–5, set. 2014. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1164556314000715>>.

NILKENS, Manuela *et al.* Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*,

v. 1797, n. 4, p. 466–475, abr. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.001>>.

NUNES-NESI, Adriano *et al.* Enhanced Photosynthetic Performance and Growth as a Consequence of Decreasing Mitochondrial Malate Dehydrogenase Activity in Transgenic Tomato Plants. *Plant Physiology*, v. 137, n. 2, p. 611–622, fev. 2005. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.104.055566>>.

OKAMOTO, Miwa; OKADA, Kensuke. Differential responses of growth and nitrogen uptake to organic nitrogen in four gramineous crops. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 402, p. 1577–1585, 1 jul. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erh167>>.

ONU. *World population prospects 2019*. [S.l: s.n.], 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12283219>>.

PANKIEVICZ, V. C S *et al.* RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant Molecular Biology*, v. 90, n. 6, p. 589–603, 22 abr. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11103-016-0430-6>>.

PASCHENKO, V. Z. *et al.* The efficiency of non-photochemical fluorescence quenching by cation radicals in photosystem II reaction centers. *Photosynthesis Research*, v. 130, n. 1–3, p. 325–333, 13 dez. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11120-016-0260-z>>.

PEDROSA, Fábio de Oliveira; YATES, M. G. Physiology, biochemistry, and genetics of azospirillum and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 6, n. 4, p. 345–384, jan. 1988. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352688809382255>>.

PEDROSA, Fábio O. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genetics*, v. 7, n. 5, p. e1002064, 12 maio 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002064>>.

PEREIRA, Tomás Pellizzaro *et al.* Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. *Molecular Biotechnology*, v. 56, n. 7, p. 660–670, 22 fev. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12033-014-9742-4>>.

PÉREZ-MONTAÑO, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, v. 169, n. 5–6, p. 325–336, maio 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131300164X>>.

POLESSKAYA, O. G.; KASHIRINA, E. I.; ALEKHINA, N. D. Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 51, n. 5, p. 615–620, set. 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:RUPP.0000040746.66725.77>>.

PRIETO, DaRue A. *et al.* Protocol for the analysis of laser capture microdissected fresh-frozen tissue homogenates by silver-stained 1D SDS-PAGE. In: MURRAY, GRAEME I (Org.). . *Laser Capture Microdissection: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York: Springer, 2018. v. 1723. p. 95–110. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7558-7_4>.

RAAIJMAKERS, Jos M. *et al.* The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, v. 321, n. 1–2, p. 341–361, 23 ago. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-008-9568-6>>.

RAMPITSCH, Christof *et al.* Temporal quantitative changes in the resistant and susceptible wheat leaf apoplastic proteome during infection by wheat leaf rust (*Puccinia triticina*). *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. October, p. 1–14, 23 out. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.01291/full>>.

RANGEL DE SOUZA, A. L. S. *et al.* Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant and Soil*, v. 399, n. 1–2, p. 257–270, 6 fev. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11104-015-2672-5>>.

RICHARDSON, Lynn G. L.; SINGHAL, Rajneesh; SCHNELL, Danny J. The integration of chloroplast protein targeting with plant developmental and stress responses. *BMC Biology*, v. 15, n. 1, p. 118, 7 dez. 2017. Disponível em:

<<https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-017-0458-3>>.

ROESCH, Luiz Fernando W *et al.* Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 9, p. 967–974, 4 set. 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11274-006-9142-4>>.

ROTHBALLER, Michael *et al.* Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 66, n. 1, p. 85–95, out. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2008.00582.x>>.

ROY, Sonali *et al.* Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, v. 32, n. 1, p. 15–41, jan. 2020. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.19.00279>>.

RUDENKO, N. N. *et al.* Carbonic anhydrases in photosynthetic cells of higher plants. *Biochemistry (Moscow)*, v. 80, n. 6, p. 674–687, 18 jun. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0006297915060048>>.

SAHARAN, B S; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, v. 2011:LSMR-, p. 1, 2011. Disponível em: <<http://astonjournals.com/lsmr>>.

SALA, Valéria Marino Rodrigues *et al.* Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, n. 1, p. 345–352, 2005.

SAMANIEGO-GÁMEZ, Blancka Yesenia *et al.* *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chilean journal of agricultural research*, v. 76, n. 4, p. 409–416, dez. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-58392016000400003&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

SANTOS, Cristiane *et al.* Proteomic Analysis and Functional Validation of a Brassica oleracea Endochitinase Involved in Resistance to *Xanthomonas campestris*. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. April, 12 abr. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00414/full>>.

SARMA, Banashree *et al.* Organic amendments: Effect on carbon mineralization and crop productivity in acidic soil. *Journal of Cleaner Production*, v. 152, p. 157–166, maio 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.124>>.

SASI, Shina *et al.* Photosystem II extrinsic proteins and their putative role in abiotic stress tolerance in higher plants. *Plants*, v. 7, n. 4, p. 100, 14 nov. 2018. Disponível em:

<<http://www.mdpi.com/2223-7747/7/4/100>>.

SCHLEMPER, Thiago R. *et al.* Effect of *Burkholderia tropica* and *Herbaspirillum frisingense* strains on sorghum growth is plant genotype dependent. *PeerJ*, v. 6, n. 7, p. e5346, 24 jul. 2018. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/5346>>.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecophysiology of Photosynthesis*, p. 49–70, 1995.

SEVILLA, Myrna *et al.* Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15 N incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif^- mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, v. 14, n. 3, p. 358–366, mar. 2001. Disponível em: <<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.2001.14.3.358>>.

SHAMEER, Syed; PRASAD, T. N. V. K. V. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, v. 84, n. 3, p. 603–615, 3 abr. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10725-017-0365-1>>.

SHANGGUAN, Zhouping; SHAO, Mingan; DYCKMANS, Jens. Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. *Journal of Plant Physiology*, v. 156, n. 1, p. 46–51, jan. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161700802710>>.

SHETTY, Nandini P. *et al.* Effects of -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 15, p. 4287–4300, 1 nov. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erp269>>.

SHEVCHENKO, Andrej *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, v. 68, n. 5, p. 850–858, jan. 1996. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac950914h>>.

SHOEVA, O.Yu.; KHLESTKINA, E.K. Anthocyanins participate in the protection of wheat seedlings against cadmium stress. *Cereal Research Communications*, v. 46, n. 2, p. 242–252, jun. 2018. Disponível em: <<https://www.akademaii.com/doi/10.1556/0806.45.2017.070>>.

SHRIVASTAVA, Pooja; KUMAR, Rajesh. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 22, n. 2, p. 123–131, mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>>.

SILVEIRA, Adriana Parada Dias Da *et al.* Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. *Applied Soil Ecology*, v. 107, p. 313–319,

nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.005>>.

SINGH, Rajnish Prakash *et al.* Quantitative proteomics analysis reveals the tolerance of wheat to salt stress in response to *Enterobacter cloacae* SBP-8. *Plos One*, v. 12, n. 9, p. e0183513, 6 set. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0183513>>.

SMANHOTTO, Adriana *et al.* Características físicas e fisiológicas na qualidade industrial de cultivares e linhagens de trigo e triticale. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 10, n. 4, p. 867–872, dez. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662006000400013&lng=pt&tlng=pt>.

SNAK, Aline. *Associação de bactérias endofíticas com forrageiras e submetidas ao déficit hídrico*. 2018. 144 f. Universidade Federal do Paraná - UFPR, 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/55608>>.

SOBRINHO, J. S.; SOUZA, M. A. Origem, descrição botânica e desenvolvimento do trigo. *Informe Agropecuario*. 97. ed. Belo Horizonte: [s.n.], 1983. p. 9–13.

SOTO, María J. *et al.* Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular Microbiology*, v. 11, n. 3, p. 381–388, mar. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2009.01282.x>>.

SOUZA, Rocheli De; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciane M.P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, v. 38, n. 4, p. 401–419, 3 nov. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572015000400401&lng=en&tlng=en>.

SOUZA, Pedro F. N.; GARCIA-RUIZ, Hernan; CARVALHO, Fabricio E. L. What proteomics can reveal about plant–virus interactions? Photosynthesis-related proteins on the spotlight. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 31, n. 1, p. 227–248, 22 mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40626-019-00142-0>>.

STEFAN, Marius *et al.* Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 18, n. 2, p. 8132–8143, 2013.

SUYAL, Deep Chandra *et al.* Quantitative proteomics of psychotrophic diazotroph in response to nitrogen deficiency and cold stress. *Journal of Proteomics*, v. 187, n. March, p. 235–242, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.08.005>>.

SYLVESTRE-GONON, Elodie *et al.* Functional, structural and biochemical features of plant serinyl-glutathione transferases. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. May, p. 1–22, 22 maio

2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00608/full>>.
- SZKLARCZYK, Damian *et al.* STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 8 jan. 2019. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D607/5198476>>.
- THEIN, Marcus *et al.* Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 12, p. 6135–6147, 3 dez. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/pr1002438>>.
- TREUTTER, Dieter. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 4, n. 3, p. 147–157, 7 ago. 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10311-006-0068-8>>.
- TULESKI, Thalita Regina *et al.* Cellulose production increases sorghum colonization and the pathogenic potential of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 4041, 11 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-40600-y>>.
- VASCONCELOS, É. A. R. *et al.* Protein extraction from cowpea tissues for 2-D Gel electrophoresis and MS Analysis. *Chromatographia*, v. 62, n. 7–8, p. 447–450, 10 out. 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-005-0637-1>>.
- WANG, Shuzhen *et al.* Comparative proteomic analysis reveals alterations in development and photosynthesis-related proteins in diploid and triploid rice. *BMC Plant Biology*, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12870-016-0891-4>>.
- WASTERNAK, Claus; STRNAD, Miroslav. Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites — Pathways, transcription factors and applied aspects — A brief review. *New Biotechnology*, v. 48, p. 1–11, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678417304429>>.
- WEN, Daxing *et al.* Proteomic analysis of wheat seeds produced under different nitrogen levels before and after germination. *Food Chemistry*, v. 340, n. July 2020, p. 127937, mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127937>>.
- WRZESINSKI, Krzysztof; FEY, Stephen. Metabolic reprogramming and the recovery of physiological functionality in 3D cultures in micro-bioreactors. *Bioengineering*, v. 5, n. 1, p. 22, 7 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2306-5354/5/1/22>>.
- YANG, Jungwook; KLOEPPER, Joseph W.; RYU, Choong-Min. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, v. 14, n. 1, p. 1–4, jan. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138508002902>>.
- YANG, Miao *et al.* Effect of post-silking drought stress on the expression profiles of genes

involved in carbon and nitrogen metabolism during leaf senescence in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 135, n. September 2018, p. 304–309, fev. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.12.025>>.

YANG, Xiaoli *et al.* Proteomic dissection of cell type-specific H2AX-interacting protein complex associated with *Hepatocellular Carcinoma*. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 3, p. 1402–1415, 5 mar. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr900932y>>.

YAO, Yanyu *et al.* Nitrogen and carbon contents, nitrogen use efficiency, and antioxidant responses of perennial ryegrass accessions to nitrogen deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, v. 42, n. 17, p. 2092–2101, 21 out. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1655047>>.

YI, Yuan *et al.* Is there a nitrogen fertilizer threshold emitting less N₂O with the prerequisite of high wheat production? *Plos One*, v. 13, n. 8, p. e0202343, 28 ago. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0202343>>.

YIN, Lijun *et al.* Optimised nitrogen allocation favours improvement in canopy photosynthetic nitrogen-use efficiency: Evidence from late-sown winter wheat. *Environmental and Experimental Botany*, v. 159, n. December 2018, p. 75–86, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.013>>.

YIN, Xuefei *et al.* Systematic comparison between SDS-PAGE/RPLC and high-/low-pH RPLC coupled tandem mass spectrometry strategies in a whole proteome analysis. *The Analyst*, v. 140, n. 4, p. 1314–1322, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4AN02119C>>.

YOON, Vanessa *et al.* Colonization efficiency of different sorghum genotypes by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Plant and Soil*, v. 398, n. 1–2, p. 243–256, 7 jan. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-015-2653-8>>.

YOUSUF, Peerzada Yasir *et al.* Responsive proteins in wheat cultivars with contrasting nitrogen efficiencies under the combined stress of high temperature and low nitrogen. *Genes*, v. 8, n. 12, p. 356, 29 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4425/8/12/356>>.

YU, Wen Qing *et al.* *Paenibacillus terrae* NK3-4: A potential biocontrol agent that produces β -1,3-glucanase. *Biological Control*, v. 129, p. 92–101, fev. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.09.019>>.

ZADOKS, J C; CHANG, T T; KONZAK, C F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, v. 14, n. 6, p. 415–421, dez. 1974. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>>.

ZHANG, Bing; CHAMBERS, Matthew C.; TABB, David L. Proteomic parsimony through bipartite graph analysis improves accuracy and transparency. *Journal of Proteome Research*,

v. 6, n. 9, p. 3549–3557, set. 2007. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr070230d>>.

ZHANG, Ning *et al.* iTRAQ and virus-induced gene silencing revealed three proteins involved in cold response in bread wheat. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 7524, 8 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-08069-9>>.

ZHU, Dong *et al.* Effects of independent and combined water-deficit and high-nitrogen treatments on flag leaf proteomes during wheat grain development. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 6, p. 2098, 19 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/6/2098>>.

ZIMIN, Aleksey V. *et al.* The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum*. *GigaScience*, v. 6, n. 11, p. 1–7, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/gigascience/article/doi/10.1093/gigascience/gix097/4561661>>.

