

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALESSANDRO AUGUSTO GONZALEZ

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DA RAIZ DO TRIGO (*Triticum aestivum*
VAR. LINI) CV. CD104 NA AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO E NA PRESENÇA DA
BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

PALOTINA

2021

ALESSANDRO AUGUSTO GONZALEZ

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DA RAIZ DO TRIGO (*Triticum aestivum*
VAR. LINI) CV. CD104 NA AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO E NA PRESENÇA DA
BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

Dissertação 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 Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Marise Fonseca dos Santos

PALOTINA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G643 Gonzalez, Alessandro Augusto
Análise proteômica diferencial da raiz do trigo (*Triticum aestivum* Var. Lini) CV. CD104 na ausência de nitrogênio e na presença da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 / Alessandro Augusto Gonzalez – Palotina, 2021.
169f.

Orientadora: Marise Fonseca dos Santos
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

1. *Triticum aestivum*. 2. *Herbaspirillum seropedicae*. 3. Análise proteômica. 4. LC MS/MS. I. Santos, Marise Fonseca dos. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.3



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 MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de ALESSANDRO AUGUSTO GONZALEZ intitulada: ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DA RAIZ DO TRIGO (*Triticum aestivum* VAR. LINI) CV. CD104 NA AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO E NA PRESENÇA DA BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, sob orientação da Profa. Dra. MARISE FONSECA DOS SANTOS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre 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, 27 de Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica
24/11/2021 18:03:29.0
MARISE FONSECA DOS SANTOS
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
25/11/2021 13:03:13.0
ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
25/11/2021 06:14:03.0
KADIMA NAYARA TEIXEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Pioneiro, 2153 Bloco da Direção - PALOTINA - Paraná - Brasil CEP 85950-000 - Tel: (44) 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: 130434 Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 130434

Ao meu querido e amado pai, Ricardo Antônio Gonzalez Benitez

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Paraná (UFPR), por ceder o espaço do LABIOGEN, onde as pesquisas puderam ser realizadas.

À Coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM.

À plataforma de Proteômica Estrutural e Computacional do Instituto Carlos Chagas (ICC) – Fiocruz de Curitiba, professor Paulo Costa Carvalho e Milan Avila Clasen, que nos deram grande suporte na compreensão e utilização do software PatternLab, através de horas de vídeo chamadas, e atendimentos *on-line*, nos ajudaram na solução de problemas.

Aos professores, que lecionaram disciplinas de grande importância para o desenvolvimento dos trabalhos e não pouparam esforços para transmitir seus conhecimentos.

Agradeço aos colegas, que contribuíram grandemente com o desenvolvimento dos trabalhos, em especial à Dra. Adeline Neiverth Chagas, que sempre se dispôs a colaborar, inclusive aos finais de semana, em discussões sobre a metodologia utilizada e na execução do projeto. Também agradeço aos alunos de iniciação científica (IC), que me auxiliaram durante esse período, em especial a Brenda Vilseque Fernandes, Hemilly Karini Rezende, Michely Karine Klein e Nicoly Karoline Klein.

Às Técnicas Laboratoriais, Cleuza Aparecida da Rocha Montanucci, Mara Regina Zadinello, Marina Giombelli Rosenberger, agradeço pela atenção e paciência.

Aos professores Isac George Rosset, Fábio Rogério Rosado, Adriana Fiorini Rosado, Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo e Milton Rönnau, que sempre se dispuseram discutir e ajudar no aprimoramento das estratégias empregadas no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço grandemente, à Prof. Dra. Marise Fonseca dos Santos, que me orientou na execução deste trabalho, soube entender minhas dificuldades, e que não poupou tempo e esforços para a sanar minhas dúvidas e ajudar na conclusão deste trabalho.

Em especial à minha esposa amada, Graciela Natália Bordignon Gonzalez, e minha amada mãe, Beatriz Salette Gonzalez Benitez, que sempre me apoiaram e não me deixaram desistir, mesmo em momentos de grandes dificuldades. Ao meu filho, Gustavo Bordignon Gonzalez, te amo filho.

“Quando a última árvore for
cortada,
quando o último rio for poluído,
quando o último peixe for pescado,
aí sim eles verão que dinheiro não
se come.”

Chefe Tatanka Iyotake

RESUMO

O nitrogênio (N) é limitante ao crescimento vegetal, tem influência na produtividade de cereais e é suprido com a utilização de fertilizantes nitrogenados. Entretanto os custos de produção e os problemas ambientais têm motivado os estudos de tecnologias alternativas ao uso do fertilizante. O emprego de microrganismos fixadores de nitrogênio em cereais, em especial para o trigo, tem sido estudado como uma das alternativas para o incremento de nitrogênio por características relacionadas à fixação ou à promoção do crescimento vegetal. Este trabalho teve como objetivo investigar proteínas presentes nas raízes da cultivar de trigo CD104 quando inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* SmR1 na ausência de fonte de nitrogênio e carbono para compreender a fisiologia da planta e sua interação com a bactéria. Para tanto, sementes de trigo foram esterilizadas, pré-germinadas e transferidas para tubos de ensaio de vidro contendo meio de cultura MS líquido sem sacarose para obtenção do cultivo *in vitro* sob os tratamentos: com fonte de nitrogênio (CN), sem nitrogênio (SN) e sem nitrogênio com o inóculo da bactéria *H. seropedicae* SmR1 (SNI) adicionado aos tubos SN após 24 h da transferência das sementes para os tubos SN. Todos os tubos foram mantidos em sala de cultura a 25 ° C e fotoperíodo de 14 h de luz por 20 dias. As raízes foram retiradas para avaliação do comprimento, massa seca e fresca, e para obtenção de extratos proteicos para análise proteômica por LC-MS/MS, tipo LTQ Orbitrap XL ETD. As imagens foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura de raízes intactas. Das proteínas, 1.069, foram identificadas seguindo critérios de restrições e comparadas com o banco de dados de proteínas UNIPROTKB de trigo e outros cereais. As informações sobre as vias metabólicas foram obtidas a partir de proteínas identificadas em cada tratamento, a partir de uma comparação de tratamentos emparelhados de proteínas exclusivas e mais abundantes. Observou-se que o comprimento, as massas e as vias metabólicas do tratamento SN foram mais distintas do CN e SNI. A proteína RUBISCO e outras como beta-1,3-glucanase e quitinases observadas no SNI sugerem atividade de fixação de carbono, respostas de hipersensibilidade e resistência a doenças em plantas promovidas pela bactéria. Um número muito baixo de bactérias endofíticas foi detectado. Um total de 211 proteínas exclusivas de *H. seropedicae* foram identificadas no tratamento SNI. As proteínas foram relacionadas à atividade de síntese, metabolismo de energia e carboidratos e atividade de fixação biológica de nitrogênio. Proteínas relacionadas ao metabolismo antioxidante, como a glutathione S-transferase, foram verificadas nas raízes do tratamento SN. Os resultados sugerem que as raízes do trigo na ausência de nitrogênio responderam a esta condição de estresse e, a presença promoveu respostas de estresse decrescentes à ausência de nitrogênio e algumas evidências de fixação biológica de nitrogênio na raiz.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*. *Herbaspirillum seropedicae*. Fixação biológica de nitrogênio. Interação planta-bactéria. Análise proteômica. LC MS/MS.

ABSTRACT

Nitrogen (N) is limiting plant growth, influences the productivity of cereals, and is supplied with nitrogen fertilizers. However, production costs and environmental problems have motivated studies in alternative technologies to the use of fertilizer. The use of nitrogen-fixing microorganisms in cereals, especially wheat, has been studied as one of the alternatives for increasing nitrogen in the plant and for characteristics related to fixing or promoting plant growth. The bacterium *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 is a candidate for this purpose, as it interacts with several species of grasses, including wheat, leading to increased productivity. This study aimed to investigate proteins present in the roots of wheat cultivar CD104 when inoculated with the bacterium in the absence of nitrogen and carbon source to understand the physiology of the plant and its interaction with the bacteria. Wherefore, wheat seeds were sterilized, pre-germinated, and transferred to glass test tubes containing liquid MS culture media without sucrose to obtain *in vitro* cultivation under treatments: with nitrogen source (CN), without nitrogen (SN), and without nitrogen with the bacterium inoculum (SNI) added to SN tubes after 24 h of seed transfer to tubes of SN. All tubes were kept in a culture room at 25 °C and a photoperiod of 14 h of light for 20 days. The roots were taken for evaluation of length, dry and fresh mass, and to obtain protein extracts for proteomic analysis by LC-MS/MS, type LTQ Orbitrap XL ETD. Images were obtained by Scanning Electron Microscopy from intact roots. Proteins, 1069, were identified following criteria of restrictions and compared to the UNIPROTKB protein database of wheat and other cereals. Information on metabolic pathways was obtained from identified proteins in each treatment from a paired treatments comparison of exclusive and most abundant proteins. It was observed that the length, masses, and metabolic pathways of the SN treatment were more distinct from the CN and SNI. The RUBISCO protein and others as beta-1,3-glucanase and chitinases observed in SNI suggest the activity of carbon fixation, hypersensitivity responses, and resistance to diseases in plants promoted by the bacteria. A low number of endophytic bacteria were detected. A total of 211 exclusive proteins of *H. seropedicae* were identified in SNI treatment. Proteins were related to synthesis activity, energy and carbohydrate metabolism, and biological nitrogen fixation activity. Proteins related to antioxidant metabolism, as glutathione S-transferase, were verified in the roots of the SN treatment. The results suggest that wheat roots in the absence of nitrogen were responded to this condition and the presence, decreased responses to stress in the absence of nitrogen, and some pieces of evidence of biological nitrogen fixation in the root.

Keywords: *Triticum aestivum*. *Herbaspirillum seropedicae*. Biological nitrogen fixation. Plant-bacteria interaction. Proteomic analysis. LC MS/MS.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1 – CULTIVO *IN VITRO* DE TRIGO CV. CD104 A 25 (\pm 2) °C SOB FOTOPERÍODO DE 14 HORAS DE ESCURO E 10H DE LUZ EM SALA DE VEGETAÇÃO 44
- Figura 2 – COMPRIMENTO DE RAIZ, MASSA FRESCA E SECA DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO E DE INÓCULO DA BACTÉRIA *H. seropedicae*..... 45
- Figura 3 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE SUPERFÍCIE EXTERNA (a) E INTERNA (B) DE RAIZ DE TRIGO (REGIÃO DE MATURAÇÃO) INOCULADA COM *H. seropedicae* SmR1. 47
- Figura 4 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE RAIZ DE TRIGO (REGIÃO DE ALONGAMENTO) INOCULADA COM *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. 48
- Figura 5 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE SUPERFÍCIE EXTERNA DE RAIZ DE TRIGO (REGIÃO DE MATURAÇÃO) DOS TRATAMENTOS SN, CN E SNI..... 50
- Figura 6 - PERFIL DE PROTEÍNAS EM SDS-PAGE 12% DESCONTÍNUO DE RAIZ DE TRIGO OBTIDAS DOS MEIOS DE CULTIVOS SEM (SN) E COM (CN) FONTE DE NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA *H. seropedicae*. 52
- Figura 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS IDENTIFICAÇÕES OBTIDAS NO PATTERNLAB V (A) E SOMATÓRIA DAS INTENSIDADES DOS XIC OBTIDOS DOS DADOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS PROTEÍNAS RAIZ DE TRIGO OBTIDAS NAS CONDIÇÕES SN, CN E SNI A PARTIR DE RÉPLICAS BIOLÓGICAS E TÉCNICAS. 54
- Figura 8 - DIAGRAMA DE VENN DE COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, SNxCNxSNI DOS DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TRIGO CV. CD104. 56
- Figura 9 – DIAGRAMA DE VENN DE COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, SNxCN (A), SNxSNI (B) E CNxSNI (C) DOS DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TRIGO CV. CD104..... 57

Figura 10 – DISTRIBUIÇÃO DE DADOS QUANTITATIVOS NAS COMPARAÇÕES ENTRE OS TRATAMENTOS SNXCN (A), SNXSNI (B) E CNXSNI (C).	58
Figura 11 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVAS (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO CN NA COMPARAÇÃO CNXSN EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.	60
Figura 12 - DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SN (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO SN NA COMPARAÇÃO CN&SN EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.	61
Figura 13 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVOS NO TRATAMENTO SN (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO SN NA COMPARAÇÃO SNXSNI EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.	68
Figura 14 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVAS (A) E MAIS ABUNDANTES (B) PARA O TRATAMENTO SNI NA INTERSEÇÃO SN&SNI EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.	69
Figura 15 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVOS (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO CN, NA COMPARAÇÃO CNXSNI EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.	77
Figura 16 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVOS (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO SNI NA COMPARAÇÃO CNXSNI EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.	78

Figura 17 - DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS DE *H. seropedicae* SmR1, ENCONTRADOS NO TRATAMENTO SNI NA EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104..... 85

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DE TRIGO ESTUDADAS QUANTO À ESTATURA MÉDIA (CM), CICLO, MATURAÇÃO MÉDIA (DIAS) E ACAMAMENTO, AVALIADOS IN VITRO E CASA DE VEGETAÇÃO.....	32
TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS BANCOS DE DADOS DE ORGANISMOS USADOS PARA COMPOR O BANCO DE DADOS LOCAL PARA REALIZAÇÃO DE BLAST-P NO SOFTWARE BLAST2GO.....	41
TABELA 3 – RESUMO DE DADOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DOS PROTOCOLOS AVALIADOS.	51