8 TABELAS SUPLEMENTARES

TABELA SUPLEMENTAR 1 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD104** PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS COM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO (CN&SN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais relacionados em grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	biscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6RC85	Proteína contendo domínio Transket_pyr	4577.GRMZM2G03 3208_P01	89	683.3	TKT	transcetolase cloroplástica
2	A0A3B6CD34	Proteína contendo domínio de hidroxilácido desidrogenase FMN	4577.GRMZM5G85 3854_P04	89	655.2	GLO1	(S)-2-hidroxi-ácido oxidase peroxisomal
3	A0A3B6TQD5	Proteína não caracterizada	A0A3B6REC1, A0A3B6SIC2, A0A3B6REW9, A0A3B6TIX4, A0A3B6TIX1	90	844.7	GSA	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase
4	A0A3B6KCB6	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G04 8371_P01	95	839.7	ENO2	Enolase 2
5	A0A3B5XZJ7	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM5G88 8696_P02	82	861.3	TIC110	Proteína cloroplástica TIC110
6	A0A3B5YVW2	Proteína não caracterizada	A0A3B5ZT18, A0A3B5XZJ7, A0A3B5YVW4,	82	864.4	TIC110	Proteína cloroplástica TIC110

[illegible]

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose com nitrogênio (CN) e sem nitrogênio (SN) mantidas em sala de crescimento a 24 ($\pm$ 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições, n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arábidoopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA SUPLEMENTAR 2 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD104** PRESENTES NA INTERSECÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (**SN&SNI**) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais	grupo de máxima parcimônia relacionado em	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6EFN6	Proteína contendo domínio grande RuBisCO			4565.EPITAEP00000010047	95	213	RBLC	cadeia grande da ribulose bifosfato carboxilase (RuBisCO)
2	A0A3B6NT53	Proteína não caracterizada			4565.Traes_6AL_150E13EA1.1	100	761.9	ANT-2	Transportador ADP / ATP, proteína 2, mitocondrial;
3	Q8LRM8	Homólogo de proteína tumoral controlado de forma translacional			4565.Traes_4DS_AF AF2A29E.1	100	343.6	TCTP	Homólogo de proteína tumoral controlado pela tradução
4	A0A3B5Z3H2	Proteína não caracterizada			4565.EPITAEP000000010058	97	341.7	ATPA	ATP sintase subunidade alfa cloroplástica
5	A0A3B6RL68	Proteína não caracterizada	A0A3B6TTG3, A0A3B6SFC8		3702.AT3G48420.1	83	401.7	HAD família	Proteína da superfamília da hidrolase do tipo haloácido desalogenase;
6	A0A3B6DI12	Proteína contendo domínio PEROXIDASE_4	A0A3B6CC52, A0A3B6B478		4577.GRMZM2G156227_P01	77	519.6	TL29	Proteína do lúmen do tilacóide 29 kDa cloroplástica;

7	A0A3B6CC52	Proteína contendo domínio PEROXIDASE_4	4577.GRMZM2G156_227_P01	76	511.9	TL29	Proteína do lúmen do tilacóide 29 kDa cloroplástica;
8	A0A3B6B478	Proteína contendo domínio PEROXIDASE_4	4577.GRMZM2G156_227_P01	77	516.5	TL29	Proteína luminal de tilacóide 29 kDa cloroplástica;
9	A0A3B6RIX9	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G158_462_P01	73	368.2	CP31B	Proteína de ligação a RNA cloroplástico (CP31B)
10	A0A3B6LN04	Proteína não caracterizada	4565.EPITAEP00000_010009	131	113.2	PSAC	Centro de ferro-enxofre do fotossistema I; Apoproteína
11	Q41630	Transportador ADP/ATP proteína 2, mitocondrial (ANT-G2)	4565.Traes_6AL_150_E13EA1.1	98	644.8	ANT-G2	Transportador ADP / ATP, proteína 2, mitocondrial
12	A0A3B6LUL8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G308_687_P01	73	340.1	GST5	Glutathione S-transferase
13	A0A3B6GQZ6	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G030_784_P02	89	451.8	TIM	Triosefosfato isomerase citosólica
14	Q9ZRB7	Cadeia alfa da tubulina (TUBA)	4565.Traes_1AL_0C_964B45F.1	100	917.5	TUBA	Cadeia alfa da tubulina;
15	A0A3B5ZUY9	Proteína não caracterizada	4565.EPITAEP00000_010009	132	120.6	PSAC	Centro de ferro-enxofre do fotossistema I; Apoproteína

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CDI04, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose sem nitrogênio (SN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA SUPLEMENTAR 3 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD104** PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS COM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (**CN&SNI**) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais	grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1 A0A3B5YS83	Proteína caracterizada	não		4565.EPITAEP00000010067	94	131.3	PSBH	Proteína H do centro de reação do fotossistema II
2 A0A3B6HW60	Proteína caracterizada	não		4577.GRMZM2G023289_P01	91	1066.6	PGM	Fosfoglucomutase 2 citoplasmática
3 P26302	Fosforibulocinase, cloroplástico			4565.Traes_6DL_22C536081.1	100	823.5	PRK	Fosforibulocinase cloroplástica
4 A0A3B6D6H2	ATP sintase subunidade alfa	sintase		4565.EPITAEP00000010092	96	852.8	ATP1	subunidade alfa da ATP sintase mitocondrial
5 A0A3B6MN25	Proteína caracterizada	não		4577.GRMZM2G001500_P02	94	1151.3	HSP70-6	proteína 6 de Heat shock, 70 kDa, cloroplástica
6 A0A3B6CFK1	Aminometil transferase			4565.Traes_2BL_2768AE3B1.1	100	725.7	GevT	Aminometil transferase (sistema T de clivagem de glicina) mitocondrial

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose com nitrogênio (CN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arábidoopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA SUPLEMENTAR 4 – RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD104** PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS COM NITROGÊNIO, SEM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (CN&SN&SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT	adicionais relacionadas em grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/ proteína	Descrição STRING
1	A0A3B5Z298	Fosfoglicerato quinase			4565.Traes_1AL_7C 91EF27D.1	99	656.8	PGK1	Fosfoglicerato quinase, cloroplástico
2	A0A3B5ZSY5	Proteína não caracterizada			4565.Traes_5DL_30 57DE7CD.1	90	410.6	ATPB	ATP sintase subunidade beta
3	A0A3B6GXH5	Proteína contendo domínio ATP synt ab			4565.Traes_3B_0CB 962B6E.1	80	237.7	ATPB	ATP sintase subunidade beta
4	A0A3B5Z3C7	ATP sintase subunidade beta			4565.Traes_3DL_C B9CA6DF6.1	97	734.9	ATPB	ATP sintase subunidade beta
5	P26667	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia pequena PW9			4565.Traes_2AS_C3 EF3A27F.1	98	358.2	RBS2	cadeia pequena PW9 da ribulose bifosfato carboxilase, cloroplástico

6	P07398	Ribulose bifosfato carboxilase clone de cadeia pequena 512 (Fragmento)	4565.Traes_5DL_E4 D3B835D.1	99	246.5	RBCS	cadeia pequena da ribulose bifosfato carboxilase
7	A0A3B6TJG2	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1BL_E3 8BBC0DA1.1	91	485.3	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
8	A0A3B5ZZX3	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1AL_0F 39673AF1.3	98	534.6	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
9	W5F8Z5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5BL_29 847C42C.1	100	548.1	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
10	A0A3B6B1C5	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	4565.Traes_2AL_78 3CF383F.1	98	780.4	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
11	A0A3B6GWA0	Anidrase carbônica	4565.Traes_7DL_B2 28E9EA8.2	87	371.3	CA	Anidrase carbônica
12	A0A3B6DER7	Proteína contendo domínio de tiorredoxina	4565.Traes_2AL_C6 F2FA817.1	99	421.4	TSA	2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástico
13	A0A3B6DCU3	Proteína intensificadora de evolução de oxigênio	4565.Traes_2BL_4B 8B77E73.1	93	572	PSBO	Proteína 1 intensificadora de evolução de oxigênio, cloroplástica

14	A0A3B6HWM 5	ATPase proteína contendo domínio central AAA	A0A3B6JJ08, A0A3B6IPQ4, A0A3B6JFQ9, A0A3B6JHF0, A0A3B6JFS0, A0A3B6JII7, A0A3B6HTM6, A0A3B6JJ03, A0A3B6JHE4, A0A3B6HXK4, A0A3B6JGP2, A0A3B6JIJ3, A0A3B6IN76, A0A3B6JGN7, A0A3B6IS66, A0A3B6IPQ9	4577.GRMZM2G16 2200_P01	84	734.9	RCAI	Ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase ativase, cloroplástico
15	A0A3B6MZ92	Proteína contendo domínio Apocytochr F N	A0A3B6KTQ4, A0A3B6GML8, A0A3B6PNM2, A0A3B5ZSX6, A0A3B5XX63	4565.Traes_6AS_58 B52A630.1	99	620.2	APCF	Apocitocromo f
16	A0A3B6U4U3	Proteína contendo domínio Transket pyr		4577.GRMZM2G03 3208_P01	90	1191. 4	TKL	Transcetolase, cloroplástica
17	A0A3B6PLM0	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	W5GFA4	4565.Traes_6DS_8D 580A93D.2	100	545	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica

18	A0A3B6RQI3	Proteína contendo domínio AAA	4577.GRMZM2G08 7598_P01	94	839.3	FTSH2B	H 2B sensível à temperatura de filamentação
19	A0A3B6RQM8	Proteína contendo domínio AAA	4577.GRMZM2G08 7598_P01	92	1164. 1	FTSH2B	H 2B sensível à temperatura de filamentação
20	A0A3B6KBT8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G16 5747_P01	92	1404. 8	MS	5- metiltetrahidro pteroiltriglutamato - homocisteína metiltransferase
21	A0A3B6C5R9	ATP sintase subunidade alfa	4565.EPITAEP0000 0010092	98	906.4	ATP1	ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial
22	A0A3B6MT65	Citocromo b559 subunidade alfa	A0A077RQZ4, A0A3B6AX34, A0A3B6C2P4, A0A3B6GPS3, A0A3B6AX67, A0A3B6NJJ8, A0A3B6GW78, A0A3B5XYE0, A0A3B6DC04, A0A3B6STH9, A0A3B5ZTR9, A0A3B6U9I3, A0A3B6FFC2, A0A3B6N3S0, A0A3B6HUK0, A0A3B6C5V8,	100	170.2	PSBE	Citocromo b559 subunidade alfa

A0A3B6RJU8, A0A3B6JFW4, A0A3B6HU36, A0A3B6GT78, A0A3B6QMH7, A0A3B6DLF5, A0A3B6PLW3, A0A3B6KRG7								
23	A0A3B6RH69	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	A0A341YEW4	4565.Traes_7AS_D C51A1D61.1	100	418.7	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
24	A0A3B6GPT0	Proteína do centro de reação do fotossistema II CP47	A0A3B6PF56, A0A3B6MRQ9, A0A3B6N385, A0A3B6EGN0	4565.EPITAEP0000 0010015	79	737.6	PSBB	Proteína do centro de reação do fotossistema II CP47
25	A0A3B6LR33	Proteína não caracterizada		4565.Traes_5DL_17 E38786F.1	99	500.7	TIM	Triosefosfato isomerase
26	A0A3B6ER11	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G07 7333_P01	91	350.1	PSBS	Proteína fotossistema II de 22 kDa
27	A0A3B6LWV1	Proteína não caracterizada		3702.AT4G28750.1	81	121.7	PSAE-1	Subunidade IV A do centro de reação do fotossistema I, cloroplástico
28	A0A3B6B5K3	Aminometiltransferase		4565.Traes_2BL_27 68AE3B1.1	99	721.1	GDCST	Aminometiltransferase

29	A0A3B5XXYX6	Proteína não caracterizada	A0A3B6KDW0, A0A3B5XT63, A0A3B6KFD9, A0A3B6HZ58, A0A1D6DJ20, A0A1D5X5C6, Q5EWZ1, W5AH12, W5FAY5, A0A3B6MME4, A0A3B6IMZ8, A0A3B6HWJ7, A0A3B6JG31, A0A3B6INX9, A0A3B6I0K7, A0A3B6HZM6, W5EE00, A0A3B6H2B3, A0A3B6FX66, A0A3B6GXG2, W5CSL3, A0A3B6H1W2, W5AFW9, A0A3B6EMQ5, A0A3B6U5K5	4577.GRMZM2G03 0169_P02	99	713	ACT2	Actina-2
30	Q93W25	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	Q93XQ6	4565.Traes_6AS_82 E93D872.1	100	366.3	CYP1	Peptidil-prolil cis-trans isomerase

31	A0A3B6RB72	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G09 5252_P01	96	587.4	CPN60B 2	Chaperonina 60 subunidade beta 2 cloroplástica
32	A0A3B5Y072	Nucleosídeo difosfato quinase	4565.Traes_1AL_6F_2E87864.2	100	305.1	NDK	Nucleosídeo difosfato quinase
33	A0A3B5ZT69	Proteína não caracterizada	4565.EPITAEP0000 0010048	98	1523.8	PSAB	Clorofila a apoproteína A2 do fotossistema I P700
34	A0A3B6SHQ4	Proteína contendo domínio Amino transferase	4577.GRMZM2G13 7868_P01	86	708.4	AGT1	Serina - glicoxilato amino transferase
35	Q7X9A6	Subunidade do complexo ferro-enxofre do citocromo b6-f, cloroplástico	4565.Traes_2AS_14_75F8BDB.1	94	434.9	PETC	Subunidade do complexo ferro-enxofre do citocromo b6-f, cloroplástico
36	A0A3B6FNR1	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G00 7151_P01	78	196.1	PCAP1	Proteína de ligação catiônica associada à membrana plasmática 1
37	A0A3B6CEH1	Glutamina Sintetase	4565.Traes_2BL_34_2BDEA35.2	99	867.8	GS2	Glutamina Sintetase
38	A0A0C4BJE5	Serina hidroximetiltransferase	4565.Traes_4AL_24_F8F34EE.1	100	1009.6	SHM	Serina hidroximetiltransferase

39	A0A3B6EL51	Proteína P do sistema de clivagem de glicina	4565.Traes_3DL_A 6F32E158.1	100	948.3	GPD1	Proteína P do sistema de clivagem de glicina
40	A0A3B6PUD8	Proteína não caracterizada	A0A3B6NX57, A0A3B6NWX49	62	147.5	PSBR	Codifica para a subunidade PsbR de 10 kDa do fotossistema II (PSII)
41	A0A3B5ZT76	Proteína D1 do fotossistema II	A0A3B5ZP89, A0A3B6QDB2, A0A3B6IS79, A0A3B6KN25	98	706.1	PSBA	Proteína D1 do fotossistema II
42	A0A3B6FN83	Proteína não caracterizada	4565.Traes_6DS_57 7BE9937.2	99	886.7	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande
43	A0A3B6DPM4	ATP sintase subunidade beta	4565.Traes_4DS_A CF7656A2.1	94	885.9	ATPB	ATP sintase subunidade beta
44	A0A3B6MLL4	Proteína contendo domínio ATP synt ab N	4565.Traes_5DL_30 57DE7CD.1	88	200.3	ATPB	ATP sintase subunidade beta
45	A0A3B6FK11	ATP sintase subunidade beta	4565.Traes_3B_0CB 962B6E.1	98	797.3	ATPB	ATP sintase subunidade beta
46	A0A3B6JMT4	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	A0A3B6IY26, A0A3B6KSW8 3CF383F.1	73	537.3	GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