ÍNDICE DE TABELAS SUPLEMENTARES

TABELA SUPLEMENTAR 1 – LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAÍZES DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSN COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO CN.....	102
TABELA SUPLEMENTAR 2 – LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAÍZES DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS SNXCN E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO SN.	105
TABELA SUPLEMENTAR 3 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO CN NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSN.....	107
TABELA SUPLEMENTAR 4 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SN NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSN.....	113
TABELA SUPLEMENTAR 5 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SN NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI.	119
TABELA SUPLEMENTAR 6 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SNI NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI.	125
TABELA SUPLEMENTAR 7 - LISTA DE PROTEÍNAS DE BACTÉRIA <i>H. seropedicae</i> SmR1 IDENTIFICADAS COMO EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SNI NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI E CNXSNI.....	129
TABELA SUPLEMENTAR 8 - LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAÍZES DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> VAR LINI)	

CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO SN	135
TABELA SUPLEMENTAR 9 - LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAÍZES DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO SNI....	138
TABELA SUPLEMENTAR 10 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO CN NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSNI.....	141
TABELA SUPLEMENTAR 11 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SNI NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSNI.....	146
TABELA SUPLEMENTAR 12 - LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAIZES DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSNI E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO CN.....	150
TABELA SUPLEMENTAR 13 - LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAIZES DE TRIGO (<i>Triticum aestivum</i> VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSNI E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO SNI....	154

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 - ICC-POP.116 – DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	156
ANEXO 2 - ICC-POP.119 – PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM STAGETIP	165

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	TRIGO (<i>Triticum aestivum</i>)	23
3.2	A BACTÉRIA <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	24
3.3	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA	25
3.4	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	28
3.5	PROTEÔMICA	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	OBTENÇÃO DAS PLANTAS.....	32
4.1.1	Lavagem e desinfecção das sementes.....	32
4.1.2	Cultivo das plantas.....	33
4.1.3	Preparo e inóculo da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	33
4.2	DETERMINAÇÃO DE COMPRIMENTO, MASSA FRESCA E SECA DE RAIZ	34
4.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA E DA PRESENÇA DA BACTÉRIA NAS RAÍZES POR IMAGENS	34
4.4	PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA ANÁLISE PROTEÔMICA	35
4.4.1	Ensaio de protocolo de extração.	35
4.4.2	Ensaio de extração de proteínas pelo protocolo Vasconcelos (2005).....	36
4.4.3	Ensaio de extração de proteínas pelo protocolo Méchin (MÉCHIN; DAMERVAL; ZIVY, 2007)	36
4.4.4	Protocolo definitivo de extração de proteínas de raiz de trigo	37

4.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NOS EXTRATOS.....	37
4.6	SDS-PAGE.....	37
4.7	ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	38
4.7.1	Descoloração e digestão das proteínas em gel.....	38
4.7.2	Separação e identificação dos peptídeos por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida – Nano LC – ESI MS/MS	39
4.8	IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS DAS PROTEÍNAS EM BANCO DE DADOS	40
4.9	ANÁLISE DOS DADOS PROTEÔMICOS	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1	DESENVOLVIMENTO VEGETAL	43
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS RAÍZES	47
5.3	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	50
5.4	ANÁLISE PROTEÔMICA	53
5.4.1	CN & SN.....	58
5.4.2	SN & SNI.....	65
5.4.3	CN & SNI	74
5.4.4	Proteínas identificadas exclusivamente de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	84
6	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	TABELAS SUPLEMENTARES	102
	ANEXOS.....	156

1 INTRODUÇÃO

A quantidade de nitrogênio, é um fator limitante ao crescimento do vegetal (MONTEIRO et al., 2012; ROSENBLUETH et al., 2018). Esse elemento químico ocupa um lugar de grande destaque no metabolismo de todas as plantas, uma vez que os processos vitais são dependentes de proteínas e o nitrogênio é elemento essencial na sua composição (LEGHARI et al., 2016). A utilização de fertilizantes nitrogenados tem incrementado significativamente a produção de diversas culturas (LEGHARI et al., 2016; MONTEIRO et al., 2012). O nitrogênio é responsável pelo aumento da taxa fotossintética, aumento de área de superfície foliar e taxa de assimilação líquida (LEGHARI et al., 2016). Para atender as necessidades das plantas e suportar alta demanda de produção as culturas são adubadas com fertilizantes químicos nitrogenados. Entretanto, estudos tem mostrado que a eficiência no uso do nitrogênio para várias culturas e em especial o trigo (*Triticum aestivum* L.) está em torno de um terço. Além de baixíssima eficiência o que sobra em excesso (HAWKESFORD; GRIFFITHS, 2019) tem gerado problemas ao meio ambiente, uma vez que esses compostos são transportados aos lençóis freáticos, (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017) e produzem gases que aumentam o efeito estufa, como o óxido nítrico ou dióxido de nitrogênio (NO₂). Muitas formas são estudadas para mitigar esses efeitos (SMITH, PETE et al., 2008). Bactérias promotoras de crescimento vegetal já são utilizadas como inoculantes para melhorar a produção a mais de 120 anos, porém, os resultados na produtividade, não tiveram grande incremento na produtividade, provavelmente pelo fato dos inoculantes serem de má qualidade ou de produção caseira (BASHAN et al., 2014). Na cultura do trigo o emprego de bactérias promotoras de crescimento, podem ser uma alternativa para aumentar a eficiência na absorção de nitrogênio, uma vez que essas bactérias são capazes de melhorar a aquisição de nitrogênio e o desenvolvimento das raízes (BENEDETTO et al., 2017).

A interação entre plantas e bactérias já é conhecida e pode ocorrer de forma benéfica, neutra ou prejudicial para as plantas (CHENG; MCCONKEY; GLICK, 2010). A compreensão de como essas interações ocorrem, 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).

A cultura de trigo, de grande importância nutricional para humanos, pode realizar interações com bactérias diazotróficas (bactérias fixadoras de nitrogênio) e / ou promotoras do crescimento e também fungos (ROSENBLUETH et al., 2018; BENEDETTO et al., 2017).

Estudos realizados por Awan et al. (2020), mostraram que a inoculação de trigo com *Bacillus siamensis*, melhorou a resposta da planta ao estresse de cádmio, reduzindo o estresse oxidativo e melhorando o crescimento.

Cada vez mais a utilização de tais organismos mostra-se uma alternativa ao emprego de fertilizantes, muitas vezes considerados em excesso prejudicial ao meio ambiente (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria 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 (BALDANI et al., 1997; PANKIEVICZ, V. C.S. et al., 2016; ROSCONI; TROVERO; et al., 2016), além disso *H. seropedicae* parece ser capaz de induzir respostas defensivas da planta, sendo portanto, útil como agente de biocontrole (ASTA et al., 2019).

A bactéria *H. seropedicae* começa seu processo de entrada aderindo à superfície da raiz, entre as junções das células epidérmicas, uma possível explicação para que a *H. seropedicae* fixe-se a esse local, é que aí existe uma maior concentração de fontes de carbono. Seguindo com a infecção, a *H. seropedicae* atinge as células corticais da raiz, em um segundo estágio, e posteriormente, em um terceiro estágio, atinge os vasos xilemáticos (RONCATO-MACCARI et al., 2003).

Plantas de trigo (*Triticum aestivum*) de variedades comerciais CD 104 e CD 120, quando inoculadas com *H. seropedicae* SmR1, mostraram respostas distintas, sendo que plantas da variedade CD 104 responderam com diminuição na parte aérea e no peso das raízes em experimentos *in vitro*, não apresentam colonização endofítica associadas às raízes, ao contrário do observado com a variedade CD 120, que mostrou discreto aumento no peso da parte aérea e da raiz, embora as diferenças não fossem significativas. A diferença marcante foi a morfologia das raízes, com aumento na quantidade de pelos radiculares. (NEIVERTH et al., 2014).

Para contribuir nos estudos da compreensão do metabolismo e da fisiologia envolvidas na associação da bactéria *H. seropedicae* e de genótipos com respostas distintas, neste trabalho é proposto realizar, em raízes de trigo, estudos proteômicos da variedade CD 104 estudada por Neiverth et al. em 2014, na tentativa de elucidar o porquê do comportamento diferencial na variedade de trigo em questão.

O conhecimento da identidade das proteínas presentes em uma planta ou tecido específico tem objetivo de compreender a atividade biológica em especial comparando-se a abundância proteica. Estudar a abundância das proteínas presentes nos sistemas biológicos em momentos definidos é importante pois permite inferir, através das distinções em abundância, a

distinção fisiológica e bioquímica (WILKINS et al., 1996). Os métodos analíticos atualmente necessitam de pequenas quantidades de material porém em plantas existe maior número de interferentes (WANG, WEI; TAI; CHEN, 2008), além de serem ferramentas precisas que facilitam a análise dos resultados pelos fisiologistas de plantas (AHMAD et al., 2016).

A transferência de genes e a obtenção de simbiose nodular, foram tentativas de aumentar a fixação de nitrogênio em cereais, porém novas descobertas relacionadas ao genoma dos organismos diazotróficos se mostraram alternativas mais viáveis (ROSENBLUETH et al., 2018).

O melhoramento genético das plantas, pode ser uma maneira de aumentar o rendimento das culturas (LI, LE et al., 2019), em especial da raiz, haja vista que se trata da principal região de aquisição de água e nutrientes para a planta, podendo levar ao aumento na eficiência no uso desses recursos (WHITE, PHILIP J. et al., 2013)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Compreender a fisiologia e bioquímica da raiz do trigo cv. CD 104 quando em interação com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 por meio da abundância diferencial de proteínas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Obter raízes de trigo da variedade e CD 104 cultivadas *in vitro* em meio MS sem sacarose com fonte nitrogênio (condição 1), ausente de fonte de nitrogênio (condição 2); sem fonte de nitrogênio e inoculada com a bactéria *H. seropedicae* SmR1 (condição 3).

Avaliar a morfologia, o desenvolvimento de pelos radiculares e a presença endofítica da bactéria em nas raízes nas condições experimentais.

Ensaar e avaliar protocolos de extração de proteínas totais de raiz por quantificação de proteínas totais, SDS-PAGE e espectrometria de massas.

Extrair e quantificar proteínas totais, avaliar o perfil por SDS-PAGE e, por meio da análise proteômica por espectrometria de massas LC-MS/MS, obter a identificação de proteínas e avaliar a abundância por espectrometria de massas tipo *label free*.

Analisar os dados obtidos e inferir a fisiologia das raízes submetidas aos tratamentos por comparação entre as proteínas presentes e/ou de maior abundância que caracterizam o sistema.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TRIGO (*Triticum aestivum*)

Trata-se de uma planta hexaplóide com 3 ancestrais diploides, um desses ancestrais é o capim-cabra (*Aegilops tauschii*), resultado da hexaploidização entre *Triticum turgidum*, que é uma espécie de trigo tetraploide com *Aegilops tauschii*, diploide, evento esse que ocorreu por volta de 8.000 anos atrás. A representação comum a essa composição é AABBDD, sendo que D é a contribuição de *Aegilops tauschii* (ZIMIN et al., 2017). O sucesso do trigo, no emprego alimentar, deve-se em parte, à adaptabilidade a uma série de condições climáticas que, em parte, deve-se ao seu conjunto genômico, resultante da poliploidização entre a espécie selvagem de trigo *Triticum urartu* ($2n = 14 AA$) e *Aegilops speltoides* ($2n = 14 SS$), resultando no alotetraploide *Triticum turgidum* ($2n = 28 AABB$). A hibridização entre *T. turgidum* e uma espécie de gramínea diploide, *Aegilops tauschii* ($2n = 14 DD$), produziu o ancestral alohexaplóide *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42, AABBDD$), sendo que $2n$ corresponde ao número de cromossomos da célula somática e x corresponde ao número básico de cromossomos. Essa é a espécie que corresponde a 95% de todo o trigo cultivado atualmente no mundo (LUKASZEWSKI et al., 2014).

O trigo *T. aestivum* é uma das culturas mais importantes do mundo, sendo responsável por 30% da fonte de alimentação básica da espécie humana (LUKASZEWSKI et al., 2014). O cultivo do trigo cobre uma área equivalente a 14% da área cultivável do planeta, sendo a União Europeia, China e Índia, líderes mundiais na produção. Espera-se que o consumo global de trigo seja aumentado nas cinco maiores regiões consumidoras do mundo, China, Índia, União Europeia, Federação Russa e Estados Unidos são responsáveis por 55% do uso global de trigo, sendo que o uso de alimentos, deve permanecer estável em cerca de dois terços do consumo total e representar 60% do aumento total da demanda, enquanto o consumo *per capita* global se manterá estável. A produção de trigo, projetada para 2029 é de 839 Mt., sendo a União Europeia, entre os países desenvolvidos, aquela responsável pelo maior incremento na produção, devido à seus preços serem competitivos, alto rendimento na produção e a qualidade dos grãos (OECD; FAO, 2020).

No Brasil, a produção de trigo teve uma queda na produção entre os anos 2010 e 2019, de aproximadamente 10% (de 6.171.250 toneladas, para 5.604.158 toneladas). Mas quando comparamos com 2017, houve um incremento na produção de 4.342.812 toneladas para

5.604.158 em 2019, um aumento de 29% na produção (OECD; FAO, 2020). Também em 2019, o Brasil importou 6.460.500 toneladas de trigo (ABITRIGO, 2021)

3.2 A BACTÉRIA *Herbaspirillum seropedicae*

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram descritas por BALDANI et al. (1986) podendo ser vibroides ou helicoidais, gran-negativas, com um a três flagelos e um ou nos dois polos, apresentam espessura de 0,6 à 0,7 μm de espessura e entre 1,5 a 5 μm de comprimento, com crescimento em pH que pode variar de 5,3 a 8,0. O habitat natural é o solo e raízes das gramíneas. A espécie *Herbaspirillum seropedicae*, foi isolada pela primeira vez na cidade de Seropédica no estado Rio de Janeiro – Brasil. Trata-se de uma bactéria fixadora de nitrogênio – BFN – assim como diversas outras, como *Azospirillum*. algumas espécies de *Aquaspirillum*, entre outras. As bactérias do gênero *Herbaspirillum* fixam nitrogênio em ambientes de baixa concentração de oxigênio, e colonizam plantas, tendo bom crescimento utilizando o N_2 como única fonte de nitrogênio, apesar de apresentar crescimento mais lento que bactérias do gênero *Azospirillum*. Somente as características observadas entre *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, não seriam o suficiente para criar um novo gênero, no entanto, comparações entre RNA's, demonstraram menos de 25% de similaridade, justificando a criação de um novo gênero.

Hoje o gênero *Herbaspirillum* conta com uma grande quantidade de espécies, entre elas *Pseudomonas rubrisubalbicans*, foi reclassificada sob o nome de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e também tem a capacidade de colonizar plantas. A partir da década de 1990, novas espécies foram incluídas no gênero *Herbaspirillum*: *H. autotrophicum* (sin. *Aquaspirillum autotrophicum*) e *H. huttiense* (sin. *Pseudomonas huttiense*), *H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. cholorophenolicum*, *H. hiltneri*, *H. rhizosphaerae*, *H. aquaticum*, *H. massiliense*, *H. canariense*, *H. aurantiacum* e *H. soli* e *H. seropedicae* AU14040 (GARCIA et al., 2019). Algumas estirpes de *H. seropedicae* (AU14040 e AU13965) foram isoladas de pacientes imunocomprometidos e foram associadas a infecções e mortes em humanos. Essas cepas tiveram seus genomas sequenciados e comparados com linhagens de origem ambiental, mostrando que a cepa AU13965, apresentava um plasmídeo de 42.977 pb, o primeiro descrito no gênero *Herbaspirillum* e que as linhagens clínicas perderam os conjuntos de genes (*Nif*), relacionados à fixação biológica de nitrogênio e ao sistema de secreção de tipo 3 (T3SS), essenciais para interações com plantas (FAORO et al., 2019).

Algumas espécies de *Herbaspirillum*, como a *Herbaspirillum hiltneri* N3, não apresenta todos os genes do agrupamento *nif*, sendo, portanto, incapaz de fixar nitrogênio. O

genoma dessa espécie contém os genes para secreção de proteínas do tipo III, que supostamente está envolvida na interação planta-bactéria (GUIZELINI et al., 2015). *Herbaspirillum seropedicae* (SmR1) é um endófito que pode crescer em culturas como arroz, milho, cana-de-açúcar e sorgo. Diferentes métodos revelam os genes e as vias reguladoras na interação entre a *H. seropedicae* e o hospedeiro (ROSCONI; DE VRIES; et al., 2016). O genoma da cepa *H. seropedicae* SmR1 foi completamente sequenciado e anotado pelo consórcio Genoma do Paraná (GENOPAR) (GARCIA et al., 2019).

3.3 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Nos últimos anos, o mundo microbiano tem atraído grande atenção porque a redução nos custos de sequenciamento permite uma análise aprofundada da composição e dinâmica da população microbiana relacionada ao hospedeiro. E é esperado que em uma futura agricultura de precisão, a aplicação de misturas microbianas benéficas possa ser um método sustentável que neutraliza as condições de estresse biótico e abiótico e garante rendimentos estáveis (RODRIGUEZ et al., 2019).

Interação entre plantas e bactérias, ou outros organismos, podem resultar em associações benéficas ou prejudiciais às plantas. Outros estudos já demonstraram associações realizadas entre *H. seropedicae* e arroz, *Klebsiella pneumoniae* e trigo *Azospirillum sp.* e milho. Essas associações visam contribuir com a fixação de nitrogênio (VAN DEYNZE et al., 2018). O microbioma das plantas envolve uma série de bactérias endofíticas que interagem com seu hospedeiro, podendo levar a um aumento na tolerância da planta às variações ambientais e/ou promover o crescimento vegetal (PINSKI et al., 2019). A fixação de nitrogênio não é a única forma de associação benéfica à planta. O aumento na captação ou absorção de nutrientes, como o fosfato, a produção de fitormônios e a capacidade de lidar com o estresse ambiental, são também, outras formas de interações que podem ocorrer e assim passando às bactérias a alcunha de promotoras do crescimento vegetal (BRADER et al., 2014). CARRIL et al. (2020), demonstraram que plantas de trigo infectadas com *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* (Psa), aumentaram os níveis de H₂O₂, mostrando um sinal de reposta a presença de patógenos, ao mesmo tempo que a presença de *H. seropedicae* estirpe RAM10, controlou o estresse oxidativo produzido pelo patógeno e também auxiliou na redução dos sintomas de necrose em folhas. No entanto, a maioria dos microrganismos benéficos tem parentes próximos patogênicos. Não está claro como a planta realiza a distinção de organismos patogênicos dos benéficos, permitindo a colonização ou rejeitando organismos patogênicos (RODRIGUEZ et al., 2019).

Em trabalho publicado por Neiverth et al. (2014) foi demonstrado que variedades de trigo apresentam respostas diversificadas à presença de *H. seropedicae*, e que a cv. CD 104, apresentou queda no peso de raiz, quando inoculadas, em comparação às plantas não inoculadas no cultivo *in vitro*. A inoculação de plantas de milho com *H. seropedicae* mostrou que as bactérias conseguem modificar sua forma de vida livre para condições que as permita sobreviver aderidas à superfície das raízes do milho, e posteriormente, colonizar os tecidos internos da planta. Em condições de laboratório, a inoculação de milho com *H. seropedicae* mostrou que a população bacteriana atingiu o número máximo em raízes frescas por grama em cerca de três dias após inoculação. Os fatores moleculares necessários para a colonização radicular epifítica podem ter sido expressos durante esse período (BALSANELLI et al., 2016).

Além do período de 3 dias após a inoculação (D.A.I), também foi escolhido um tempo de amostragem relativamente precoce, que é 1 D.A.I. para analisar o perfil de transcrição e rastrear o progresso da colonização radicular. Aproximadamente metade dos genes expressos na presença de plantas são comuns entre as populações planctônicas (recuperadas do meio de cultura) e epifíticas, inclusive em meios mínimos, o que indica que esses genes constituem um transcriptoma limpo de *Herbaspirillum seropedicae*. Para amostras epifíticas e planctônicas, aproximadamente 30% dos genes expressos foram expressos diferencialmente no momento da análise (BALSANELLI et al., 2016). Pankievicz et al. (2016) demonstraram, através de RNA-seq, que *H. seropedicae* aumenta quase 20 vezes a expressão do gene MCP (responsável pela produção de um quimiorreceptor), quando estas estão em contato com raízes de trigo.

Comparado a fontes superficiais ou endógenas, explorar as características dos metabólitos secretados que exibem funções defensivas no meio externo à planta ou próximo às raízes é um desafio técnico. Alterações nas secreções de raiz na rizosfera ou genes únicos nas vias fitoquímicas ou biosintética dos transportadores podem afetar a composição e a atividade do micro bioma do solo (BAETZ; MARTINOIA, 2014).

Entender como a diferenciação entre organismos benéficos ou patogênicos é alcançada pelo reconhecimento de plantas e, como essas informações são processadas pela planta será uma questão chave para a biologia vegetal na próxima década (RODRIGUEZ et al., 2019). Em análises realizadas em plantas de cana-de-açúcar (SP70-1143 e Chune) inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* foram identificadas proteínas relacionadas ao reconhecimento celular durante a interação entre a planta e as bactérias, além de proteínas expressas pela bactéria, mas induzidas pela planta (LERY et al., 2011).

Estudos realizados por Khatabi et al. (2019), também demonstraram que a associação de organismos endófitos com plantas não leguminosas, pode aumentar a resistência das plantas

ao estresse biótico ou abiótico, além de promover a produção de fitormônios. A produção de SSPs (*Small-secreted proteins*) – Pequenas Proteínas Secretadas, também é significativa para a interação da planta com endófitos, sugerindo um impacto significativo na reprogramação da imunidade da planta, ajudando no estabelecimento e manutenção da interação.

Bactérias de *H. seropedicae* inoculadas em plantas de milho, parecem interagir com plantas por meio de um sistema de quimiotaxia e de modificações em seu envelope, incluindo a remodelação de peptoglicanos, mediados por uma série de genes. Células epifíticas exportam enzimas e polissacarídeos capazes de degradar a parede celular vegetal (BALSANELLI et al., 2016). Plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* SmR1, foram testadas no controle da antracnose, uma das doenças mais prejudiciais ao milho, causadas pela *Colletotrichum graminicola*. Apesar de não apresentarem nenhum efeito visível no controle da doença, promoveu o crescimento da planta (ASTA et al., 2019).

Em revisão publicada por Ahmad et al. (2016), são citados diversos outros trabalhos que mostram a expressão diferencial de proteínas, em plantas sob condições de estresse (sal, seca e temperatura – alta e baixa). Garcia-Seco et al. (2017) analisaram as respostas moleculares do trigo à infecção por *Xanthomonas translucens*, tanto em folhas quanto em raízes, por meio da análise de mudanças gênicas e proteicas.

Em soja submetida à estresse, a expressão de proteínas específicas para pelos radiculares, pode ser verificada através de análise proteômica, mostrando-se uma importante ferramenta para identificar possíveis proteínas expressas quando estas estão interagindo com micro-organismos presentes no solo (CHENG; MCCONKEY; GLICK, 2010).

A aplicação de *H. seropedicae* em milho mostrou-se positiva quanto ao aumento na assimilação de nitrogênio (N), bem como aumento no acúmulo de fósforo (P) e potássio (K) nas partes aéreas (DA FONSECA BREDA et al., 2019). A rizosfera do milho, libera grandes quantidades de exsudatos, tornando-se um local favorável a proliferação de organismos diazotróficos. Esses compostos são seletivos sobre bactérias (ROSENBLUETH et al., 2018). As respostas ao estresse hídrico também foram positivas em plantas inoculadas com *H. seropedicae*, mostrando maiores níveis de carbono e clorofila, e ainda maior biomassa, bem como níveis de ácido abscísico e etileno menores (CURÁ et al., 2017).

Bactérias promotoras de crescimento, isoladas da rizosfera de trigo, e cultivadas em meio Luria-Bertani (LB), apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica através da produção de bacteriocinas, que apresentaram efetividade entre 62% à 69% na inibição. Além da atividade antimicrobiana, a inoculação de plantas com PGPR, demonstrou significativo aumento de raiz e parte aérea do milho (ASHRAF; BANO; ALI, 2019).

3.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A disponibilidade de nitrogênio é limitadora ao desenvolvimento das plantas e há tempos superada mediante aplicações de fertilizantes sintéticos ricos em nitrogênio. Isso revolucionou o rendimento das culturas e a manufatura de alimentos mundial, mas há um dispêndio econômico e ambiental substancial anualmente e contaminação por nitrogênio (BEATTY; GOOD, 2011). A falta de nitrogênio provoca um desenvolvimento diminuído, aparências de clorose (alteração da coloração verde para a coloração amarela das folhas) e aparências de manchas vermelhas e roxas nas folhas, restringem o desenvolvimento transversal dos brotos (a partir do qual folhas, caule e galhos se desenvolvem). Comumente, os sintomas de ausência aparecem primeiramente nas folhas velhas, posteriormente a senescência das folhas começa. O emprego excessivo de nitrogênio tem efeitos adversos na evolução das plantas, promove uma coloração verde-escura extra nas folhas, faz com que os frutos se tornem mais suculentos, com menor abundância e com menor qualidade (LEGHARI et al., 2016).

A fixação biológica de nitrogênio é realizada por alguns organismos procarióticos, através da redução do N_2 à amônia (NH_3), processo esse que envolve grande quantidade de energia (AQUINO et al., 2015). A fixação biológica de nitrogênio foi demonstrada pela primeira vez em proteobactérias da ordem Rhizobiales. Essas bactérias fixam nitrogênio em nódulos de leguminosas, reduzindo o nitrogênio atmosférico através do emprego do complexo enzimático nitrogenase. Várias bactérias demonstraram fixar nitrogênio em simbiose com não leguminosas (BLOCH et al., 2020). Estudos que visam compreender as associações entre microrganismos fixadores de nitrogênio e plantas não-leguminosas, em especial os cereais, têm sido de grande importância à muito tempo (VAN DEYNZE et al., 2018).