47	A0A1D5TTT2	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	4565.Traes_2BL_5D_64E8C87.1	98	780.8	GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
48	A0A3B6TID0	Proteína contendo o domínio TRANSCETOLASE 1	A0A3B6R8Q3, A0A3B6U010, A0A3B6RC85, A0A3B6ARC4, A0A1D5UVU1, A0A3B6BZB5	90	1189.5	TKL	Transcetolase, cloroplástica
49	A0A3B5ZUZ3	ATP sintase subunidade alfa	4565.EPITAEP00000010058	97	912.1	ATPA	ATP sintase subunidade alfa, cloroplástico
			A0A3B6MZX9, A0A3B6SN12, A0A3B6MZL5, A0A3B6MJC8, A0A3B5ZVC1, A0A3B6NPL2, A0A3B6B8G2, A0A3B6SL57, A0A3B6C5R9, A0A3B5ZP87, A0A3B6UCR2, A0A3B6K9K7, A0A3B6RD12, A0A3B6LT32, A0A3B6FZW8, A0A3B5ZTE0, A0A3B5ZTN1, A0A3B6UBH6, A0A3B5Z3I4, A0A3B6DBJ7,				

A0A3B6FR48, A0A3B6GRV2, A0A3B5Z561, A0A3B5ZTR5, A0A3B6MLJ4, A0A3B6R9D6, A0A3B6U9A5, A0A3B5Z2X0, A0A3B6KGV7, D8IVM4, A0A3B6D6H2, A0A3B6IRN0, A0A3B5XXM2, A0A3B6EM40, A0A3B5Z1T9, A0A3B6MLV7, A0A3B6JFE0, A0A3B6ING1							
50	A0A3B6MJC8	ATP sintase subunidade alfa	4565.EPITAEP0000 0010058	98	719.9	ATPA	ATP sintase subunidade alfa, cloroplástico
51	A0A3B6NV28	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G05 6039_P01	90	1088. 6	HSP70	Proteína de choque térmico 70
52	A0A3B6C475	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G02 1617_P01	71	280.8	PSBQ1	Proteína intensificadora de evolução de oxigênio 3-1, cloroplástica

53	A0A3B5ZTS4	Proteína não caracterizada	4565.EPITAEP0000 0010015	74	529.3	PSBB	Proteína do centro de reação do fotossistema II CP47
54	A0A3B5Z4J5	Proteína não caracterizada	4565.EPITAEP0000 0010028	93	328.9	ATPF	ATP sintase subunidade b, cloroplástico
55	A0A3B6JCT8	Proteína não caracterizada	A0A3B6TE20, A0A3B6U324, A0A3B6MIB6, A0A3B6U975, A0A3B6UCS8, A0A3B6LGE1, A0A3B5ZTQ9, A0A3B6N0B7, A0A3B6CFG4, A0A3B6N0C4, A0A3B6MKT4, A0A3B6JJU7	91	324.3	ATPF	ATP sintase subunidade b, cloroplástico
56	A0A3B6GYS7	Proteína não caracterizada	W5D4R0	91	346.3	PSBS	Proteína fotossistema II de 22 kDa
57	A0A3B6C702	Proteína contendo domínio de tiorredoxina	4565.Traes_2AL_C6 F2FA817.1	104	466.5	TSA	2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástico
58	A0A3B5Z2Y2	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1AL_0F 39673AF1.3	98	532.7	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica

59	Q00434	Proteína 2 intensificadora de evolução de oxigênio, cloroplástica	4565.Traes_2AL_0 A039E562.1	99	487.3	PSBP	Proteína 2 intensificadora de evolução de oxigênio, cloroplástica
60	A0A3B6TQT6	Proteína não caracterizada	3702.AT1G78900.2	91	1019. 2	VHA-A	Codifica a subunidade A catalítica da ATP sintase vacuolar
61	A0A3B6PNI9	Fator de alongamento Tu	4565.Traes_6DL_1B 9FBE0921.1	100	751.9	TUFA	Fator de alongamento Tu
62	A0A3B6EG02	RuBisCO dependente do domínio grande	4565.EPITAEP0000 0010047	93	297.4	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande
63	A0A1D5UV66	Proteína não caracterizada	4565.Traes_2AS_C1 EA81EC4.2	100	944.1	RBCL	subunidade alfa da proteína de ligação da subunidade grande da RuBisCO , cloroplástico
64	A0A3B6MSB3	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5DL_C5 1E9ECBB.1	100	503.8	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
65	W5FIZ2	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5BL_D BC5D12AB.1	100	504.2	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica

66	A0A3B6MXE7	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G01 7290_P01	90	346.3	PSAF	Subunidade III do centro de reação do fotossistema I
67	A0A3B6QMM8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G17 4984_P01	66	143.3	PSB3	Polipeptídeo de 10 kDa do fotossistema II
68	A0A3B6NGZ5	Proteína não caracterizada	A0A341WSR4, A0A3B6LMZ2	92	727.2	SKP1A	Proteína 1A semelhante a SKP1
69	Q5S1S6	Peroxiredoxina Q, cloroplástico	4565.Traes_7DS_A9 BD8001C.1	95	413.3	PRX1	Peroxiredoxina Q, cloroplástico
70	A0A3B6TBB9	Ferredoxina - NADP redutase, cloroplástico	A0A3B6R6V9, A0A3B6I733, A0A3B6PG71, A0A3B6NH85, A0A3B6Q8P5	98	518.8	L-FNRJII	Ferredoxina - NADP redutase
71	A0A3B6EFP8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G00 7151_P01	79	199.1	PCAP1	Proteína de ligação catiônica associada à membrana plasmática 1
72	P46285	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, cloroplástica	A0A3B6GX15, D8L9G3, A0A3B6GYS8	100	577.8	S17P	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, cloroplástica
73	A0A3B6NKKJ7	Peroxidase	4565.Traes_6AS_5B AD56BB6.1	100	646.4	PRX	Peroxidase
74	A0A3B6RSZ0	Proteína contendo domínio AAA	A0A3B6SLL5, A0A3B6TSM7	93	1109.7	FTSH5	Metaloprotease de zinco dependente de ATP FTSH 5 cloroplástico

75	A0A3B6PLX2	Proteína contendo domínio UVR	4577.GRMZM2G12 3922_P01	94	1664. 4	F9K21.3 0	Proteína da superfamília da hidrolase de trifosfato de nucleosídeo duplo Clp-N contendo motivo duplo
76	A0A1D5RS51	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5BL_6F B7A4B58.1	95	526.2	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
77	A0A3B6MXH4	Proteína não caracterizada	A0A3B5ZUM8, A0A3B6EG02, A0A3B6G072, A0A3B6EFN6, A0A3B6NTI7, A0A3B6B5E0	98	980.7	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande
78	A0A3B5ZUZ8	ATP sintase subunidade beta	4565.Traes_3AS_C0 6F3EFD5.1	93	639	ATPB	ATP sintase subunidade beta
79	A0A3B6I733	Ferredoxina - NADP redutase, cloroplástico	4565.Traes_4AL_B9 FA07247.2	100	525.4	ATPB	Ferredoxina - NADP redutase
80	P08823	RuBisCO subunidade de proteína de ligação à subunidade grande, subunidade alfa, cloroplástico (fragmento)	A0A3B6U2Z7 4565.Traes_2AS_C1 EA81EC4.2	100	944.9	L-FNR11	RuBisCO grande subunidade de ligação de proteína subunidade alfa, cloroplástico

81	A0A3B6R9W0	Plastocianina	A0A3B6I3R2	4565.Traes_4AL_00 D18D2CC.1	89	236.5	PETE	Plastocianina
82	A0A3B6ASL5	Proteína contendo o domínio glutamina amidotransferase tipo 2	A0A3B6I3R2	4577.GRMZM2G03 6609_P02	95	2360.5	GLU	Glutamato sintase dependente de ferredoxina, cloroplástico
83	A0A3B6KNX6	Proteína contendo domínio de hidroxíácido desidrogenase FMN		3702.AT3G14415.2	83	610.1	GOX2	Proteína da família de barril TIM do tipo aldolase
84	A0A3B6NM91	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		4565.Traes_6AS_F8 D06BEC8.2	96	526.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
85	A0A3B6TGT6	Proteína contendo domínio CAAD		4577.GRMZM2G04 7720_P01	83	236.9		Treonina endopeptidase
86	A0A3B6DMK0	Proteína não caracterizada		4565.Traes_3DL_0 A92A2224.1	98	260.4	CP43 PSII	Apoproteína de clorofila CP43 do fotossistema II
87	A0A1D5V1G5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		4565.Traes_2BS_4A E914BE2.1	99	578.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
88	A0A3B6MZT6	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		4565.Traes_5BL_6F B7A4B58.1	99	543.5	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica

89	A0A3B5Y384	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1AL_6E_5BA9C6F.1	100	541.2	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
90	A0A3B6BYP2	Ribulose bífosfato carboxilase de cadeia pequena	4565.Traes_2BS_9A_C399080.1	100	392.5	RBCS	Ribulose bífosfato carboxilase de cadeia pequena
			A0A3B6AR41, A0A3B6C1D6, A0A3B6BYS6, W5C9Y4, A0A3B6BYT1, A0A3B6D693, A0A0U2V4D5, A0A3B6D5P6, A0A3B6ARZ4, A0A3B6ARH0, A0A3B6ASA9, W5F0E6, P26667, A0A3B6ARZ1, Q9FEE4, A0A1D5U6W5, W5BKP3, A0A3B6D5L2, A0A3B6D609, A0A3B6BYN7, A0A3B6BYZ2, A0A341VWF3, P00871, P07398, A0A3B6D605				

91	A0A3B6HUR4	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	A0A096URP1, A0A3B6HYC8	4565.Traes_4DS_C C9F9317E.2	104	551.6	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
92	A0A3B6AWZ1	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		4565.Traes_2AS_A1 8A69CB0.2	92	497.7	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
93	P27665	Proteína 1 intensificadora de evolução de oxigênio, cloroplástica		4565.Traes_2BL_4B 8B77E73.1	95	591.3	PSBO	Proteína 1 intensificadora de evolução de oxigênio, cloroplástica
94	A0A3B6SIU4	Proteína contendo domínio AAA	A0A3B6RQM8, A0A3B6TR29, A0A3B6RQI3, A0A3B6LXU3, A0A3B6N210, A0A3B5Y839, A0A3B5Z5S7, A0A077S0N3, A0A3B6GR77, A0A3B6EHG9, A0A3B6FQQ8, A0A3B6EFL5, A0A3B6GVQ4, A0A3B6A2N9, A0A3B6LXM7, A0A3B6RFT6, A0A3B6TC12,	4577.GRMZM2G08 7598_P01	92	1164.8	FTSH2B	H 2B sensível à temperatura de filamentação

A0A3B6SB83, A0A3B6LXL1, A0A3B6N1S0, A0A3B6N1P6						
95	A0A3B6NVU6	Aspartato aminotransferase	A0A3B6QJQ3, A0A3B6PR35, A0A3B6NWQ3	4565.Traes_6AL_0F_8A39C3D.1	100 846.3	ASP Aspartato aminotransferase
96	A0A3B6H170	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G31_0431_P01	94 1201.4	HSP70 Proteína de choque térmico de 70 kDa
97	A0A3B5Y3L5	Proteína não caracterizada		3702.AT3G12580.1	91 1164.1	HSP70 Provável mediador da subunidade 37c de transcrição de RNA polimerase II
98	A0A3B6LHE6	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G34_0251_P03	95 1165.2	HSP70-3 Proteína 3 de choque térmico de 70 kDa
99	A0A3B6QCK0	Proteína D2 do fotossistema II		4565.EPITAEP0000_0010030	99 719.2	PSBD Proteína D2 do fotossistema II
100	P93594	Beta-amilase		4565.Traes_2DS_D1_4ABD1DB.1	100 1050.4	BMY1 Beta-amilase
101	Q93XQ6	Peptidil-prolil cis-trans isomerase		4565.Traes_6AS_82_E93D872.1	99 363.6	CYP1 Peptidil-prolil cis-trans isomerase
102	A0A3B6N1J5	Proteína contendo domínio G tipo Tr		4577.AC203173.3_F_GP004	95 1587	putativa (provável) proteína da família do fator de alongamento da tradução

103	A0A3B6PE57	Catalase	A0A3B6NJS8, F1DKC1, A0A3B6PHD6, A0A3B6Q9M2, A0A3B6QCB0, A0A3B6NKD6	4565.Traes_6AS_7F B8F9A66.1	99	1036. 9	CAT	Catalase
104	A0A3B6QDG2	Peroxirredoxina	A0A3B6PKF7, A0A3B6NPJ5, A0A3B6RN44, A0A3B6TIG0, A0A3B6SJF8	4577.GRMZM2G03 6921_P01	77	306.6	PRX-5	Peroxirredoxina-5
105	A0A3B6FUA0	Frutose-bisfosfato aldolase		4565.Traes_3B_E65 3839AD1.1	96	672.2	FBA	Frutose-bisfosfato aldolase
106	Q03033	Fator de alongamento 1-alfa	A0A3B6IRY7, A0A1D5UZW7, A0A1D5XDB6, A0A3B6ARY9, A0A3B6MXF1, A0A3B6LU42	4565.Traes_2DS_7C 52E51F8.1	97	872.1	TEF1	Fator de alongamento 1- alfa
107	A0A3B6MJF5	Proteína não caracterizada		4565.Traes_6DS_57 7BE9937.2	91	865.1	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande
108	A0A3B6C6E5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		4565.Traes_2BS_4A E914BE2.1	100	586.3	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica

109	A0A341QMC1	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G04 8907_P01	89	529.6	ATPC2	ATP sintase subunidade gama, cloroplástico
110	P12782	Fosfoglicerato quinase, cloroplástico	A0A3B5ZZM6, A0A3B5Y3H2, A0A3B5Y3W9, A0A3B5ZXV5	100	661.8	PGK1	Fosfoglicerato quinase, cloroplástico
111	A0A3B6KSW8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	4565.Traes_2AL_78 3CF383F.1	73	537	GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
112	A0A3B6RIZ5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1AL_6E 5BA9C6F.1	91	486.5	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
113	A0A3B6N0I8	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5AL_3 AF3E7C87.2	98	538.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
114	A0A3B6PHQ9	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_6DS_6F EF78A19.2	98	533.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
115	W5EDL3	Frutose-bisfosfato aldolase	4565.Traes_4BS_D1 2DBE6D3.1	100	764.2	FBA5	Frutose-bisfosfato aldolase
116	W5FL09	Frutose-bisfosfato aldolase	W5DTC2, W5EDL3, W5G4A2	100	765.8	FBA8	Frutose-bisfosfato aldolase