A nitrogenase é uma enzima sensível ao oxigênio, nos levando a acreditar que apenas organismos anaeróbios obrigatórios ou facultativos pudessem ser candidatos ideais para fixação de nitrogênio, porém, *Azotobacter vinelandii*, aeróbio obrigatório, é capaz de realizar a fixação biológica de nitrogênio através de um sistema que protege a nitrogenase da presença de oxigênio (MAHMUD et al., 2020). Três evidências corroboram com a informação a respeito do sistema de proteção envolvendo o citocromo *bd*: 1 – aumento da atividade da oxidase do citocromo *bd*, quando ocorre aumento do suprimento de oxigênio; 2 – aumento do fluxo de elétrons para essa oxidase, ao invés de oxidases de outros citocromos; 3 – mutantes *Cyd*, não conseguem fixar nitrogênio em ambiente com oxigênio (POOLE; HILL, 1997). A expressão do gene *NifA*, que controla toda a cascata de produtos gênicos relacionados a fixação de nitrogênio,

responde aos níveis de amônio e oxigênio (AQUINO et al., 2015), em proteobactérias é ativada pela presença de nitrogênio e oxigênio. A expressão gênica da nitrogenase em eucariotos pode ser uma via importante para a redução da utilização de nitrogênio industrial (BLOCH et al., 2020).

O nitrogênio desempenha uma função mais essencial em vários processos fisiológicos. Dá cor verde-escura nas plantas, promove o desenvolvimento e propagação de outras partes da planta como folhas, caule e de outras partes vegetativas. Além disso, igualmente estimula o desenvolvimento radicular (LEGHARI et al., 2016).

Uma variedade de métodos pode ser usada para minimizar o uso de fertilizantes industriais e a incorporação de BNF em culturas não-leguminosas (como cereais), incluindo intervenção microbiana, isto é, engenharia genética para tornar os diazotróficos mais eficazes, explorar os recursos naturais para identificar novas bactérias diazotróficas, por meio de esforços de biotecnologia, como a transferência de características do BNF para as plantas. Embora os métodos biotecnológicos enfrentem problemas de aceitação do consumidor, métodos que melhoram a eficiência do BNF pela associação de microrganismos fornecerão uma alternativa mais rápida. As raízes interagem com os microrganismos de diversas formas, sendo importante suprimir a colonização por organismos patogênicos e aumentar a colonização por organismos benéficos, em especial aqueles que possam aumentar a fixação de nitrogênio (ANTONELLA DI BENEDETTO et al., 2017). No entanto, a liberação descontrolada de sal de amônio na rizosfera causa os mesmos problemas que o abuso de fertilizantes nitrogenados (NAG; SHRITI; DAS, 2019). Ao adaptar a rotação de culturas e a cultura mista localmente, é possível obter uma produção mais sustentável de alimentos em um futuro próximo. Esse é o objetivo de curto prazo da Fixação Simbiótica de Nitrogênio SNF, na sigla em inglês (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2019). Gómez-Godínez et al. (2019) estudaram o efeito benéfico do inóculo multiespécies para a fixação de nitrogênio nas plantas de milho em relação à capacidade de fixação por apenas uma espécie, sendo que o resultado foi maior que o das bactérias isoladas. Utilizando o mesmo inoculante multiespécies, foi registrada a redução de acetileno nas raízes ao longo de 5 dias, indicando a fixação de nitrogênio por bactérias no milho.

Foi demonstrado por Bennett; Pankievicz; Ané (2020) que plantas de milho de uma variedade indígena do México, secretam grandes quantidades de mucilagem, criando um sistema que parece favorecer o desenvolvimento de organismos diazotróficos, incrementando a fixação de nitrogênio por essas plantas, e que em outros cereais como, sorgo e trigo, a produção de mucilagem e a colonização por bactérias diazotróficas, apresentam um mecanismo semelhante.

Em trigo, parece estar bem definido que BFNs são bastante eficazes na promoção do crescimento, absorção de nutrientes e produtividade, em especial a *Azospirillum brasiliense* (ANTONELLA DI BENEDETTO et al., 2017).

Muito já foi descoberto sobre a genética e biologia molecular das SNF em leguminosas, mas os próximos anos podem ser tão emocionantes quanto no passado, especialmente quando nos esforçamos para traduzir o conhecimento genético em programas de melhoramento de plantas, esses mecanismos podem ser otimizados e pode ser estendidos a não leguminosas de importância agrícola (ROY et al., 2020).

3.5 PROTEÔMICA

Ao conjunto de total de proteínas que um organismo ou um sistema produz, num determinado momento ou situação, chamamos de proteoma, e ao estudo do proteoma, denominamos de proteômica (BOSE, U., WIJFFELS, G., HOWITT, CA, & COLGRAVE, 2019). As proteínas constituem um sistema interligado e dinâmico que determinam o fenótipo celular (LARANCE; LAMOND, 2015).

Métodos bioquímicos e biofísicos foram desenvolvidos ao longo dos anos para identificar as estruturas, funções e identidades das proteínas, para melhor compreender a complexidade dos sistemas biológicos (BOSE, U., WIJFFELS, G., HOWITT, CA, & COLGRAVE, 2019).

Muitos trabalhos, baseados em espectrometria de massa, aplicam o método *bottom-up*, no qual as proteínas são identificadas pela presença de peptídeos obtidos após a clivagem por proteases. Um problema da aplicação desse método é que os peptídeos identificados e quantificados podem não ter todos vindo de mais de uma proteína. Por exemplo, o mesmo peptídeo pode ter se originado de múltiplas proteoformas da proteína (LARANCE; LAMOND, 2015).

A preparação da amostra é fundamental de um experimento de proteômica, afim de obter proteínas de alta qualidade, facilitando a identificação e quantificação. Para isso, geralmente, são empregadas quatro etapas: coleta e armazenamento das amostras, extração das proteínas, limpeza e purificação de proteínas e análise das proteínas, muitas vezes se faz necessário uma etapa extra de digestão das proteínas. O método empregado depende da natureza do material a ser analisado e objetivo da análise (BOSE, U., WIJFFELS, G., HOWITT, CA, & COLGRAVE, 2019). O emprego de técnicas de ionização do tipo *matrix-assisted laser desorption ionization*

(MALDI) e *electrospray ionization* (ESI), forneceram uma nova ferramenta para a caracterização de proteínas, através da ionização suave das amostras (BOTELHO et al., 2010).

Uma abordagem para análise proteômica é a do tipo *shotgun*, onde o extrato proteico passa por um processo de digestão das proteínas antes de seguir para o espectrômetro de massas, gerando espectros MS / MS, que serão comparados à um banco de dados de sequência de proteínas. As correspondências geradas são denominadas *Peptide Spectrum Matches* (PSMs), que são pontuadas e classificadas. Os melhores espectro (experimentais) candidatos em comparação aos espectros teóricos, são selecionados, mas ainda assim, podem gerar falsos positivos, o que requer um controle de falsos-positivos. Esse controle ocorre através do *False Discovery Rate* (FDR). Outro problema encontrado nesse tipo de análise, é o fato de que muitas proteínas apresentam sequências iguais de peptídeos, então, muitas vezes, se faz necessário uma análise mais criteriosa. Para muitas dessas questões, são empregados softwares de comparações dos dados obtidos do espectrômetro de massas, com bancos de dados proteômicos (LEREIM et al., 2016).

No início, as técnicas em proteômica eram empregadas apenas para identificação de proteínas, mas com o avanço da tecnologia, a quantificação de proteínas tornou-se possível (GOEMINNE; GEVAERT; CLEMENT, 2018). Espectrometria de massa foi empregada por Faleiro et al. (2015) para quantificação de proteínas em raízes de milho quando inoculadas com *A. brasiliense*, retornando identidades de proteínas mais abundantes, na comparação com raízes não inoculadas. A análise proteômica de raízes de trigo sob estresse de cádmio, retornou um número significativo de proteínas quantificadas (10.532), as quais foram aplicados testes estatísticos para separação em categorias (função celular, componente celular e processo biológico) (JIAN et al., 2020).

Análise proteômica de *Brassica napus* identificou 7.856 e 8.552 proteínas em raízes com baixo fornecimento de nitrogênio contra alto fornecimento de nitrogênio. Neste mesmo trabalho foi verificado que o número de proteínas identificadas como diferencialmente expressas, aumentou conforme o tempo de duração do experimento avançava (QIN et al., 2019).

Apesar de todos os avanços obtidos na integração entre a obtenção e a análise dos dados, a extração e purificação das proteínas, mostra-se um desafio na determinação dos resultados de um experimento proteômico, uma vez que as amostras biológicas podem apresentar diversos componentes não proteicos (BOSE, U., WIJFFELS, G., HOWITT, CA, & COLGRAVE, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos, quando não descritos de outra forma, foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Genética (LaBioGen) da Universidade Federal do Paraná – UFPR – Setor Palotina. O genótipo avaliado foi o CD 104 (TABELA 1), obtido da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC), de Cascavel, Oeste do Paraná. Essa cultivar é estabelecida como uma cultivar altamente produtiva em regiões secas e que apresenta mecanismo de tolerância à seca (COODETEC, 2010), com alto índice de germinação (COAN et al., 2013; SMANHOTTO et al., 2006) e que utiliza bem o nitrogênio fornecido no solo (COAN et al., 2013).

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DE TRIGO ESTUDADAS QUANTO À ESTATURA MÉDIA (cm), CICLO, MATURAÇÃO MÉDIA (DIAS) E ACAMAMENTO, AVALIADOS IN VITRO E CASA DE VEGETAÇÃO.

GENÓTIPO	Estatura média (cm)	Ciclo	Maturação média (dias)	Acamamento
CD 104	80 – Baixa	Médio	118	Moderadamente resistente

FONTE: Guia de produtos trigo, COODETEC, 2010 e 2014.

4.1 OBTENÇÃO DAS PLANTAS

4.1.1 Lavagem e desinfecção das sementes

Inicialmente as sementes foram desinfetadas com etanol a 70% durante 5 minutos, posteriormente foram postas sob agitação a 120 rpm em solução de hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos, em seguida, as sementes foram lavadas 3 vezes e deixadas imersas por 4 horas em água esterilizada ultrapura à temperatura ambiente. Na sequência, as sementes foram incubadas em solução de hipoclorito de sódio acidificado [0,5% (v/v) de NaOCl, 0,18% (v/v) de HCl concentrado, 0,01% (v/v) de Tween 80 e 7 mM de KH₂PO₄] à temperatura ambiente, por 5 minutos em agitador rotativo à 120 rpm. Depois as sementes foram lavadas por 3 vezes com água esterilizada ultrapura e deixadas por 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 35% (v/v), e então lavadas por 4 vezes com água esterilizada ultrapura (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014). Após a lavagem as sementes foram deixadas para secar em papel filtro esterilizado e em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar.

4.1.2 Cultivo das plantas

Após secas as sementes foram transferidas para placas de Petri contendo ágar ($6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), para germinação, por 24 h no escuro à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa bacteriológica. As sementes germinadas, sem contaminação e que apresentavam bom e semelhante vigor, foram transferidas, uma semente por tubo de ensaio ($25 \times 200 \text{ mm}$) contendo 25 mL de meio de cultivo e esferas de polipropileno (aproximadamente 10 mL em volume), para sustentação da semente/planta sendo tudo previamente esterilizado. O meio de cultivo foi preparado tendo como base o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem sacarose e de modo a apresentar três condições para o cultivo da semente: com fonte de nitrogênio (CN); sem fonte de nitrogênio (SN) e sem fonte de nitrogênio com inoculação da bactéria *H. seropedicae* SmR1 (SNI), gentilmente cedido pelo grupo do prof. Dr. Emanuel Maltempo de Souza, do departamento de Bioquímica da UFPR. Sendo que para esta última condição, a inoculação da bactéria *H. seropedicae* SmR1 com $1,5 \times 10^7 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ de meio ocorreu 24 horas após a transferência da semente em parcela de tubos contendo o meio SN (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014).

Todos os tubos, após a transferência das sementes, foram acondicionados em sala de cultivo vegetal sob fotoperíodos de 14 h de luz por 10 h de escuro e temperatura de $25 (\pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$.

Depois de 20 dias após a inoculação (20 D.A.I.) todas as plantas foram coletadas e suas raízes foram separadas da parte aérea. Durante esse período, os tubos que apresentassem contaminação eram descartados.

4.1.3 Preparo e inóculo da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

As bactérias e o preparo do inóculo foram de acordo como proposto por (KLASSEN *et al.*, 1997) onde as bactérias foram mantidas em meio sólido NFbHP-malato contendo 20 mM NH_4Cl com adição de estreptomicina ($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esse mesmo meio, líquido foi usado para preparo da amostra e as bactérias foram quantificadas por método turbidimétrico a 600 nm, tendo como referência 1 D.O.₆₀₀ igual a $4,4 \times 10^8 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$. Uma vez estabelecida a quantidade total de células de *H. seropedicae*, necessária para que a concentração por tubo fosse equivalente a $1,5 \times 10^7 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ no cultivo das plantas, um volume correspondente de meio com as células foi tomado, centrifugada a 12.000g, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos e em seguida, suspensa em solução salina (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) suficientes para adição de 250 μL em cada tubo do tratamento SNI (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014).