117	W5AY52	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_2AL_E7 B360A43.1	100	511.5	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
118	A0A3B6DE81	ATP sintase subunidade beta	A0A3B6DPM4, A0A3B5ZUZ8, A0A3B6MKM3, A0A3B5ZRJ0, A0A3B6GYF7, A0A3B6EIN4, A0A3B6FP86, A0A3B5Z4D7, A0A3B5Z3C7, A0A3B5ZSY5, A0A3B6GXY6, A0A3B6FSG4, A0A3B6QGZ5, A0A3B6HSN4, A0A3B6QGC1, A0A3B6MLL4	99	953.7	ATPB	ATP sintase subunidade beta
119	A0A3B6EIN4	ATP sintase subunidade beta	4565.Traes_3B_EC2 EA9E46.1	103	1025.4	ATPB	ATP sintase subunidade beta
120	P12783	Fosfoglicerato quinase, citosólica	4565.Traes_6DS_C DB16CE3F.1	100	764.2	PGK3	Fosfoglicerato quinase, citosólica
121	A0A3B6RQL1	Fosfoglicerato quinase	4565.Traes_6DS_C DB16CE3F.1	89	697.6	PGK3	Fosfoglicerato quinase, citosólica

122	A0A3B6PJG4	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_6BS_57 C707F5F.1	95	525.4	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
123	A0A3B6KSA1	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5AL_3 AF3E7C87.2	100	546.6	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
124	P04784	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1BL_D2 EDF576B.1	97	526.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
125	A0A3B6HV87	ATPase_AAA_prot eina contendo domínio central	4577.GRMZM2G03 6921_P01	77	306.6	PRX-5	Peroxiredoxina-5
126	P80602	2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástico (fragmento)	4565.Traes_2AL_C6 F2FA817.1	98	396	TSA	2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástico
127	A0A3B6LVQ2	Proteína não caracterizada	3702.AT4G02770.1	90	262.3	PSAD-1	Subunidade II-1 do centro de reação do fotossistema I, cloroplástico
128	A0A3B6C505	Proteína contendo domínio de hidroxácido desidrogenase FMN	A0A3B6KNX6, A0A3B6MXQ2, A0A3B6LUD5, A0A3B6CD34, A0A096ULI5,	88	630.6	GOX1	Proteína da família de barril TIM do tipo aldolase

		A0A341Q3A7, A0A341W857, A0A3B6DN81, A0A3B6B565, A0A3B6CD70							
129	A0A3B5Z3Y8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G45 1224_P01	84	219.9	PSAH1	Subunidade VI do centro de reação do fotossistema I, cloroplástico		
130	A0A3B6GV04	NAD (P) Proteína contendo domínio bd dom	4577.GRMZM2G44 9496_P01	66	528.9	PTAC16	Plastídeo de proteína transcricionalmente ativo 16 cloroplástico		
131	A0A3B5ZWB5	Nucleosídeo difosfato quinase	A0A3B5Y072, A0A3B5YXK3	100	307	NDPK	Nucleosídeo difosfato quinase		
132	Q43206	Catalase-1	A0A3B6JMX0, A0A3B6IUU1, A0A3B6JQL2, A0A3B6KQP3	99	1035. 8	CAT1	Catalase-1		
133	A0A3B6KN68	Proteína não caracterizada	A0A3B6KQL0, A0A3B6N0E5, A0A3B6LUE2	72	336.3	GST5	Glutathione transferase		
134	A0A3B6QCL7	Peroxidase	4565.Traes_6AS_5B AD56BB6.1	98	631.3	PER	Peroxidase		

135	A0A3B6MXK8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G01 1129_P01	80	377.5	NBPI	Proteína de ligação a RNA CP31B cloroplástica
-----	------------	----------------------------	----------------------------	----	-------	------	---

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose com nitrogênio (CN), sem nitrogênio (SN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arábida (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA SUPLEMENTAR 5 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Linzi) CV. **CD120** PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS COM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO (CN&SN) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais	relacionadas em grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6EFN6	Proteína contendo domínio grande RuBisCO			4565.EPITAE0000010047	95	213	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande; RuBisCO
2	A0A3B6CD34	Proteína contendo domínio de hidroxiaácido desidrogenase FMN			4577.GRMZM5G853854_P04	89	655.2	GLO1	Peroxisomal (S) -2-hidroxi-ácido oxidase
3	A0A3B6KCB6	Proteína não caracterizada			4565.Traes_5DS_6429161E7.1	99	694.1	ENO	Enolase
4	A0A1D5UV66	Proteína não caracterizada CAMPLR22A2D_LOCUS410			4565.Traes_2AS_C1EA81EC4.2	100	944.1	HSP60 Ligante RuBisCO	subunidade alfa da proteína de ligação à subunidade grande da RuBisCO, cloroplástico
5	A0A3B6NGZ5	Proteína não caracterizada	A0A341WSR4, A0A3B6LMZ2		3702.AT1G68010.2	85	667.2	HPR	Glicerato desidrogenase, peroxisomal;
6	A0A3B6U9K3	Glicosiltransferase			4577.GRMZM2G161335_P01	61	563.5	BX9	DIMBOA UDP-glucosiltransferase *gen:BX9;
7	P08823	subunidade de proteína de ligação à subunidade grande da	A0A3B6U2Z7		4565.Traes_2AS_C1EA81EC4.2	100	944.9	HSP60 Ligante RuBisCO	subunidade alfa da proteína de ligação à subunidade grande da RuBisCO, cloroplástico

RuBisCO, subunidade alfa, cloroplástico (fragmento)									
8	A0A3B6R9W0	Plastocianina	A0A3B6I3R2	4565.Traes_4AL_00 D18D2CC.1	89	236.5	PLAS	Plastocianina	
9	A0A3B6DMK0	Proteína não caracterizada		4565.Traes_4DS_0A_92A2224.1	98	260.4	PSBC	Apoproteína CP43 de clorofila do fotossistema II	
10	A0A3B6LN04	Proteína não caracterizada	A0A3B5ZUY9, W5CZM5	4565.EPITAEP00000 010009	131	113.2	PSAC	Apoproteína dos Centro de ferro-enzofre (FA e FB) do fotossistema I	
11	A0A3B6UD03	Proteína não caracterizada;	A0A3B6MJL1, A0A3B6HU90, A0A3B6ITI8, A0A3B6DRJ7	4565.Traes_1DS_EA_755AC67.2	99	270.4	ATPE	Cadeia épsilon ATP sintase, cloroplástica	
12	A0A3B6GV04	Proteína contendo domínio de ligação de NAD(P)		4577.GRMZM2G44 9496_P01	66	528.9	PTAC1 6	proteína transcricionalmente ativa de plastídio 16, cloroplástico	
13	A0A3B6MNV5	Nucleosídeo difosfato quinase		4565.Traes_5DS_92_2F3F6EA.1	98	416.8	NDPK	Nucleosídeo difosfato quinase	
14	Q43206	Catalase-1	A0A3B6JMX0, A0A3B6IUU1, A0A3B6JQL2, A0A3B6KQP3	4565.Traes_4DL_4F_C0D4B27.1	99	1035.8	CAT1	Catalase-1	

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CDI20, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose com nitrogênio (CN) e sem nitrogênio (SN) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco de trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arábido (popsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA SUPLEMENTAR 6 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD120** PRESENTES NA INTERSECÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS SEM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (**SN&SNI**) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

Item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais relacionados em grupo de máxima parcimônia	ID STRING	Identidade (%)	bitscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6NT53	Proteína não caracterizada		4565.Traes_6AL_150 E13EA1.1	100	761.9	ANT-G2	proteína-2 transportadora de ADP / ATP mitocondrial
2	A0A3B6FNR1	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G123 558_P02	83	198.7	PCAP1	Proteína-1 de ligação cátion associada à membrana plasmática (proteína DREPP4) Proteína não caracterizada
3	A0A3B6EFP8	Proteína não caracterizada	A0A3B6FNR1, A0A3B6GTT8, A0A3B6FN46	4577.GRMZM2G123 558_P02	85	209.1	PCAP1	Proteína-1 de ligação cátion associada à membrana plasmática (proteína DREPP4) Proteína não caracterizada
4	Q41630	Proteína transportadora ADP / ATP 2, ANT-G2 mitocondrial		4565.Traes_6AL_150 E13EA1.1	98	644.8	ANT-G2	proteína-2 transportadora de ADP / ATP mitocondrial

5	A0A3B6D5X5	Proteína semelhante a germin	3702.AT5G20630.1	60	220.3	GER3	proteína semelhante a germin, membro 3, Subfamília 3
---	------------	------------------------------	------------------	----	-------	------	--

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose sem nitrogênio (SN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA SUPLEMENTAR 7 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD120** PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS COM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (**CN&SNI**) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT adicionais relacionados em grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/proteína	Descrição STRING
1	A0A3B6RC85	Proteína contendo o domínio Transket pyr		4577.GRMZM2G03 3208_P01	89	683.3	TKT	Transcetolase cloroplástica
2	A0A3B6EB15	Cisteína sintase		4565.Traes_3AS_A3 FC93C65.2	100	587.8	CYS	Cisteína sintase
3	A0A3B5Z3H2	Proteína não caracterizada		4565.EPITAEPP00000 010058	97	341.7	ATPA	Subunidade alfa da ATP sintase, cloroplástica
4	A0A3B6MLL4	Proteína contendo domínio ATP-synt_ab_N		4565.Traes_5DL_30 57DE7CD.1	88	200.3	ATPB	ATP sintase subunidade beta
5	A0A3B6KQR8	Malato desidrogenase	A0A3B6MY99, A0A3B6LSL8, A0A3B6KMJ6, A0A3B6LTW4, A0A341V0H6	4565.Traes_5BL_8A 99D83A5.1	99	685.3	MDH	Malato desidrogenase
6	P38076	Cisteína sintase CYS1		4565.Traes_5BS_1A C8D3009.2	98	620.5	CYS1	Cisteína sintase
7	A0A3B6PLX2	Proteína contendo domínio UVR		3702.AT5G50920.1	89	1509.2	CLPC1	Proteína chaperona ClpC1, cloroplastica
8	A0A3B5XZJ7	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM5G88 8696_P02	82	861.3	TIC110	Proteína TIC110 cloroplástica

9	A0A3B6N1J5	Proteína contendo domínio G tipo Tr	3702.AT1G56070.1	91	1526.5	LOS1	Proteína ribossomal S5 / proteína da família do fator de alongamento G / III / V;	
10	A0A3B5YVW2	Proteína não caracterizada	A0A3B5ZT18, A0A3B5XZJ7, A0A3B5YVW4, A0A3B5YX09, A0A3B5ZUP0, A0A3B5XYP5, A0A3B5XXYQ5, A0A3B5ZTJ6	4577.GRMZM5G88 8696_P02	82	864.4	TIC	Proteína TIC110 cloroplástica
11	A0A3B6MN25	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G00 1500_P02	94	1151.3	HSP70-6	Choque térmico 70 kDa proteína 6 cloroplástica;	

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose com nitrogênio (CN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

TABELA SUPLEMENTAR 8 - RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* var. Lini) CV. **CD120** PRESENTES NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS DO CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS COM NITROGÊNIO, SEM NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (CN&SN&SNI) E RESPECTIVAS ANOTAÇÕES PROPOSTAS NO STRING V. 11.0.

item	ID UNIPROT	Descrição UNIPROT	ID UNIPROT	adicionais relacionadas em grupo de máxima parcimônia	ID STRING	identidade (%)	bitscore	nome do gene/ proteína	Descrição STRING
1	A0A3B5Z298	Fosfoglicerato quinase			4565.Traes_1AL_7C 91EF27D.1	99	656.8	PGK1	Fosfoglicerato quinase, cloroplástico
2	A0A3B5ZSY5	Proteína não caracterizada			4565.Traes_5DL_30 57DE7CD.1	90	410.6	ATPB	ATP sintase subunidade beta
3	A0A3B6GXH5	Proteína contendo domínio ATP-synt_ab			4565.Traes_3B_0CB 962B6E.1	80	237.7	ATPB	ATP sintase subunidade beta
4	A0A3B5Z3C7	ATP sintase subunidade beta			4565.Traes_3DL_C B9CA6DF6.1	97	734.9	ATPB	ATP sintase subunidade beta
5	P26667	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia pequena PW9, cloroplástico			4565.Traes_2AS_C3 EF3A27F.1	98	358.2	RBCS	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia pequena PW9, cloroplástico

6	P07398	Ribulose bifosfato carboxilase clone de cadeia pequena 512 (Fragmento)	4565.Traes_5BL_8E 1A52A4F.1	99	246.5	RBCS	Clone 512 de cadeia pequena de ribulose bifosfato carboxilase
7	A0A3B6TJG2	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4577.GRMZM2G10 4549_P01	89	477.6	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
8	A0A3B5ZZX3	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1AL_0F 39673AF1.3	98	534.6	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
9	W5F8Z5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4577.GRMZM2G41 4192_P01	91	496.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
10	A0A3B6B1C5	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	4565.Traes_2AL_78 3CF383F.1	98	780.4	GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
11	A0A3B6GWA0	Anidrase carbônica	4565.Traes_7DL_B2 28E9EA8.2	87	371.3	CA	Anidrase carbônica
12	A0A3B6DER7	Proteína contendo domínio de tiorredoxina	4565.Traes_2AL_C6 F2FA817.1	99	421.4	TSA	2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástico
13	A0A3B6DCU3	Proteína intensificadora de evolução de oxigênio	4565.Traes_2BL_4B 8B77E73.1	93	572	PSBO	Proteína 1 intensificadora de evolução de oxigênio, cloroplástica

14	A0A3B6HWM 5	Proteína contendo domínio ATPase AAA	A0A3B6JJ08, A0A3B6IPQ4, A0A3B6JFQ9, A0A3B6JHF0, A0A3B6JFS0, A0A3B6JII7, A0A3B6HTM6, A0A3B6JJ03, A0A3B6JHE4, A0A3B6H XK4, A0A3B6JGP2, A0A3B6JIJ3, A0A3B6IN76, A0A3B6JGN7, A0A3B6IS66, A0A3B6IPQ9	4577.GRMZM2G16 2200_P01	84	734.9	RCAI	Ribulose biscofosfato carboxilase / oxigenase ativase, cloroplástico
15	A0A3B6MZ92	Proteína contendo domínio Apocytochr_F_N	A0A3B6KTQ4, A0A3B6GML8, A0A3B6PNM2, A0A3B5ZSX6, A0A3B5XX63	4565.Traes_6AS_58 B52A630.1	99	620.2	PETA	Apocitocromo f
16	A0A3B6U4U3	Proteína contendo domínio Transket_pyr		4577.GRMZM2G03 3208_P01	90	1191. 4	TKL	Transcetolase, cloroplástica
17	A0A3B6PLM0	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	W5GFA4	4565.Traes_6DS_8D 580A93D.2	100	545	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica

18	A0A3B6RQI3	Proteína contendo domínio AAA	4530.OS06T066940 0-01	94	840.1	FTSH2	Metaloprotease de zinco dependente de ATP FTSH 2, cloroplástico	
19	A0A3B6RQM8	Proteína contendo domínio AAA	4577.GRMZM2G08 7598_P01	94	839.3	FTSH2B	H 2B sensível à temperatura de filamentação	
20	A0A3B6KBT8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G08 7598_P01	92	1164. 1	FTSH2B	H 2B sensível à temperatura de filamentação	
21	A0A3B6C5R9	ATP sintase subunidade alfa	4577.GRMZM2G16 5747_P01	92	1404. 8	1002861 53	5- metiltetrahidropteroilriglutamato-homocisteína metiltransferase	
22	A0A3B6MT65	Citocromo b559 subunidade alfa	A0A077RQZ4, A0A3B6AX34, A0A3B6C2P4, A0A3B6GPS3, A0A3B6AX67, A0A3B6NjX8, A0A3B6GW78, A0A3B5XYE0, A0A3B6DC04, A0A3B6STH9, A0A3B5ZTR9, A0A3B6U9I3, A0A3B6FFC2, A0A3B6N3S0, A0A3B6HUK0,	4565.Traes_5DL_B8 88E7A8A.1	100	170.2	PSBE	Citocromo b559 subunidade alfa

A0A3B6C5V8, A0A3B6RJU8, A0A3B6JFW4, A0A3B6HU36, A0A3B6GT78, A0A3B6QMH7, A0A3B6DLF5, A0A3B6PLW3, A0A3B6KRG7								
23	A0A3B6RH69	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	A0A341YEW4	4577.GRMZM2G09 2311_P02	91	462.2	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
24	A0A3B6GPT0	Proteína do centro de reação do fotossistema II CP47	A0A3B6PF56, A0A3B6MRQ9, A0A3B6N385, A0A3B6EGN0	4565.EPITAEP0000 0010015	79	737.6	PSBB	Proteína do centro de reação do fotossistema II CP47
25	A0A3B6LR33	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G00 2807_P01	88	506.9	TIM	Triosefosfato isomerase
26	A0A3B6ER11	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G07 7333_P01	91	350.1	PSBS	Proteína fotossistema II de 22 kDa
27	A0A3B6LWV1	Proteína não caracterizada		3702.AT4G28750.1	81	121.7	PSAE-1	Subunidade IV A do centro de reação do

		fotossistema I, cloroplástico				
28	A0A3B6B5K3	Aminometiltransferase	4565.Traes_2BL_27 68AE3B1.1	99	721.1	GcvT family Aminometiltransferase
29	A0A3B5Y1D3	TPM - proteína contendo domínio de fosfatase	4577.GRMZM2G02 5882_P01	90	359.8	1002853 98 Domínio da hélice beta do tipo metanol desidrogenase
30	A0A3B5XXYX6	Proteína não caracterizada	A0A3B6KDW0, A0A3B5XT63, A0A3B6KFD9, A0A3B6HZ58, A0A1D6DJ20, A0A1D5X5C6, Q5EWZ1, W5AH12, W5FAY5, A0A3B6MME4, A0A3B6IMZ8, A0A3B6HWJ7, A0A3B6JG31, A0A3B6INX9, A0A3B6I0K7, A0A3B6HZM6, W5EE00, A0A3B6H2B3, A0A3B6FX66, A0A3B6GXG2,	99	713	ACT2 Actina-2

W5CSL3, A0A3B6H1W2, W5AFW9, A0A3B6EMQ5, A0A3B6U5K5									
31	Q93W25	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	Q93XQ6	4577.GRMZM2G32 6111_P01	87	319.3	CYP	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	
32	A0A3B6RB72	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G08 3716_P01	92	1030	CNP60B	Chaperonina 60 subunidade beta 2 cloroplástica	
33	A0A3B5Y072	Nucleosídeo difosfato quinase		4565.Traes_1AL_6F 2E87864.2	100	305.1	NDK	Nucleosídeo difosfato quinase	
34	A0A3B5ZT69	Proteína não caracterizada	A0A3B6CD48	4565.EPITAEP0000 0010048	98	1523.8	PSAB	Clorofila a apoproteína A2 do fotossistema I P700	
35	A0A3B6SHQ4	Proteína contendo domínio Aminotran_5		4577.GRMZM2G13 7868_P01	86	708.4	AGT	Serina - glioxilato aminotransferase	
36	Q7X9A6	Subunidade de ferro-enxofre complexo do citocromo b6-f, cloroplástico	A0A3B6AV65, A0A3B6C6F4	4565.Traes_2AS_14 75F8BDB.1	94	434.9	PETC	Subunidade do complexo ferro-enxofre do citocromo b6-f, cloroplástico	
37	A0A3B6CEH1	Glutamina Sintetase		4565.Traes_2BL_34 2BDEA35.2	99	867.8	GS2	Glutamina Sintetase	

38	A0A0C4BJE5	Serina hidroximetiltransferase	4565.Traes_4AL_24 F8F34EE.1	100	1009.6	SHM	Serina hidroximetiltransferase
39	A0A3B6EL51	Proteína P do sistema de clivagem de glicina	4565.Traes_3DL_A 6F32E158.1	100	948.3	Traes_3 DL_A6F 32E158. 1	Proteína P do sistema de clivagem de glicina
40	A0A3B6PUD8	Proteína não caracterizada	3702.AT1G79040.1	62	147.5	PSBR	Codifica para a subunidade PsbR de 10 kDa do fotossistema II (PSII)
41	A0A3B5ZT76	Proteína D1 do fotossistema II	4565.EPITAEP0000 0010044	98	706.1	PSAB	Proteína D1 do fotossistema II
42	A0A3B6TQD5	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G11 6258_P01	90	844.7	1001934 82	Proteína da família de glutamato-1-semialdeído putativo 2,1- aminomutase
43	Q8LRM8	Homólogo de proteína tumoral controlada pela tradução	4565.Traes_4DS_A FAF2A29E.1	100	343.6	TCTP	Homólogo de proteína tumoral controlada pela tradução
44	A0A3B6RL68	Proteína não caracterizada	3702.AT3G48420.1	83	401.7	HAD família	Proteína da superfamília da haloácido

							desalogenase-hidrolase (HAD)
45	A0A3B6FN83	Proteína não caracterizada	4565.Traes_6DS_57 7BE9937.2	99	886.7	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande
46	A0A3B6DPM4	ATP sintase subunidade beta	4565.Traes_4DS_A CF7656A2.1	94	885.9	ATPB	ATP sintase subunidade beta
47	A0A3B6FK11	ATP sintase subunidade beta	4565.Traes_3B_OCB 962B6E.1	98	797.3	ATPB	ATP sintase subunidade beta
48	A0A3B6JMT4	Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase	A0A3B6IY26, A0A3B6KSW8 3CF383F.1	73	537.3	GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
49	A0A1D5TTT2	Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase	4565.Traes_2BL_5D 64E8C87.1	98	780.8	GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

50	A0A3B6TID0	Proteína contendo o domínio TRANSKETOLAS E_1	A0A3B6R8Q3, A0A3B6U010, A0A3B6RC85, A0A3B6ARC4, A0A1D5UVU1, A0A3B6BZB5	4577.GRMZM2G03 3208_P01	90	1189. 5	TKL	Transcetolase, cloroplástica
51	A0A3B5ZUZ3	ATP sintase subunidade alfa	A0A3B6MZX9, A0A3B6SN12, A0A3B6MZL5, A0A3B6MJC8, A0A3B5ZVC1, A0A3B6NPL2, A0A3B6B8G2, A0A3B6SL57, A0A3B6C5R9, A0A3B5ZP87, A0A3B6UCR2, A0A3B6K9K7, A0A3B6RD12, A0A3B6LT32, A0A3B6FZW8, A0A3B5ZTE0, A0A3B5ZTN1, A0A3B6UBH6, A0A3B5Z3I4, A0A3B6DBJ7, A0A3B6FR48, A0A3B6GRV2, A0A3B5Z561,	4565.EPITAEP0000 0010058	97	912.1	ATPA	ATP sintase subunidade alfa, cloroplástico

A0A3B5ZTR5, A0A3B6MLJ4, A0A3B6R9D6, A0A3B6U9A5, A0A3B5Z2X0, A0A3B6KGV7, D8IVM4, A0A3B6D6H2, A0A3B6IRN0, A0A3B5XXM2, A0A3B6EM40, A0A3B5Z1T9, A0A3B6MLV7, A0A3B6JFE0, A0A3B6ING1							
52	A0A3B6MJC8	ATP sintase subunidade alfa	4565.EPITAEP0000 0010058	98	719.9	ATPA	ATP sintase subunidade alfa, cloroplástico
53	A0A3B6NV28	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G05 6039_P01	90	1088. 6	HSP70	Proteína de choque térmico 70
54	A0A3B6C475	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G02 1617_P01	71	280.8	OEC2	Proteína intensificadora de evolução de oxigênio 3-1, cloroplástica

55	A0A3B5ZTS4	Proteína não caracterizada	4565.EPITAEP0000 0010015	74	529.3	PSBB	Proteína do centro de reação do fotossistema II CP47
56	A0A3B5Z4J5	Proteína não caracterizada	4565.EPITAEP0000 0010028	93	328.9	ATPF	ATP sintase subunidade b, cloroplástico
57	A0A3B6JCT8	Proteína não caracterizada	A0A3B6TE20, A0A3B6U324, A0A3B6MIB6, A0A3B6U975, A0A3B6UCS8, A0A3B6LGE1, A0A3B5ZTQ9, A0A3B6N0B7, A0A3B6CFG4, A0A3B6N0C4, A0A3B6MKT4, A0A3B6JJU7	91	324.3	ATPF	ATP sintase subunidade b, cloroplástico
58	A0A3B6GYS7	Proteína não caracterizada	W5D4R0	91	346.3	PSBS	Proteína fotossistema II de 22 kDa
59	A0A3B6C702	Proteína contendo domínio de tiorredoxina	4565.Traes_2AL_C6 F2FA817.1	104	466.5	TSA	2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástico

60	A0A3B5Z2Y2	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1AL_0F_39673AF1.3	98	532.7	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
61	Q00434	Proteína intensificadora de evolução de oxigênio 2, OS cloroplástico = <i>Triticum aestivum</i>	4565.Traes_2AL_0_A039E562.1	99	487.3	PSBP	Proteína 2 intensificadora de evolução de oxigênio, cloroplástica
62	A0A3B6TQT6	Proteína não caracterizada	3702.AT1G78900.2	91	1019.2	VHA-A	Codifica a subunidade A catalítica da ATP sintase vacuolar
63	A0A3B6PNI9	Fator de alongamento Tu	4565.Traes_6DL_1B_9FBE0921.1	100	751.9	TUFA	Fator de alongamento Tu
64	A0A3B6EG02	RuBisCO_large proteína contendo domínio	4565.EPITAEP0000_0010047	93	297.4	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande
65	A0A3B6MSB3	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5DL_C5_1E9ECBB.1	100	503.8	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
66	W5FIZ2	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4577.GRMZM2G16_0268_P02	84	433.3	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica

67	A0A3B6MXE7	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G01 7290_P01	90	346.3	1002820 27	Subunidade III do centro de reação do fotossistema I
68	A0A3B6QMM8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G17 4984_P01	66	143.3	PSB3	Polipéptido fotossistema II de 10 kDa
69	Q5S1S6	Peroxirredoxina Q, cloroplástico OS = Triticum aestivum	4565.Traes_7DS_A9 BD8001C.1	95	413.3	PRX1	Peroxirredoxina Q, cloroplástico
70	A0A3B6TBB9	Ferredoxina - NADP redutase, cloroplástico	A0A3B6R6V9, A0A3B6I733, A0A3B6PG71, A0A3B6NH85, A0A3B6Q8P5	81	559.7	L-FNRJII	Ferredoxina - NADP redutase
71	P46285	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, cloroplástica	4565.Traes_3B_71D AC7F5D.1	100	577.8	S17P	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, cloroplástica
72	A0A3B6NKJ7	Peroxidase	4565.Traes_6AS_5B AD56BB6.1	100	646.4	PER	Peroxidase
73	P26302	Fosforibulocinase, cloroplástico	4565.Traes_6DL_22 C536081.1	100	823.5	PRK	Fosforibulocinase, cloroplástico
74	A0A3B6RSZ0	Proteína contendo domínio AAA	A0A3B6SLL5, A0A3B6TSM7	93	1109. 7	FTSH5	Metaloprotease de zinco dependente de ATP FTSH 5 cloroplástico

75	A0A1D5RS51	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5BL_6F B7A4B58.1	95	526.2	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
76	A0A3B6MXH4	Proteína não caracterizada	A0A3B5ZUM8, A0A3B6EG02, A0A3B6G072, A0A3B6EFN6, A0A3B6NTI7, A0A3B6B5E0	98	980.7	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande
77	A0A3B5ZUZ8	ATP sintase subunidade beta	4565.Traes_3AS_C0 6F3EFD5.1	93	639	ATPB	ATP sintase subunidade beta
78	A0A3B6I733	Ferredoxina - NADP redutase, cloroplástico	4565.Traes_4AL_B9 FA07247.2	100	525.4	FNR	Ferredoxina - NADP redutase
79	A0A3B6ASL5	Proteína contendo o domínio glutamina amidotransferase tipo 2	A0A3B6C1F7, A0A3B6AU09, A0A2X0S1W6	95	2360.5	FGS1	Glutamato sintase dependente de ferredoxina, cloroplástico
80	A0A3B6KNX6	Proteína contendo domínio de hidroxíácido desidrogenase FMN	3702.AT3G14415.2	83	610.1	GOX2	Proteína da família de barril TIM do tipo aldolase
81	A0A3B6NM91	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_6AS_F8 D06BEC8.2	96	526.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica

82	A0A3B6TGT6	Proteína contendo domínio CAAD	4577.GRMZM2G04 7720_P01	83	236.9		Endopeptidase de treonina
83	A0A1D5V1G5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástico	4565.Traes_2BS_4A E914BE2.1	99	578.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
84	A0A3B6MZT6	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5BL_6F B7A4B58.1	99	543.5	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
85	A0A3B5Y384	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_1AL_6E 5BA9C6F.1	100	541.2	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
86	A0A3B6BYP2	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia pequena	A0A3B6AR41, A0A3B6C1D6, A0A3B6BYS6, W5C9Y4, A0A3B6BYT1, A0A3B6D693, A0A0U2V4D5, A0A3B6D5P6, A0A3B6ARZ4, A0A3B6ARH0, A0A3B6ASA9, W5F0E6, P26667, A0A3B6ARZ1, Q9FEE4, A0A1D5U6W5, W5BKP3,	100	392.5	RBCS	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia pequena