4.2 DETERMINAÇÃO DE COMPRIMENTO, MASSA FRESCA E SECA DE RAIZ

Para determinação do comprimento e massa fresca, imediatamente após serem retiradas do cultivo *in vitro* as raízes separadas da parte aérea, foram lavadas com água ultrapura, secas em papel toalha e o comprimento da maior raiz foi medido com auxílio de uma régua, em seguida foram pesadas em balança analítica de 4 casas decimais. Para a obtenção da massa seca, as mesmas raízes foram postas a secar acondicionadas em envelope de papel e dispostas para secar em estufa de secagem a 60 °C por 72 horas. Foram tomadas 10 unidades de raízes para essas medidas. Destas foram realizadas análise de média e variância das repetições para cada tratamento, CN, SN e SNI pelo teste de Tukey a 5% usando o programa de análise estatística Past 3.26 - *Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*, disponível gratuitamente em <http://folk.uio.no/ohammer/past> (HAMMER, 2019).

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA E DA PRESENÇA DA BACTÉRIA NAS RAÍZES POR IMAGENS

Raízes também foram selecionadas para obtenção de imagens em Microscópio Ótico e Eletrônico de Varredura (MEV), para confirmação de bactérias endofíticas e epifíticas.

Foram ensaiados dois métodos para obtenção de imagens em microscopia eletrônica de varredura, um usando ponto crítico para preparo das amostras e outro sem passar por ponto crítico. As raízes de todos os tratamentos, foram lavadas com água ultrapura e depois postas em tampão fosfato de sódio 0,1M e glutaraldeído 2,5% (v/v), pH 7,2 por 24h. Após esse período as amostras foram transferidas para tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 10 minutos, esse último procedimento foi repetido 3 vezes. Na sequência as amostras passaram por uma série de desidratação alcoólica (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) de 10 minutos por duas vezes. Doze amostras foram selecionadas para passarem por secagem em ponto crítico Leica EM CPD300 Automated Critical Point Dryer. – Leica Mikrosysteme GmbH – Viena, Austria (CPD; CRITICAL; DRYER, 2014) e outras doze não foi realizada a secagem em ponto crítico.

As amostras foram divididas em partes conforme descrito por Li et al. (2019) em zona meristemática, de alongação e de maturação, sendo que foram utilizadas as regiões de alongação e maturação, que são regiões mais propícias encontrar bactérias, uma vez que as bactérias podem entrar e sair pela região dos pelos radiculares (JAMES et al., 2002; WHITE,

JAMES F. et al., 2014). As partes seccionadas das raízes foram mantidas em álcool absoluto até o momento de utilização.

Essas mesmas amostras foram então transferidas para recipientes de isopor® contendo nitrogênio líquido. Depois de congeladas, as amostras foram fraturadas com golpe de lâmina de barbear, sob superfície de metal, também congeladas com nitrogênio líquido (MARUTHI SRIDHAR et al., 2011; O'DONNELL; HOOPER, 1977). As partes fraturadas foram coletadas e acondicionados novamente em frasco contendo álcool absoluto, até serem levados para secagem em equipamento de Ponto crítico - Leica EM CPD300 Automated Critical Point Dryer. – Leica Mikrosysteme GmbH – Viena, Austria. Para aquelas que não passaram pelo ponto crítico, após passarem pela série alcoólica, foram deixadas em estufa de secagem até o momento da metalização.

As amostras foram, posteriormente, revestidas com uma lâmina de 10 nm de ouro em metalizador Denton Vacuum Desk V – Denton Vacuum, Moorestown, New Jersey USA, e observadas em microscópio eletrônico de varredura VEGA3 TESCAN (TESCAN – República Tcheca).

4.4 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA ANÁLISE PROTEÔMICA

Para extração de proteínas, imediatamente após serem retiradas do cultivo *in vitro*, as raízes separadas da parte aérea foram lavadas com água ultrapura, secas em papel toalha, pesadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e transferidas para ultrafreezer -80 °C.

4.4.1 Ensaios de protocolo de extração.

Foram ensaiados dois protocolos para extração de proteínas para definição daquele que apresentasse maior rendimento de extração de proteínas e de número total de proteínas identificadas por espectrometria de massas. Os protocolos seguidos foram propostos por Vasconcelos (VASCONCELOS et al., 2005) e Méchin (MÉCHIN; DAMERVAL; ZIVY, 2007).

4.4.2 Ensaio de extração de proteínas pelo protocolo Vasconcelos (2005)

A extração de proteínas seguiu o protocolo (VASCONCELOS et al., 2005) modificado pela não adição de PVPP. As raízes de trigo, armazenadas em ultrafreezer, foram imediatamente pulverizadas em nitrogênio líquido. Ao pó obtido, aproximadamente 0,50 g de raiz, foram adicionados 8 mL de tampão de extração (50 mM Piridina, pH 5,0, 10 mM Tiourea, 1% (m/v) Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)), contendo 1 tablete de coquetel de inibidores de protease para cada 100 mL de tampão de extração (CComplete, EDTA free Protease Inhibitor Cocktail Tablets – Roche Co). O extrato foi deixado sob agitação em banho de gelo por 2 h. Em seguida centrifugadas a 10.000g durante 40 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos tipo Falcon de 50 mL e adicionado 4 vezes o volume de Ácido Tricloroacético (TCA) a 10% em acetona gelada. A suspensão precipitada foi deixada em freezer -20 °C por duas horas e depois centrifugadas à 10.000g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com acetona fria sob agitação vigorosa em vórtex, e centrifugada a 5.000g durante 5 minutos à 4 °C e em seguida o sobrenadante foi descartado. O procedimento de lavagem com acetona foi repetido até que não restassem vestígios do TCA, ou pH ácido. Durante as lavagens do precipitado, este foi transferido para microtubos de 2 mL. O precipitado foi deixado para secar sob baixa pressão em dessecador durante até uma semana.

As proteínas foram solubilizadas em tampão de amostra contendo 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, Glicerol 10% (v/v), SDS 10% (m/v) e DTT 5% (m/v).

4.4.3 Ensaio de extração de proteínas pelo protocolo Méchin

No protocolo proposto por Méchin (MÉCHIN; DAMERVAL; ZIVY, 2007) as raízes foram pulverizadas em nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. À 0,25g de raiz, foi adicionado 1,8 mL de TCA 10% (m/v) e β -Mercaptoetanol 0,07% (v/v) em Acetona. As amostras foram deixadas em freezer -20 °C por 1 hora. Então foram centrifugadas a 10.000g, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com β -Mercaptoetanol 0,07% (v/v) em acetona por 3 vezes. O precipitado foi posto para secar sob baixa pressão em dessecador durante até 1 semana. Depois de seco, foram retirados 10 μ g de amostra e adicionado 600 μ L de solução de ressuspensão contendo 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 10% (m/v) e DTT 5% (m/v), em água ultrapura para solubilização das proteínas. A solução foi centrifugada a 10.000g por 15 minutos a 25 °C e o sobrenadante foi transferido para um microtubo novo de 2 mL.

4.4.4 Protocolo definitivo de extração de proteínas de raiz de trigo

Para constituição da massa necessária à extração de proteínas totais, aproximadamente 0,5g foi reunido para cada amostra. Esta foi composta por raízes de seis plantas, para cada tratamento. Foram preparadas 3 repetições para cada tratamento. Foi seguido o protocolo de Vasconcelos (VASCONCELOS et al., 2005) conforme descrito acima, mantendo-se as proporções.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NOS EXTRATOS

Para dosagem de proteínas dos extratos produzidos foi utilizando método colorimétrico de ácido bicinchoninico (BCA) (SMITH, P. K. et al., 1985) e leitura em Nanodrop 2000 Spectrophotometer - Thermo Fischer Scientific – U.S.A. Foi usada a Albumina do soro bovino como padrão. Seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante do Nanodrop (THERMO SCIENTIFIC, 2017).

4.6 SDS-PAGE

Após a dosagem das amostras, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e descontínuo (SDS – PAGE) (LAEMMLI, 1970), para avaliação dos extratos obtidos. O gel concentrador com acrilamida 4% (m/v) e o gel de separação com acrilamida 12% (m/v). As amostras e padrão de proteínas (LMW for SDS Electrophoresis - GE Healthcare) foram aplicadas ao gel nos pocinhos formados. A corrida eletroforética iniciou com tensão de 50V, para agrupamento das amostras e posteriormente, no gel de separação à 150V de tensão em fonte digital 300V marca GSR. As proteínas foram separadas por suas massas moleculares, fixadas e coradas utilizando-se Azul de Coomassie G-250 (CANDIANO et al., 2004).

Com a finalidade de envio de amostra para obtenção de dados por espectrometria de massas das proteínas nas amostras, a eletroforese foi refeita e foi encerrada imediatamente após toda a amostra entrar completamente no gel de separação (MACHADO; BATISTA, 2017) e coradas com o mesmo corante.

4.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os extratos de proteínas totais para análise proteômica por espectrometria de massas foi enviada à plataforma de proteômica do Instituto Carlos Chagas (ICC) – Fiocruz de Curitiba – Pr, em pedaços de géis da SDS-PAGE dentro de microtubos.

4.7.1 Descoloração e digestão das proteínas em gel

Os procedimentos de descoloração do gel enviado, digestão das proteínas em gel e de purificação de peptídeos trípticos em StageTip-C18 foram realizados seguindo os POPs (Procedimento Operacional Padrão) ICC-POP 116 e 119 (ANEXOS 01 e 02), que brevemente consistiram de descoloração do gel, cortado em pequenos pedaços, contendo amostra utilizando solução de Bicarbonato de Amônio (ABC) 25 mmol L⁻¹ em Etanol 50% *overnight*. Seguido de desidratação em Etanol absoluto, repetido até que o gel ficasse completamente desidratado. Após, os pedaços do gel foram secos em um concentrador à vácuo. Seguindo-se de adição de quantidade suficiente de tampão de redução contendo solução de DTT 10 mmol L⁻¹ em ABC 50 mmol L⁻¹. e incubados em thermomixer por 60 minutos à 56 °C e 800 rpm. O sobrenadante foi então descartado. Posteriormente foi adicionado tampão de alquilação contendo Iodoacetamida 55 mmol L⁻¹ em ABC 50 mmol L⁻¹ em quantidade suficiente para cobrir os pedaços de gel e incubados no thermomixer por 45 min a 25 °C (800 rpm) protegido da luz. A solução foi então, retirada posteriormente e descartada. Aos pedaços de gel são adicionados tampão de digestão contendo solução de ABC 50 mmol L⁻¹ e então incubados em thermomixer a 25 °C por 20 minutos e 800 rpm. O sobrenadante foi então descartado e os pedaços de gel são novamente desidratados em etanol absoluto sob agitação em thermomixer a 25 °C por 10 minutos e 800 rpm, após a desidratação o líquido foi descartado. Em seguida foi adicionado, novamente tampão de digestão, em quantidade suficiente para cobrir o gel e agitado em thermomixer a 25 °C por 20 minutos e 800 rpm, descartando o líquido ao final do processo. O gel foi novamente desidratado em Etanol absoluto e agitado em thermomixer a 25 °C por 10 minutos e 800 rpm, descartando o líquido ao final do processo. Esse procedimento de desidratação foi repetido até que o gel ficasse branco. Após completamente desidratação do gel, foi posto para secar em um concentrador à vácuo por 7 minutos com pressão igual a 0,01 torr (\cong 0,0013 atm), até restarem brancos e os pedaços soltos dentro do tubo. Em seguida foi adicionada a solução de Tripsina 12,5 ng μ L⁻¹ diluída com solução ABC 50 mmol L⁻¹ (preparada no momento do uso) em quantidade suficiente para cobrir o gel e deixados em geladeira a 4 °C

por 20 minutos. Em seguida, a solução de Tripsina foi descartada e substituída por solução tampão de digestão, em quantidade suficiente para cobrir o gel e incubados em estufa a 37 °C por 16 horas. Transcorrido o tempo, o sobrenadante foi coletado e transferido para microtubos limpos de 2,0 mL. Ao gel, foi adicionado 400 µL de solução de extração contendo água, Ácido Trifluoroacético 3% e Acetonitrila 30%, e agitado em thermomixer a 25 °C por 10 minutos e 800 rpm, seguido da coleta do sobrenadante e transferência para o mesmo microtubo de 2,0 mL da etapa anterior. Esse procedimento foi repetido mais uma vez (total de 2 vezes). Em seguida, foi adicionado Acetonitrila até cobrir o gel e agitação em thermomixer a 25 °C por 10 minutos e 800 rpm. Novamente, o sobrenadante foi transferido para o tubo de 2,0 mL das etapas anteriores. Essa etapa foi repetida mais uma vez. A amostra foi seca por 1h30min. em concentrador à vácuo até que restasse 10 a 20% do volume original, a fim de remover a Acetonitrila. Os peptídeos foram, então, purificadas usando-se StageTip C-18 (MACHADO; BATISTA, 2017). Neste o volume contendo peptídios tripticos da amostras foram transferidos para o StageTip, acoplado a um tubo de lavagem e centrifugados por 6 minutos à 1.000g. posteriormente o StageTip foi lavado duas vezes com 200 µL de solução contendo água e Ácido Fórmico 0,1% e centrifugados por 6 minutos à 1.000g.(MACHADO; BATISTA, 2017).