A0A3B6D5L2, A0A3B6D609, A0A3B6BYN7, A0A3B6BYZ2, A0A341VWF3, P00871, P07398, A0A3B6D605									
87	A0A3B6HUUR4	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	A0A096URP1, A0A3B6HYC8	4565.Traes_4DS_C C9F9317E.2	104	551.6	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	
88	A0A3B6AWZ1	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		4565.Traes_2AS_A1 8A69CB0.2	92	497.7	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	
89	P27665	Proteína 1 intensificadora de evolução de oxigênio		4565.Traes_2BL_4B 8B77E73.1	95	591.3	PSBO	Proteína 1 intensificadora de evolução de oxigênio, cloroplástica	
90	A0A3B6SIU4	Proteína contendo domínio AAA	A0A3B6RQM8, A0A3B6TR29, A0A3B6RQI3, A0A3B6LXU3, A0A3B6N210, A0A3B5Y839, A0A3B5Z5S7, A0A077S0N3, A0A3B6GR77, A0A3B6EHG9, A0A3B6FQQ8,	4577.GRMZM2G08 7598_P01	92	1164. 8	FTSH2B	H 2B sensível à temperatura de filamentação	

A0A3B6EFL5, A0A3B6GVQ4, A0A3B6A2N9, A0A3B6LXM7, A0A3B6RFT6, A0A3B6TC12, A0A3B6SB83, A0A3B6LXL1, A0A3B6N1S0, A0A3B6N1P6									
91	A0A3B6NVU6	Aspartato aminotransferase	A0A3B6QJQ3, A0A3B6PR35, A0A3B6NWWQ3	4565.Traes_6AL_0F 8A39C3D.1	100	846.3	ASP	Aspartato aminotransferase	
92	A0A3B6H170	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G31 0431_P01	94	1201. 4	HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kDa	
93	A0A3B5Y3L5	Proteína não caracterizada		3702.AT3G12580.1	91	1164. 1	HSP70	Provável mediador da subunidade 37c de transcrição de RNA polimerase II	

94	A0A3B6LHE6	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G34_0251_P03	95	1165.2	HSP70-3	Proteína 3 de choque térmico de 70 kDa
95	A0A3B6QCK0	Proteína D2 do fotossistema II	4565.EPITAEP0000_0010030	99	719.2	PSBD	Proteína D2 do fotossistema II
96	Q93XQ6	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	4577.GRMZM2G32_6111_P01	86	318.2	CYP	Peptidil-prolil cis-trans isomerase
97	A0A3B5YYN5	Proteína contendo domínio TPM_phosphatase	A0A3B5Y1D3_4577.GRMZM2G02_5882_P01	86	400.2		Domínio da hélice beta do tipo metanol desidrogenase
98	A0A3B6D6H2	ATP sintase subunidade alfa	4565.EPITAEP0000_0010092	96	852.8	ATP1	ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial
99	A0A3B6RIX9	Proteína não caracterizada	A0A3B6KNQ2, A0A3B6MXK8, A0A3B6TEQ7, A0A3B6SCW3_4577.GRMZM2G15_8462_P01	73	368.2	CP31B	Proteína de ligação a RNA CP31B cloroplástica
100	A0A3B6FUA0	Frutose-bisfosfato aldolase	4565.Traes_3B_E65_3839AD1.1	96	672.2	FBA	Frutose-bisfosfato aldolase

101	Q03033	Fator de alongamento 1-alfa	A0A3B6IRY7, A0A1D5UZW7, A0A1D5XDB6, A0A3B6ARY9, A0A3B6MXF1, A0A3B6LU42	4565.Traes_2AS_B D2A53CC41.1	97	872.1	TEF1	Fator de alongamento 1-alfa
102	A0A3B6IS95	Proteína não caracterizada	A0A3B6HQB1, A0A3B6JL9	4577.GRMZM5G82 5759_P01	136	110.5	ATPB	Cadeia ATP sintase B
103	A0A3B6MJF5	Proteína não caracterizada		4565.Traes_6DS_57 7BE9937.2	91	865.1	RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande
104	A0A3B6C6E5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		4565.Traes_2BS_4A E914BE2.1	100	586.3	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
105	A0A341QMC1	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G04 8907_P01	89	529.6	ATPC2	ATP sintase subunidade gama, cloroplástico
106	A0A3B5ZNM9	Peptidil-prolil cis-trans isomerase		4565.Traes_IDS_4F C8BB7AD.1	97	372.1	CYP20-1	Peptidil-prolil cis-trans isomerase
107	A0A3B6LUL8	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G30 8687_P01	73	340.1	GST5	Glutathione transferase
108	P12782	Fosfoglicerato quinase, cloroplástico	A0A3B5ZZM6, A0A3B5Y3H2, A0A3B5Y3W9, A0A3B5ZXV5	4565.Traes_1AL_7C 91EF27D.1	100	661.8	PGK	Fosfoglicerato quinase, cloroplástico

109	A0A3B6KSW8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	4565.Traes_2AL_78_3CF383F.1	73	537	GAP	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
110	A0A3B6RIZ5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4577.GRMZM2G10_4549_P01	89	478.8	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
111	A0A3B6N0I8	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5AL_3_AF3E7C87.2	98	538.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
112	A0A3B6PHQ9	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_6DS_6F_EF78A19.2	98	533.9	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
113	W5EDL3	Frutose-bisfosfato aldolase	4577.GRMZM2G04_6284_P01	93	711.8	FBA	Frutose-bisfosfato aldolase
114	W5FL09	Frutose-bisfosfato aldolase	4577.GRMZM2G04_6284_P01 W5DTC2, W5EDL3, W5G4A2	91	705.7	FBA	Frutose-bisfosfato aldolase
115	W5AY52	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástico	4577.GRMZM2G03_9996_P01	88	456.1	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
116	A0A3B6DE81	ATP sintase subunidade beta	A0A3B6DPM4, A0A3B5ZUZ8, A0A3B6MKM3, A0A3B5ZRJ0, A0A3B6GYF7, A0A3B6EIN4,	99	953.7	ATPB	ATP sintase subunidade beta

121	A0A3B6KSA1	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	4565.Traes_5AL_3 AF3E7C87.2	100	546.6	LHCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
122	P04784	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástico	4565.Traes_1BL_D2 EDF576B.1	97	526.9	LBCB	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica
123	A0A3B6HV87	ATPase_AAA_prot eina contendo domínio central	4577.GRMZM2G16 2200_P01	84	739.6	RCA1	Ribulose biscofosfato carboxilase / oxigenase ativase, cloroplástico
124	P80602	2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástico (Fragmento)	A0A0C4BJ55, A0A3B6B0I4, A0A3B6DER7	98	396	TSA	2-Cys peroxiredoxina BAS1, cloroplástico
125	A0A3B6GQZ6	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G03 0784_P02	89	451.8	TIM	Triosefosfato isomerase, citosólico
126	A0A3B6LVQ2	Proteína não caracterizada	3702.AT4G02770.1	90	262.3	PSAD-1	Centros de reação do fotossistema I
127	A0A3B6RJK8	Frutose-bisfosfato aldolase	A0A3B6SGH3, A0A3B6RIU4, A0A3B6GZP8, W5D0E3, A0A1D5WIS4, A0A1D5VDI1, A0A2P1E8S5,	82	581.3	FBA5	Frutose-bisfosfato aldolase 5, citosólica

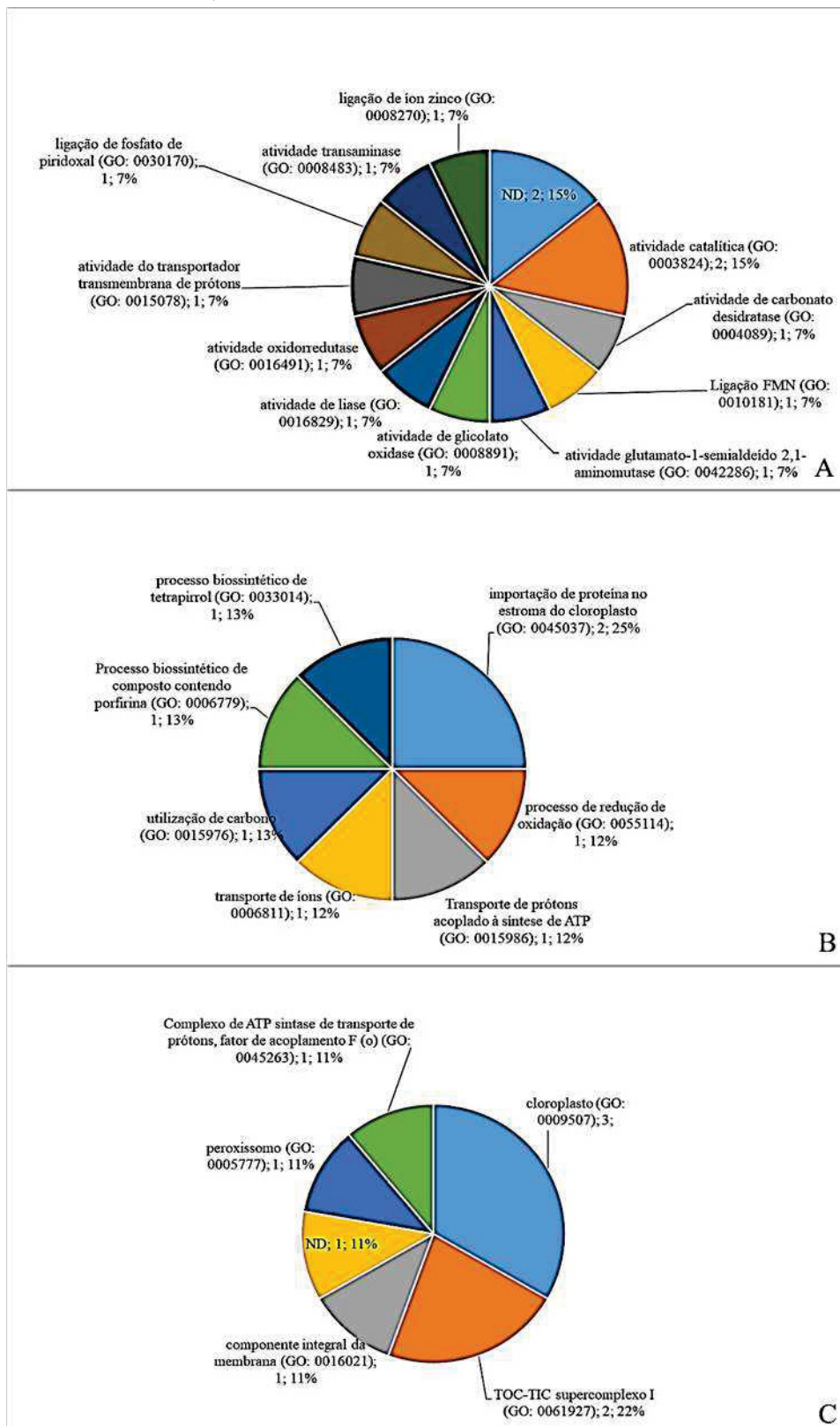
A0A1D5VEI3, A0A1D5WMF1								
128	A0A3B6C505	Proteína contendo domínio de hidroxíácido desidrogenase FMN	A0A3B6KNX6, A0A3B6MXQ2, A0A3B6LUD5, A0A3B6CD34, A0A096ULI5, A0A341Q3A7, A0A341W857, A0A3B6DN81, A0A3B6B565, A0A3B6CD70	3702.AT3G14420.1	88	630.6	GOX1	Proteína da família de barril TIM do tipo aldolase
129	A0A3B5Z3Y8	Proteína não caracterizada		4577.GRMZM2G45 1224_P01	84	219.9	PSAH1	Subunidade VI do centro de reação do fotossistema I, cloroplástico
130	Q9ZRB7	Cadeia alfa da tubulina		4565.Traes_1AL_0C 964B45F.1	100	917.5	TUBA	Cadeia alfa da tubulina
131	A0A3B5ZWB5	Nucleosídeo difosfato quinase	A0A3B5Y072, A0A3B5YXK3	4565.Traes_1DL_8B 2DB7951.1	100	307	NDK	Nucleosídeo difosfato quinase
132	A0A3B5ZUY9	Proteína não caracterizada		4565.EPITAEPP0000 0010009	132	120.6	PSAC	Centro de ferro-enzima do fotossistema I
133	A0A3B6C222	Proteína contendo domínio de fibrilina PAP		4577.GRMZM2G01 5285_P01	86	362.5	HrBP1	Proteína de ligação a Harpina 1

134	A0A3B6LGE1	Proteína não caracterizada	3702.AT2G28190.1	90	239.6	CSD2	Superóxido dismutase [Cu-Zn] 2, cloroplástico
135	A0A3B6RFFK1	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	A0A3B6TK25, O24400, Q96123 0-01	88	346.7	SODCP	Superóxido dismutase [Cu-Zn], cloroplástico
136	A0A3B6KN68	Proteína não caracterizada	A0A3B6KQL0, A0A3B6N0E5, A0A3B6LUE2	72	336.3	GST5	Glutathione transferase
137	A0A3B6QCL7	Peroxidase	4565.Traes_6AS_5B AD56BB6.1	98	631.3	PER	Peroxidase
138	A0A3B6MXK8	Proteína não caracterizada	4577.GRMZM2G01 1129_P01	80	377.5	NBP1	Proteína de ligação a RNA CP31B cloroplástica
139	A0A3B6CFK1	Aminometiltransferase	4565.Traes_2BL_27 68AE3B1.1	100	725.7	GcvT family	Aminometiltransferase

FONTE: o Autor (2020). Proteínas identificadas em folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CDI20, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose com nitrogênio (CN), sem nitrogênio (SN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI) mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Relação de proteínas obtida com o auxílio do software PatternLab (v.4.1.1.18), sendo consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4. ID UNIPROT relativas ao banco de dados de trigo (*Triticum aestivum* – 4565). ID STRING: prefixos 4565, 4577 e 3702 relativos às identidades de banco trigo (*T. aestivum*), milho (*Zea mays*) e arábido (*Arabidopsis thaliana*), respectivamente.

9 FIGURAS SUPLEMENTARES

FIGURA SUPLEMENTAR 1 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD104**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS **CN&SN**, A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



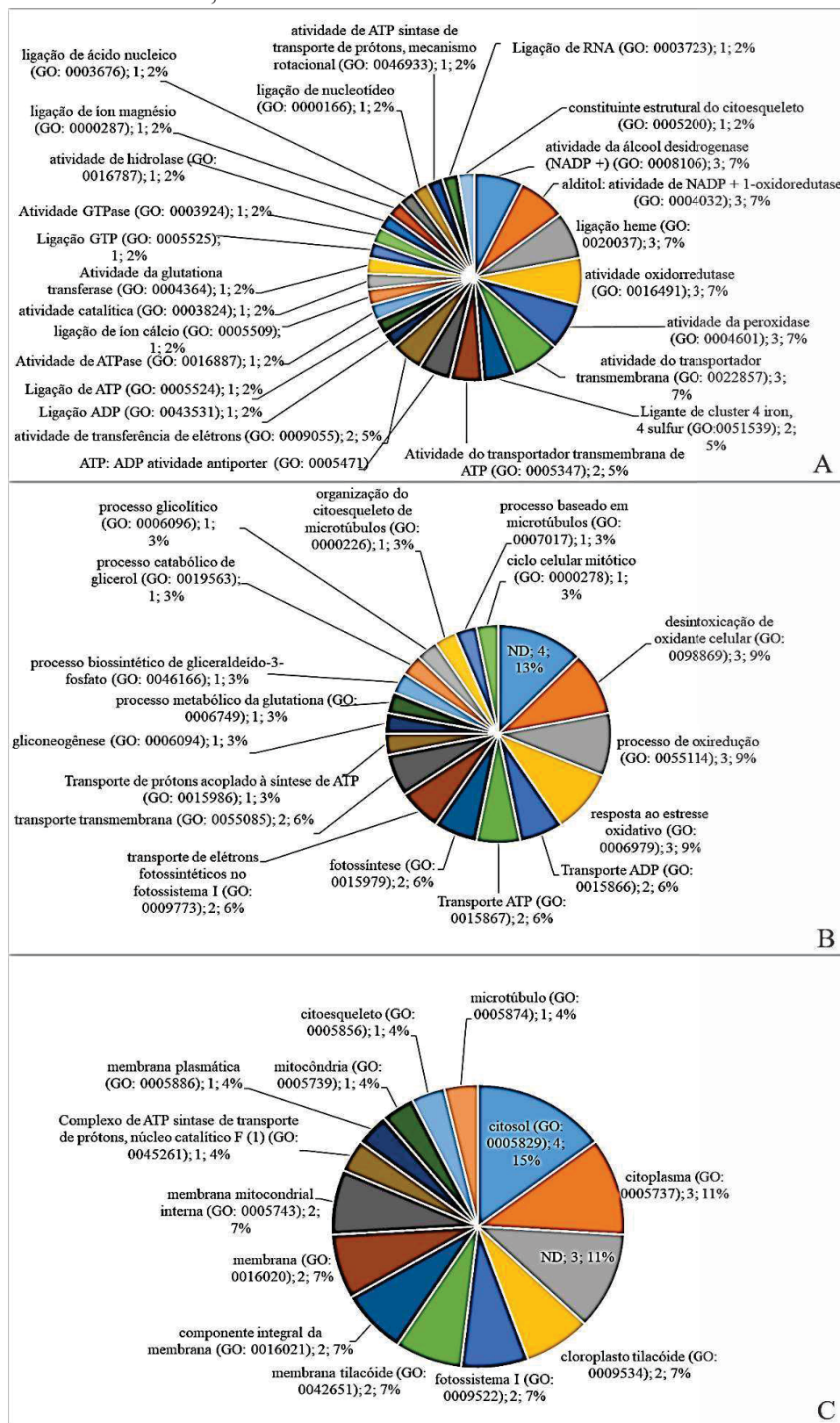
FONTE: o Autor (2020).

Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO).

O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados da plataforma Pantherdb. ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

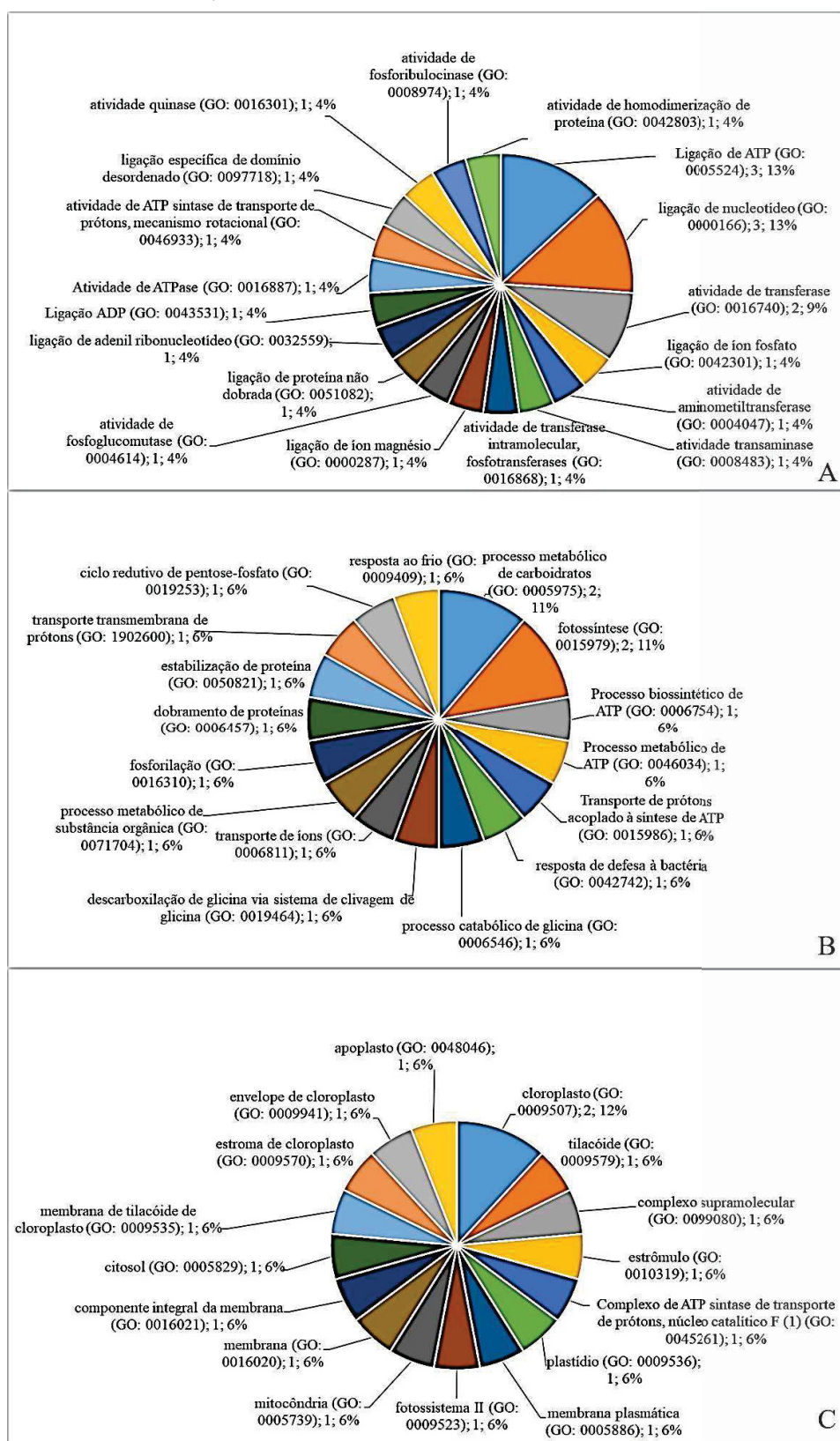
Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com nitrogênio (CN) e sem nitrogênio (SN), mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

FIGURA SUPLEMENTAR 2 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD104**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS **SN&SNI**, A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor (2020). Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO). O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados da plataforma Pantherdb. ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC. Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, sem nitrogênio (SN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

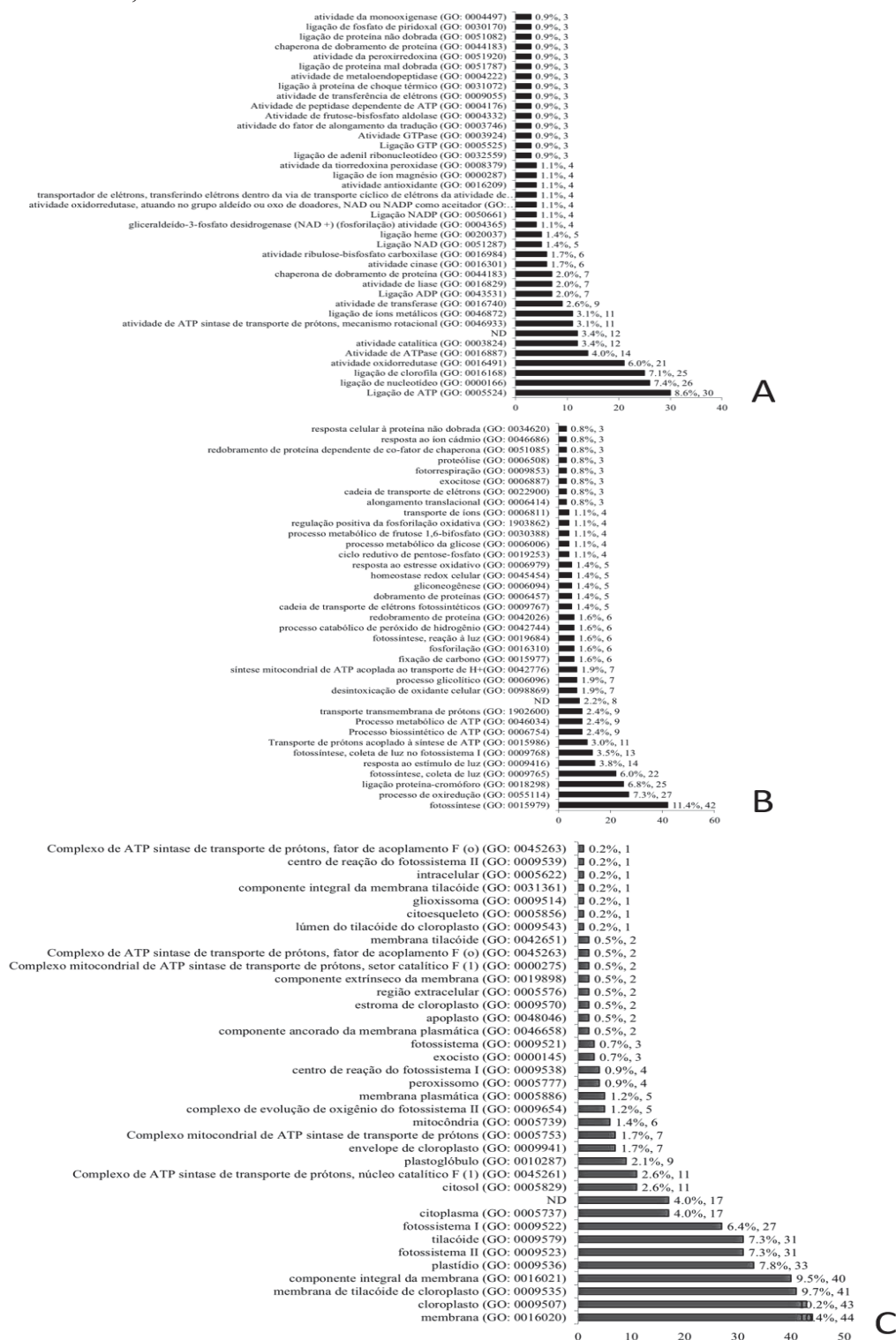
FIGURA SUPLEMENTAR 3 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD104**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS **CN&SNI**, A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor (2020). Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO). O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados da plataforma Pantherdb. ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

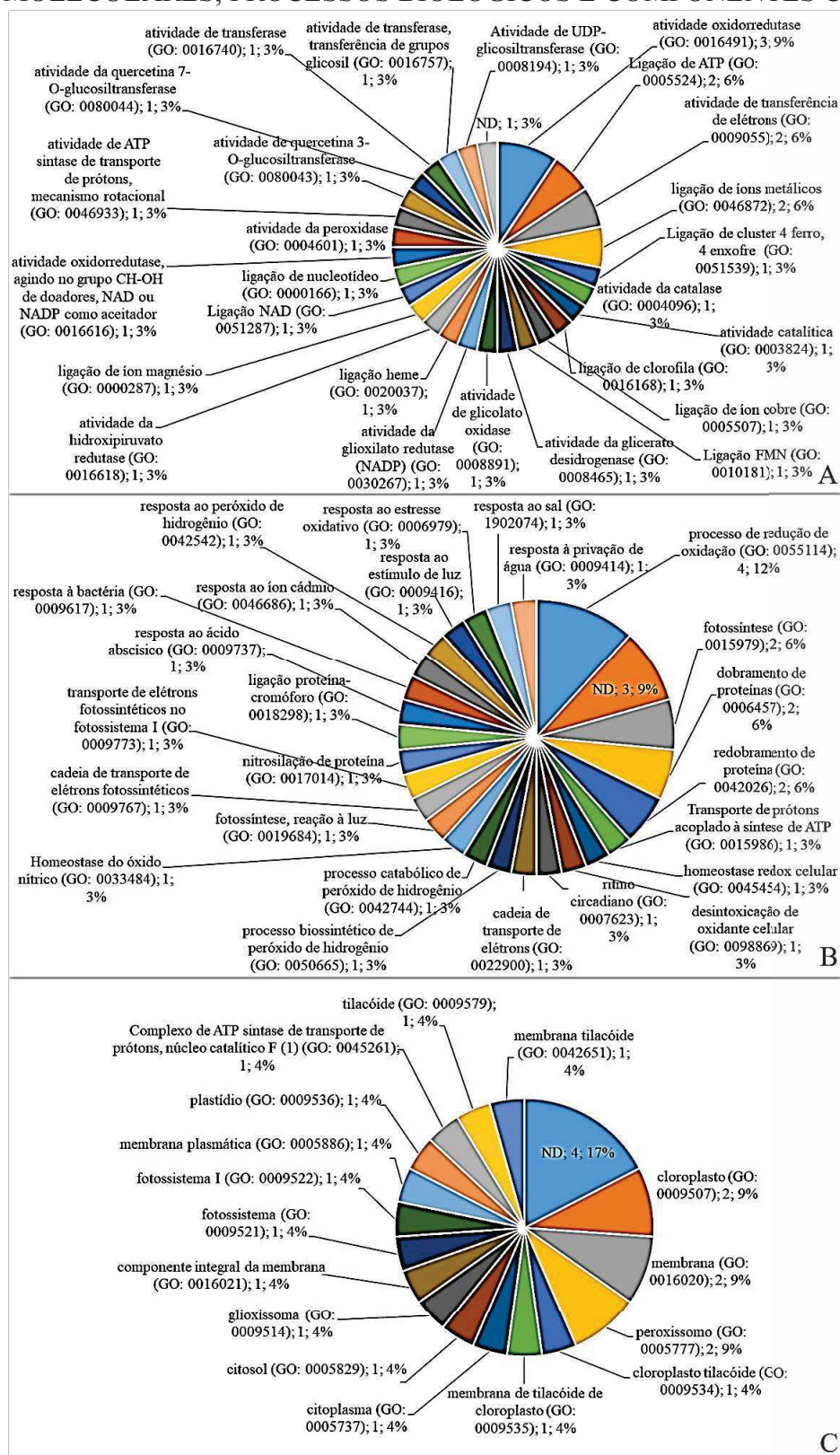
Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com nitrogênio (CN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