4.7.2 Separação e identificação dos peptídeos por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida – Nano LC – ESI MS/MS

A espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS) dos peptídios tripticos obtidos de cada amostra e réplicas foi em um sistema cromatográfico UHPLC Easy – nLC 1000 (Thermo Scientific – U.S.A.), usando uma coluna C18 de 15 centímetros com 75µm de diâmetro interno e partículas de C18 de 3 µm de diâmetro em um fluxo de 250 nL·min⁻¹, com gradiente linear de 5 a 40% em Acetonitrila contendo Ácido Fórmico 0,1% e 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO), por 120 minutos. A detecção dos peptídios foi acoplado a um espectrômetro de massas híbrido LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific – U.S.A.) equipado com uma fonte de ionização por nanopulverização (*Nanospray ionization* - NSI) realizada com temperatura de capilar de 175 °C, tensão capilar de 35 V, tensão da fonte de 2,7 kV e corrente da fonte de 100 µA. O analisador de massas para obtenção dos espectros de peptídios (MS1) foi um Orbitrap, com janela full scan (m/z): 300-2000, resolução de 60.000 e *Lock Mass* (calibrante interno) de 401.922718 m/z. O analisador para espectros de MS/MS (MS2) foi um analisador tipo *Ion Trap* (Full AGC Target: 30.000). O segundo evento de escaneamento foi repetido para os 10 picos de MS mais intenso, com exclusão dinâmica de 90 s.

4.8 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS DAS PROTEÍNAS EM BANCO DE DADOS

Os dados de espectrometria de massas das 3 réplicas biológicas foram obtidos em duplicata técnica em arquivos 'raw'. Estes dados foram analisados pelo software PatternLab For Proteomics, versão 5.1 (BARBOZA et al., 2011; CARVALHO et al., 2012, 2016b) para atribuição de identidade proteica aos espectros de MS e MS/MS. O banco de dados local foi formado pelos dados oriundos da plataforma UNIPROT (CONSORTIUM, 2019) de *Triticum aestivum* (strain: cv. Chinese Spring) (Identificação taxonômica do organismo 4565 - versão 29.04.2021 com 143.328 proteínas não revisadas e revisadas) e de *Herbaspirillum seropedicae* (strain SmR1) (Identificação taxonômica do organismo 757424 - versão 29.04.2021 com 4.734 proteínas não revisadas e revisadas).

As configurações de busca e filtragem de dados foram as seguintes: parâmetros de busca: 35 ppm de tolerância de massa do precursor, 0,4 Da de massa para dos fragmentos, janela de tolerância do fragmento de 1,0005, clivagem tríptica, exceto de resíduos de Arginina e Histidina seguidos de Prolina, possibilidade clivagens semi-específicas, perda de 2 resíduos na clivagem tríptica, duas possíveis modificações por peptídeo, faixa de busca de 500 à 6000 m/z. Ainda foi considerada a modificação fixa a carbamidometilação de cisteína (carbamidometil (C)) e para as modificações variáveis foram consideradas a oxidação da metionina (M), fosforilação da tirosina, serina e treonina (YST), hexosaminoacetilação (HexNAc) da serina e treonina (ST).

As análises quantitativas dos dados tipo *label free* foi baseada em Cromatograma de íon extraído - *eXtracted Ion Chromatogram* (XIC) que considera o registro da intensidade do sinal observado para um determinado valor ou conjunto de valores de m/z em uma série de espectros de massas gravados em função do tempo de retenção. Este foi realizado com tolerância de 20 ppm. Os dados totais de identificação foram gerados com Parcimônia Máxima (*Maximum Parsimony*), considerando apenas proteínas com um peptídeo único, em seu estado preferencial de carga e, para o dado quantitativo, com no mínimo 6 pontos para que se tenha um XIC aceitável.

Análise dos dados foram realizadas sempre considerando as identificações das réplicas biológicas. Assim sendo foi estipulada que para a identificação de uma proteína fosse considerada válida, a presença de um peptídeo único identificado em 2 das 3 réplicas biológicas de cada tratamento.

4.9 ANÁLISE DOS DADOS PROTEÔMICOS

Foram obtidos diagramas de Venn a partir do PatternLab For Proteomics, v.5.1 onde foram comparados todos os tratamentos CN, SN e SNI (Venn triplo) e entre pares, CNxSN, CNxSNI e SNxSNI (Venn duplo) em modo de restringência e excluindo os peptídios contaminantes e reversos. Foram extraídos arquivos contendo lista das identificações de proteínas de cada comparação. Destas comparações puderam ser obtidas as informações de proteínas exclusivamente presentes de cada tratamentos, na comparação e as identificações presentes nas interseções entre CN&SN, SN&SNI, CN&SNI do gráfico do Venn duplo.

Foram obtidos também dados quantitativos de comparação de 2 tratamentos pela funcionalidade ‘*T-fold*’ do software PatternLab For Proteomics, versão 5.1. Os dados considerados foram aqueles que satisfazem o valor de corte q (*q-value cutoff*) e a variável de mudança de dobra (*Fold change*), que foram respectivamente, 0,05 (ou $p < 0,05$) e as identificações em que seus valores que quantificação não foram muito baixos (ou *not satisfy de L-strigency cutoff* (0,2)).

O *software* Blast2Go versão 5.2.5 (*software* livre disponível em <https://www.biobam.com/blast2go-previous-versions/>) (CONESA et al., 2005; CONESA; GÖTZ, 2008; GÖTZ et al., 2008, 2011) foi utilizado para melhorar as anotações dadas na versão do banco de dados utilizado para análise dos espectros de massa. Foi usada a função *Blast-p* (interface que identifica sequencias de proteínas potencialmente homólogos do banco de dados) e para isto foi constituído um único banco dados obtendo do UniProt Knowledgebase (UNPROTKB) de UNIPROT (BATEMAN et al., 2021; CONSORTIUM, 2019) todos registros de proteínas revisadas e não revisadas de trigo, milho, arroz, arabidopsis e da bactéria *H. seropedicae* SmR1, conforme TABELA 2.

TABELA 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS BANCOS DE DADOS DE ORGANISMOS USADOS PARA COMPOR O BANCO DE DADOS LOCAL PARA REALIZAÇÃO DE BLAST-P NO SOFTWARE BLAST2GO.

Organismo	Nome científico	Número de acesso no UNPROTKB	Número total de registros
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	4565	143.328
Milho	<i>Zea mays</i>	4577	171.936
Arroz	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	3994	148.875
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3702	36.824
Herbaspirillum seropedicae (cepa SmR1)	<i>H. seropedicae</i>	757424	4734

FONTE: UNIPROT - Data de acesso: 29 /04 /2021

O *software* Blast2Go usa os arquivos “.fasta”, portanto, os ID agrupados nos dados oriundo das análises do Venn e do “T-fold”, foram usados no UNIPROT para obtenção das sequencias neste formato, usando o *retrieve/ID mapping*. Após a realização da busca pelo *Blast-p* foi realizada o mapeamento dos termos de *Gene Ontology* (GO), seguido da função de anotação do GO, onde a informação obtida no *Blast-p* foi mapeada no GO, e assinalado o mais provável termo GO para a sequência inserida, levando em consideração hierarquia do GO, a similaridade de sequências tanto quanto a abundância e a qualidade da fonte da anotação da sequência. Por fim o termo de GO acima do *cutoff* foi atribuído de um modo não redundante. A partir destas informações foram determinadas as principais vias metabólicas presentes através da análise de mapeamento no KEGG do código GO-enzima para os dados anotados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esse trabalho buscou relacionar dados fisiológicos com os dados de atividade biológica e abundância de proteínas presentes em raízes de trigo (*Triticum aestivum*) cv. CD 104, inoculadas com a bactéria *H seropedicae* SmR1, utilizando as ferramentas da análise proteômica e dados da literatura, como os de Neiverth et al, (2014) onde a cv CD 104 não apresentou respostas significativas *in vitro* e a vaso na inoculação com a mesma bactéria; dados de Pankiewicz, V. C.S. et al. (2016), onde foi verificada a expressão de transcritos relativos à fixação biológica de nitrogênio na mesma variedade e dados de Camilios-Neto et al. (2014b), onde, esta variedade inoculada com *Azospirillum brasiliense*, responde com promoção do crescimento.

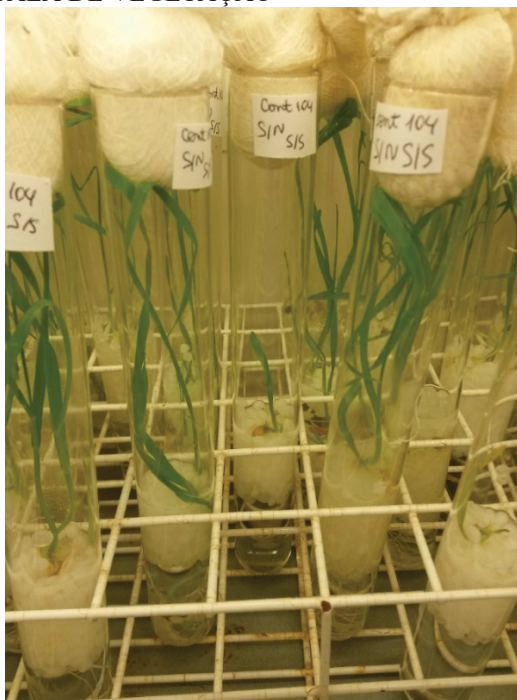
A análise proteômica diferencial habitualmente é capaz de fornecer dados de abundância de proteínas, e neste trabalho permitiram observar os possíveis efeitos de *H. seropedicae* no crescimento do vegetal posto que se trata de uma bactéria promotora do crescimento vegetal, a proteômica pôde distinguir os efeitos com relação onde as fontes de nitrogênio não foram fornecidas e da inoculação da bactéria.

A proposta deste estudo foi avaliar as raízes de plantas de trigo da variedade CD 104 obtidas *in vitro*, com 21 dias de desenvolvimento, livre de organismos (*Germ Free* – GF) e obtidas de sementes de maior vigor.

5.1 DESENVOLVIMENTO VEGETAL

As plantas se desenvolveram após a transferência da semente em meio de cultivo líquido por 21 dias, meio MS sem fonte de sacarose e com fontes de N (tratamento CN), 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), sendo que neste a inoculação ocorreu 24h após a transferência da semente. Neste tempo as plantas se encontraram no estágio de 3 folhas e 1 perfilho característico do ZADOK 1.3 (ZADOKS; CHANG; KONZAK, 1974). Porém, para as condições sem nitrogênio se apresentaram menores, mesmo assim ocupando todo o volume do tubo (Figura 1).

Figura 1 – CULTIVO *IN VITRO* DE TRIGO CV. CD104 A 25 (\pm 2) °C SOB FOTOPERÍODO DE 14 HORAS DE ESCURO E 10H DE LUZ EM SALA DE VEGETAÇÃO



Fonte: Colaboradora Dra. Adeline Neiverth.

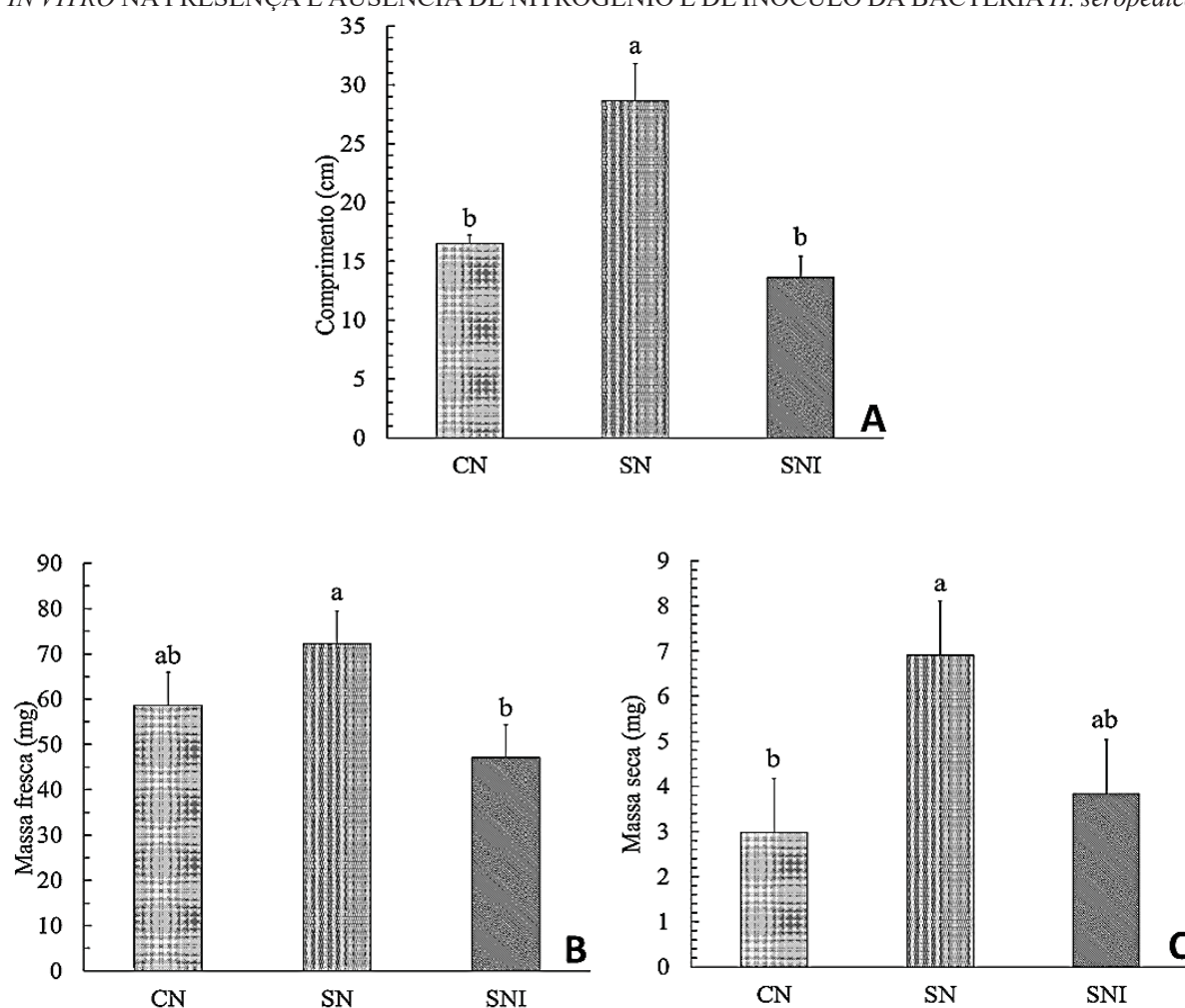
Foram avaliados os resultados para comprimento, massa fresca e massa seca de raiz após a separação da parte aérea.