FIGURA SUPLEMENTAR 4 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD104**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS **CN&SN&SN1**, A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



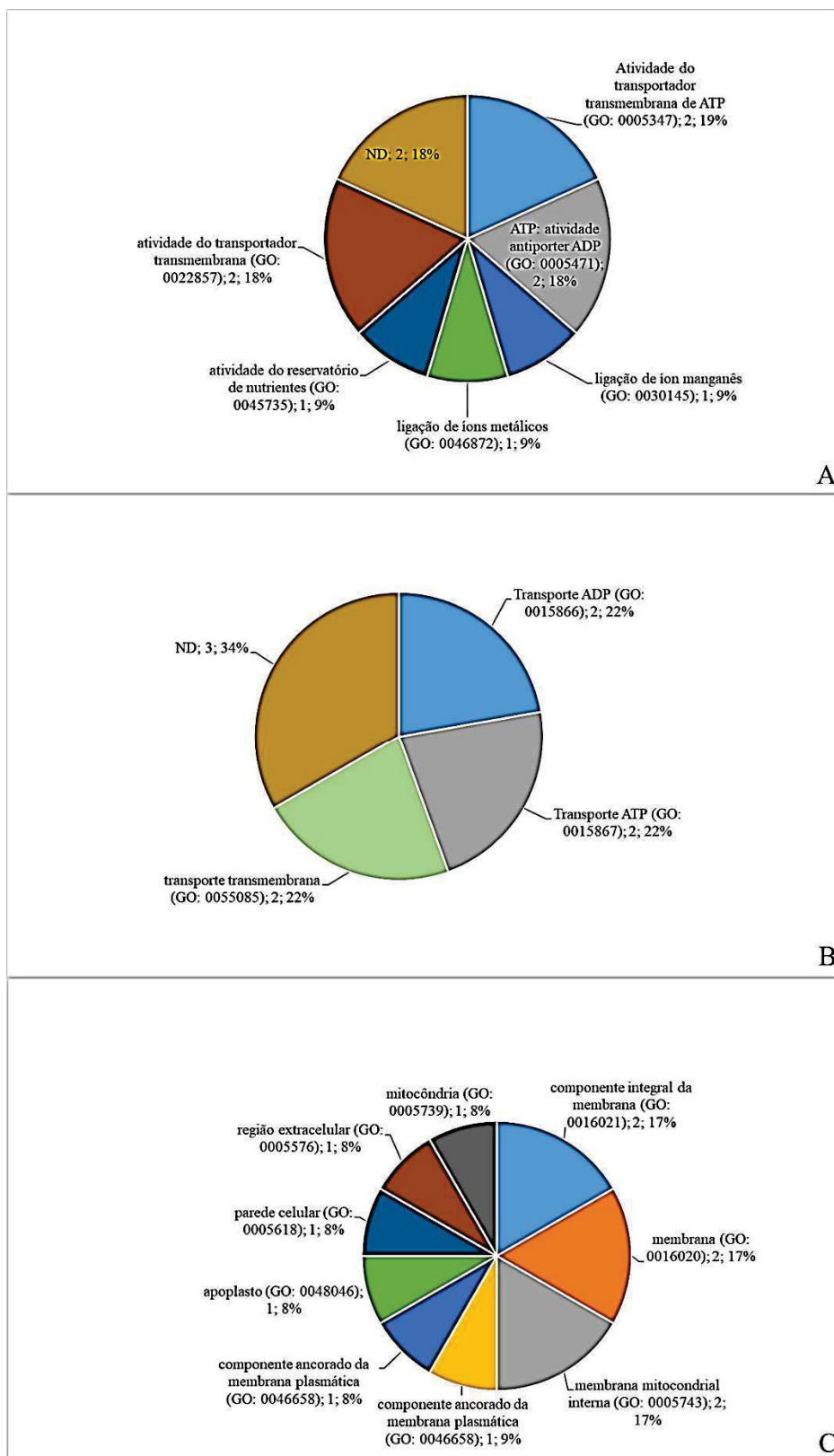
FONTE: o Autor (2020). Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos – BP (B) e Componentes Celulares – CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO). O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados da plataforma Pantherdb. ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC. Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104.

FIGURA SUPLEMENTAR 5 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. CD120, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS CN&SN, A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



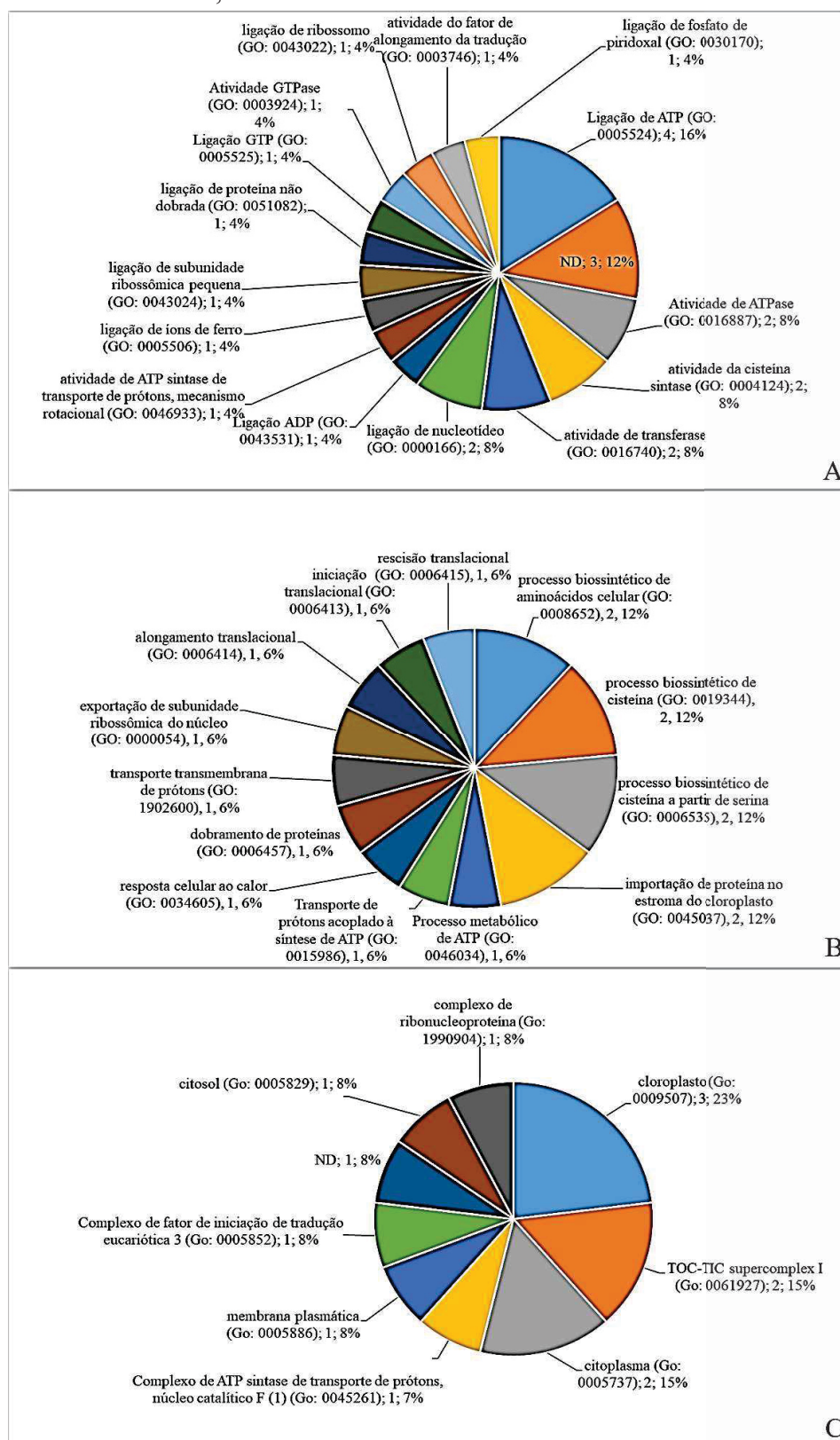
FONTE: o Autor (2020). Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO). O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados da plataforma Pantherdb. ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC. Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas in vitro em meio MS líquido sem adição de sacarose, com nitrogênio (CN) e sem nitrogênio (SN), mantidas em sala de crescimento a 24 (±2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

FIGURA SUPLEMENTAR 6 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD120**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS **SN&SNI**, A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor (2020). Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO). O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados da plataforma Pantherdb. ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC. Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, sem nitrogênio (SN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

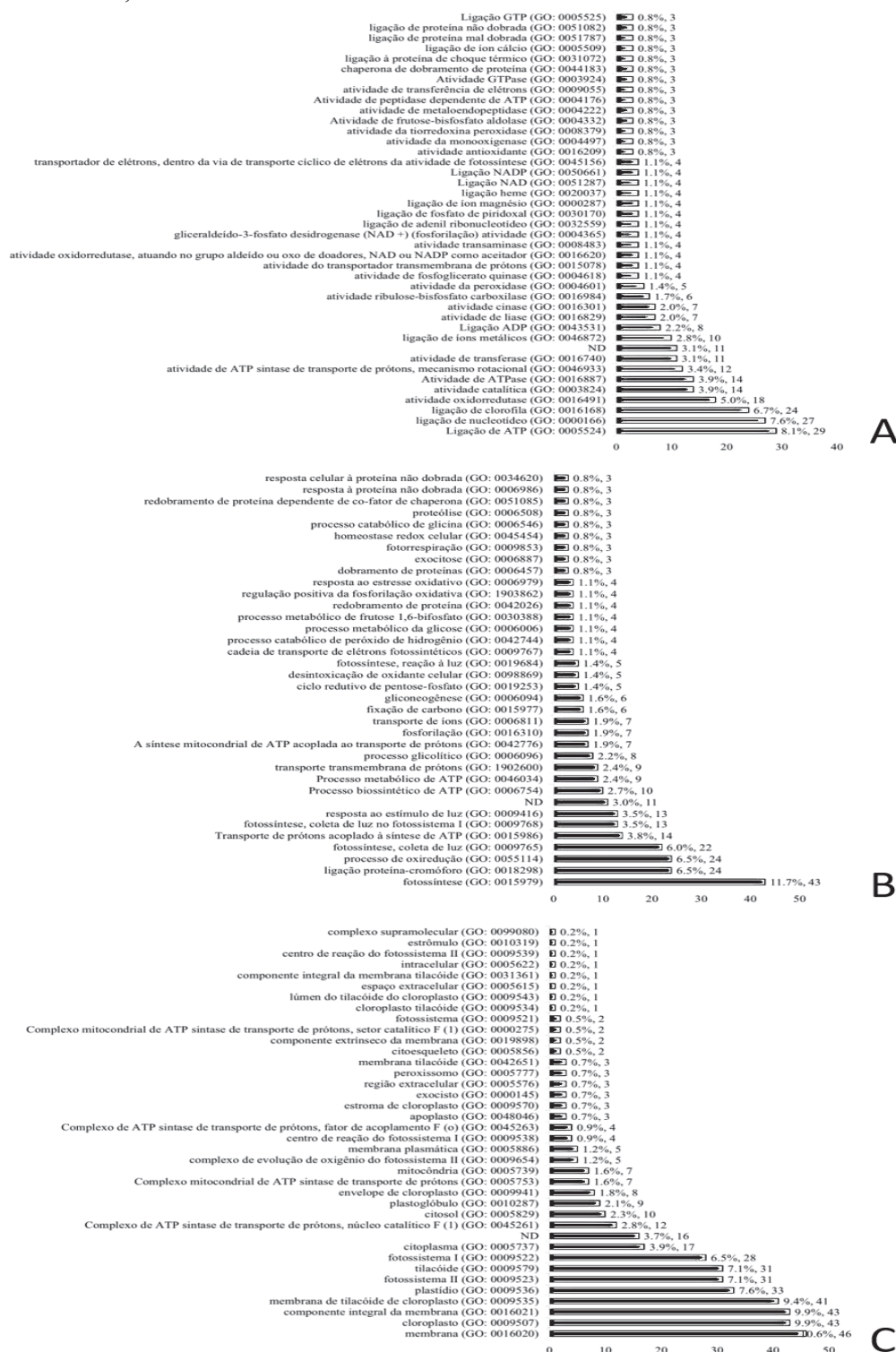
FIGURA SUPLEMENTAR 7 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD120**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS **CN&SNI**, A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor (2020). Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos - BP (B) e Componentes Celulares - CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO). O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados da plataforma Pantherdb. ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC.

Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com nitrogênio (CN) e sem nitrogênio inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 (SNI), mantidas em sala de crescimento a 24 (± 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 21 dias a partir da transferência para o tubo de ensaio e 20 dias após a inoculação. Foram consideradas proteínas com presença de peptídeos em pelo menos 3 repetições. n=4.

FIGURA SUPLEMENTAR 8 - ATRIBUIÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS EM FOLHAS DE TRIGO CV. **CD120**, PRESENTES EXCLUSIVAMENTE NA INTERSEÇÃO DO DIAGRAMA DE VENN ENTRE OS TRATAMENTOS **CN&SN&SN1**, A FUNÇÕES MOLECULARES, PROCESSOS BIOLÓGICOS E COMPONENTES CELULARES.



FONTE: o Autor (2020). Funções moleculares - MF (A), Processos Biológicos – BP (B) e Componentes Celulares – CC (C) da base de dados do *Gene Ontology* (GO). O nome da MF, BP e CC é seguido pelo código GO, número de proteínas no GO e percentual relativo ao número total de proteínas que foram encontradas no banco de dados da plataforma Pantherdb. ND corresponde as proteínas que não tiveram atribuições MF, BP ou CC. Proteínas provenientes da análise proteômica de folhas de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD120.