Para comprimento de raiz, as plantas de trigo ao final de 21 dias de crescimento, no tratamento sem fonte de nitrogênio (SN), mostraram crescimento significativo em relação aos demais tratamentos, com fonte de nitrogênio (CN) e sem fonte de nitrogênio inoculado com *H. seropedicae* SmR1 (SNI) (Figura 2 A). Para massa fresca, a menor biomassa foi observada no tratamento SNI, tendo mostrado diferença significativa apenas entre os tratamentos SN e SNI, não diferindo entre os tratamentos SN e CN e CN e SNI (Figura 2 B). Já para a massa seca, os resultados demonstram que o menor valor foi para o tratamento CN, porém diferenças significativas não foi observada entre esse tratamento e o tratamento SNI, mas sim do tratamento SN. A maior massa seca foi observada no tratamento SN sendo que entre esse tratamento e SNI não apresentou diferença significativa (Figura 2 C).

Quando observados os dados obtidos para comprimento de raiz (Figura 2 A) de plantas de trigo do tratamento SN, percebe-se que, em média, suas raízes apresentam maior comprimento 42% em relação ao tratamento CN e 52% em relação ao tratamento SNI. Já o tratamentos CN é maior de 21% que SNI. Foi observado por (LI, YONGBIN et al., 2020) que a resposta de comprimento de raiz em condições de estresse por baixa disponibilidade de nitrogênio, foi semelhante aos nossos dados, porém, algumas variedades de trigo, podem não

apresentar crescimento significativo, quando comparado com raízes que cresceram em condições normais de disponibilidade de nitrogênio. Grover et al. (2021), afirmam que “vários estudos *in vitro* conduzidos para estudar o efeito da inoculação de PGPR no crescimento da planta e nas características da raiz, revelam que muitos PGPR reduzem o crescimento da raiz principal, aumentam o número e/ou comprimento das raízes laterais e estimulam o alongamento dos pelos da raiz, aumentando assim a absorção de água e nutrientes, resultando em aumento do crescimento e desenvolvimento da planta, concordando com o que foi observado nesse experimento.

Figura 2 – COMPRIMENTO DE RAIZ, MASSA FRESCA E SECA DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS *IN VITRO* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE NITROGÊNIO E DE INÓCULO DA BACTERIA *H. seropedicae*.



FONTE: o Autor (2020). Comprimento da raiz (cm) (A), massa fresca (mg) (B) e massa seca (mg) (C) 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 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. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) $n=10$.

Outra variedade, a CD120, oriunda da COODETEC tal como o CD 104, inoculada com o *H. seropedicae*, em meio MS completo com 1/10 da concentração, apresentou menor comprimento de raiz que o controle, não inoculado, indicando que a baixa concentração de nitrogênio aumenta o comprimento da raiz, mesmo em estádios de desenvolvimento superiores (NEIVERTH et al., 2014).

Os efeitos de promoção do crescimento das raízes e pelos laterais, induzido por AIA, foi observado em milho, inoculados com *Azospirillum brasilense*, germinado 10 dias em água, em 11 de 27 variedades ensaiadas, indicando efeito relativo à resposta do genótipo (ZEFFA et al., 2019).

A massa fresca de raiz (Figura 2 B) do tratamento SN apresenta a média dos dados obtidos superior aos demais tratamentos, 19% maior, em relação ao tratamento CN e 35% maior, em relação ao tratamento SNI. A comparação entre os tratamentos CN e SNI, resultou num acréscimo de 24% da massa fresca no tratamento CN.

Na comparação de massa seca (Figura 2 C), os resultados médios, demonstram que o tratamento SN foi 53% maior que o tratamento CN e 39% maior, em relação ao tratamento SNI. Entretanto o tratamento SNI foi 29% maior que o tratamento CN. Nossos resultados estão de acordo ao observado por Sinha et. al. (2020), devido ao translocamento de biomassa para a raiz, quando a planta se encontra em condições de privação de nitrogênio.

É notório que a diferença entre massa fresca e seca é a quantidade de água que se apresenta da maior para a menor dos tratamentos SN, SNI e CN que são respectivamente, 90%, 92% e 95% de diferença.

Os resultados obtidos em nosso experimento, como o incremento de massa fresca do tratamento SN, estão de acordo com o que foi obtido por Neiverth et. al. (2014), Sinha et. al. (2020).

Estatisticamente a massa fresca ou seca não foi diferente do controle com nitrogênio, porém, foi menor que o tratamento em meio sem nitrogênio. Em Zeffa et al., (2019), 22 de 27 variedades de milho aumentaram a massa seca na presença de *A. brasilense*, quando crescida em papel de germinação em água, portanto sem adição de nitrogênio.

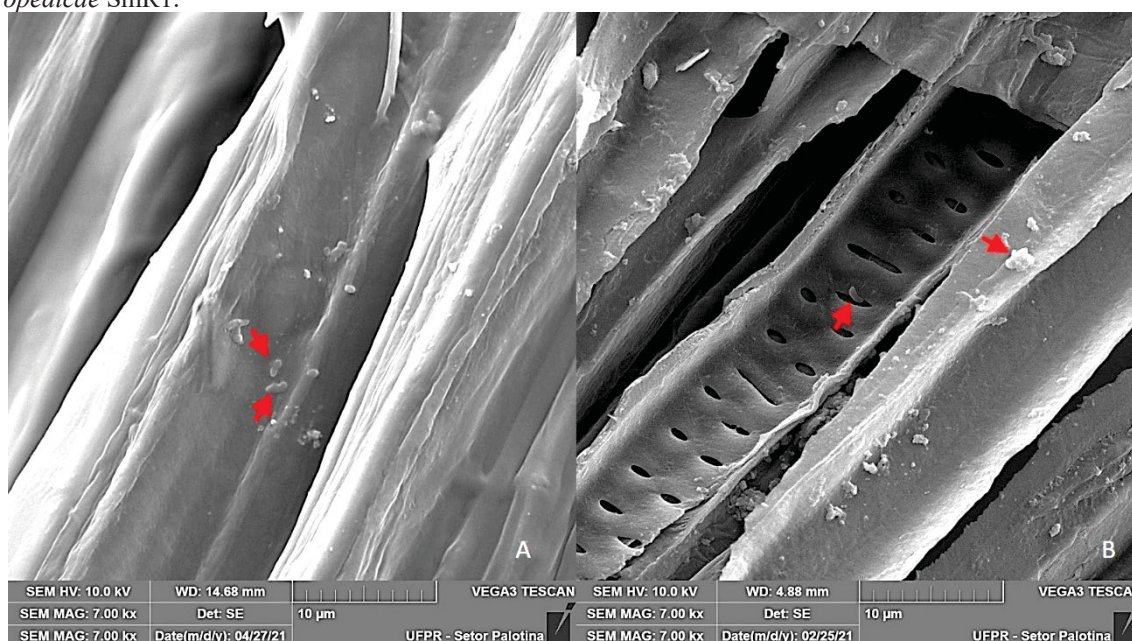
Em nosso trabalho, o efeito foi nítido apenas para o tratamento sem nitrogênio, que é bastante discutido na literatura o aumento da raiz em condições de estresse por nutrientes. Em raiz de *Populus sp.* foi demonstrado o mesmo efeito em que, não só aumento de massa foi observado, mas também o comprimento da raiz e que está relacionado esse desenvolvimento à fatores de transcrição específicos de raiz (WEI et al., 2013).

As respostas morfológicas em raízes é uma adaptação do sistema radicular às variações no suprimento de nitrogênio e são um excelente exemplo da plasticidade de desenvolvimento (ZHANG, HANMA; RONG; PILBEAM, 2007).

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS RAÍZES

Raízes das plantas de trigo foram coletadas para análise em microscópio eletrônico de varredura para avaliação morfológica e da presença da bactéria *H. seropedicae* SmR1 epifiticamente e endofiticamente. Foi confirmada a presença de *H. seropedicae* em raízes de trigo aderidas externamente nas regiões de maturação (Figura 3 A). Da mesma forma foi observado por Pankievicz et al. 2016, em menor período de desenvolvimento (3 D.A.I.). Não foi visualizada colônias bacterianas, porém foi observada a presença endofítica, especialmente em vasos xilemáticos na mesma região (Figura 3 B). Esta observação contraria o observado por Neiverth et. al. 2014, que usou outro método, fez observação em estágio de desenvolvimento mais avançada e o meio tinha alguma quantidade inicialmente de nitrogênio. Também foi verificada a presença epifítica de *H. seropedicae* na região de alongamento das raízes (Figura 4).

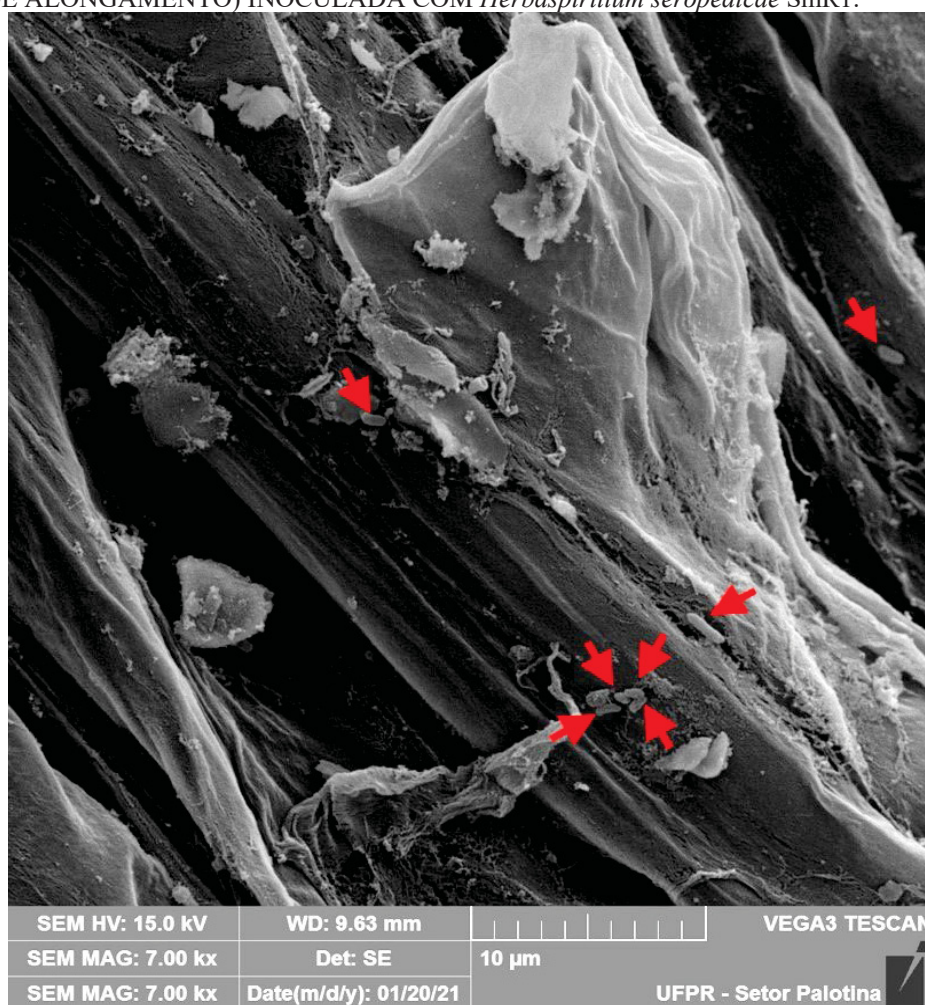
Figura 3 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE SUPERFÍCIE EXTERNA (a) E INTERNA (B) DE RAIZ DE TRIGO (REGIÃO DE MATURAÇÃO) INOCULADA COM *H. seropedicae* SmR1.



FONTE: O Autor (2020). Fotomicrografia eletrônica de varredura de raiz de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104 SNI, 20 dias após a inoculação (20 D.A.I.) sem emprego de ponto crítico, indicando a presença da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 em superfície externa da região de maturação da raiz. (A) e a presença de bactérias em vasos xilemáticos da mesma região (B) ampliada 7.000x, evidenciadas pelas setas vermelhas.

Foi observada a presença de bactérias endofíticas, na região de maturação da raiz (Figura 3 B), que, apesar da quantidade ser pequena, não havia relatos anteriores da presença endofítica de *H. seropedicae* em trigo cv. CD 104, como verificado por Neiverth et al. (2014). A presença endofítica de *H. seropedicae* foi demonstrada em raízes de milho por Balsanelli et al. (2013) e, em folhas de milho (ASTA et al., 2019). Embora descrita como uma espécie endofítica, *H. seropedicae* SmR1, não foi detectada por método de extração em microplaca por Neiverth et al., 2014. Neste trabalho, apesar de número pequeno, foi possível detectar a capacidade endofítica dessa bactéria nessa variedade de trigo.

Figura 4 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE RAIZ DE TRIGO (REGIÃO DE ALONGAMENTO) INOCULADA COM *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.



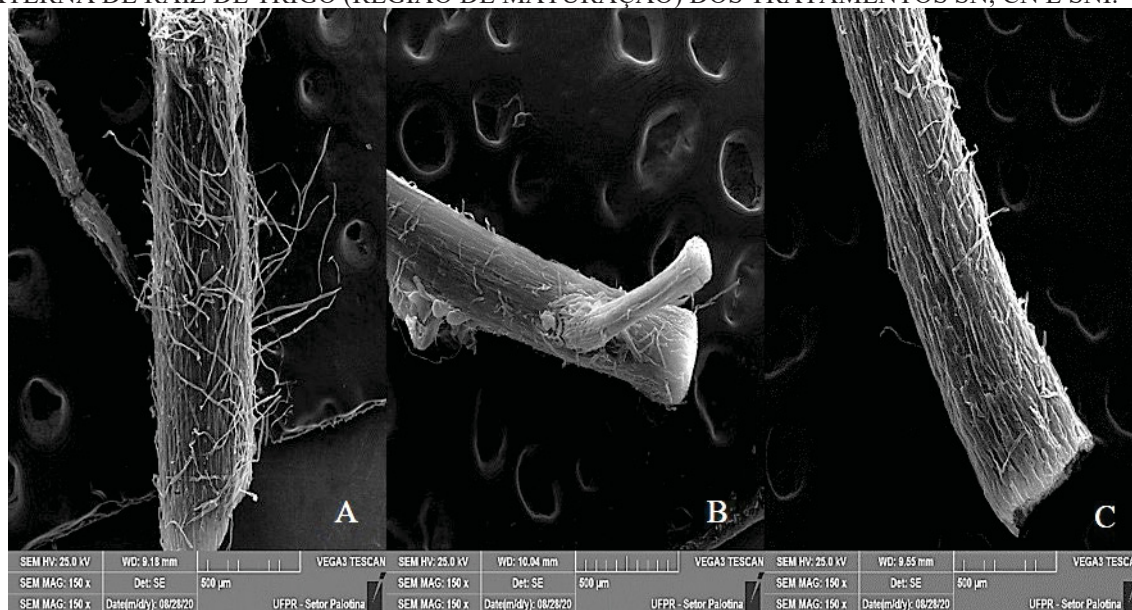
FONTE: O Autor (2020). Fotomicrografia eletrônica de varredura de raiz de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104 SNI, 20 dias após a inoculação (20 D.A.I.), sem emprego de ponto crítico, indicando a presença da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (setas vermelhas) colonizando a superfície da raiz na região de alongamento.

A Figura 5 mostra diferenças no desenvolvimento dos pelos radiculares analisadas com microscópio eletrônico de varredura das regiões de maturação dos tratamentos CN (Figura 5 A), SN (Figura 5 B) e SNI (Figura 5 C)

Quanto à presença de pelos radiculares na região de maturação, a Figura 5 mostra que o tratamento CN (Figura 5 A), apresenta quantidade de pelos radiculares maior que, SN (Figura 5 B) e último mostra quantidade superior que SNI (Figura 5 C), apresentando dados contrários ao verificado por Sinha et. al. (2020), onde seus dados mostram que a privação de nitrogênio, foi responsável pelo aumento na quantidade e tamanho de pelos radiculares. Nossos resultados também diferiram daqueles encontrados por Neiverth et. al. (2014), onde as raízes em meio MS/10 apresentou menor quantidade de pelos radiculares que o tratamento inoculado, entretanto, o meio não foi ausente de nitrogênio ou de fonte de carbono. O aumento na quantidade de pelos radiculares foi observado por Dobbelaere; Vanderleyden; Okon (2003), em plantas inoculadas com *Azospirillum brasiliense*, devido ao aumento na produção de ácido indol-acético (AIA). Outro fitôrmônio relacionado ao desenvolvimento é o ácido abscísico (ABA) que regula também o crescimento e as respostas ao estresse (CHEN, KONG et al., 2020), em especial por estresse abiótico, tal como descrito, algumas bactérias promotoras do crescimento vegetal podem sintetizar ou degradar o ABA, mas de uma forma ou de outra o seu efeito na planta promove o crescimento da parte aérea, das raízes e pelos radiculares (TSUKANOVA et al., 2017).

Em nosso experimentos o CN apresentou maior quantidade de pelos radiculares que SN, e SNI e SN menos que SNI. Em revisão apresentada por Liu, Bohan et al. (2020), o nitrato afeta o alongamento das raízes laterais, mas não a quantidade em *A. thaliana*, já em cereais como milho, trigo e cevada, as respostas podem variar de acordo com a espécie, assim como o estágio de desenvolvimento da planta. O aumento de pelos radiculares está relacionado ao aumento de área superficial e outras bactérias promotoras do crescimento vegetal também promoveram a formação de pelos, como em arroz e em trigo (ANTONELLA DI BENEDETTO et al., 2017; MIA; SHAMSUDDIN, 2009). Já foi demonstrado que *H. seropedicae* e outras bactérias endofíticas, usa como forma de entrada na raiz, os pelos radiculares em formação (SANTOYO et al., 2016) assim como os rizóbios em leguminosas (LAPLAZE; LUCAS; CHAMPION, 2015), e que essa infecção seja a razão para que as bactérias promovam a formação de pelos radiculares pois produzem o fitormônios responsáveis por esse desenvolvimento, como as auxinas e o etileno (PITTS; CERNAC; ESTELLE, 1998)(LI, ZHI et al., 2015).

Figura 5 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE SUPERFÍCIE EXTERNA DE RAIZ DE TRIGO (REGIÃO DE MATURAÇÃO) DOS TRATAMENTOS SN, CN E SNI.



FONTE: O Autor (2020). Fotomicrografia eletrônica de varredura de raiz de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104 SNI, 20 dias após a inoculação (20 D.A.I.), com o emprego de ponto crítico, mostrando a presença de pelos radiculares do tratamento com fonte de nitrogênio (CN) (A), sem fonte de nitrogênio (SN) (B) e sem fonte de nitrogênio inoculada com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (SNI) (C) da região de maturação da raiz. Imagens ampliadas 150x.

5.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Dois protocolos de extração de proteínas foram ensaiados para comparação: Vasconcelos et al. (VASCONCELOS et al., 2005) e Méchin et al. (MÉCHIN; DAMERVAL; ZIVY, 2007), conforme descritos em Materiais e Métodos. Foram realizadas as dosagens de proteína e verificados os perfis eletroforético em SDS-PAGE.

Protocolo prévio de concentração de amostra antes da análise por espectrometria de massa foi usado em ambos os ensaios de extração, isto é, a concentração da amostra no SDS-PAGE, tripsinização seguida de concentração em fase reversa. Os resultados obtidos da análise MS/MS foram tratados pelo software MaxQuant (TYANOVA; TEMU; COX, 2016).

Amostras destes protocolos foram enviadas em duplicata para realização de espectrometria de massas e os resultados estão mostrados na TABELA 3.

É possível observar o perfil proteico das amostras processadas pelos 2 protocolos apresenta pouca diferença. Houve variações de eficiência na extração de proteínas totais das triplicatas que se refletiram em dosagens de proteínas que variaram entre os valores de 21 à 45 mg·mL⁻¹ de proteínas totais.

TABELA 3 – RESUMO DE DADOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DOS PROTOCOLOS EM AVALIAÇÃO.

Total do resumo das identificações	Protocolo Méchin et al. 2007(MÉCHIN; DAMERVAL; ZIVY, 2007)	Protocolo Vasconcelos et al., 2005 com modificações
MS espectros	9.365	5.579
MS/MS espectros	11.168	31.795
Sequências de peptídeos verificadas	1.316	10.328
ID do banco de dados do trigo com 1 pep Único	376	1416
Nº total de peptídeos identificados	1.614	8.058
Peptídios únicos	550	4.066
Somatório das intensidades no espectro MS analisadas	7,1 x 10 ⁸	1,1 x 10 ¹¹
Intensidade de LFQ	7,5 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁹

FONTE: O autor (2021). Dados obtidos do sumário da espectrometria de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific – U.S.A.) e dos resultado das análise de identificação de proteínas pelo software MaxQuant, usando banco de dados de trigo (*Triticum aestivum*).

Os resultados da espectrometria de massas mostraram diferenças importantes. Sendo elas em especial observadas na quantidade de espectros de MS e MS/MS e ainda em identificações realizadas pelo software MaxQuant (TYANOVA; TEMU; COX, 2016). Apesar do número maior de espectros de MS observado no protocolo de Mechín et al, (2007) comparado ao de Vasconcelos et al, (2005), este último apresentou muito maior número de espectros e sequências peptídicas verificadas. Esses dados analisados pelo Software MaxQuant, mostraram 3,7 vezes mais identidades do banco de dados contendo pelo menos um peptídios único, 5 vezes mais peptídios em proteínas identificadas e 7,4 x mais peptídios únicos no protocolo de Vasconcelos et al, (2005).

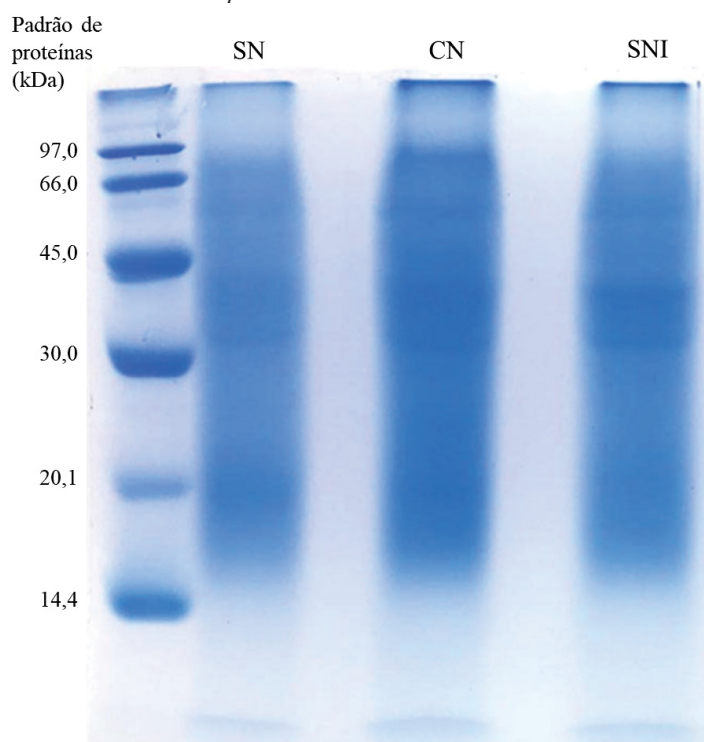
A razão do número de peptídios identificados por espectros MS/SM tem sido usado como medida para avaliação dos resultados em espectrometria de massas e quanto maior esse valor, então haverá um menor número de cross-linking entre os peptídios da amostra indicando uma melhor qualidade na amostra (RUDNICK et al., 2016). Nesta comparação de protocolos de extração, além de uma razão maior nos resultados de MS para as amostras de Vasconcelos et al, (2005), também foi obtido um maior número de peptídios únicos por número total de peptídios identificados. Possivelmente, o protocolo de Mechín et al (2007) possa ser melhorado, mas esse não foi o objetivo do estudo.

Embora não tenha sido o melhor protocolo para os objetivos de Ceruso et al. (2015) o protocolo baseado no de Mechín et al (2007), isto é, por precipitação em acetona e TCA da amostra também foi ensaiado na extração de proteínas em *Mytilus galloprovincialis*. Em Singh

(2015) o protocolo de TCA/acetona foi preferido para sementes tal como o protocolo de Vasconcelos et al (2005). Os trabalhos indicam que existe muita relação com o tipo de tecido a ser extraído, em caso de tecido vegetal, e suas especificidades de uso. Nos trabalhos citados anteriormente, os extratos de proteínas foram aplicadas em eletroforese (CERUSO et al., 2015; SINGH et al., 2015). A interferência de metabólitos secundários e os agentes surfactantes e caotrópicos de extração são especialmente prejudiciais à obtenção de espectros de MS/MS, assim como a quebra do tecido vegetal são dificuldades nos protocolos de extração que devem ser considerados (MIKULÁŠEK et al., 2021).

Considerados o resultado dessa avaliação, foi definido o protocolo de Vasconcelos et al, (2005) para ser aplicado nas amostras em estudo nesse trabalho. Assim sendo as raízes da cv. CD 104 que foram submetidas aos tratamentos SN, CN e SNI foram tomadas para obtenção de extrato de proteínas totais segundo o protocolo de Vasconcelos et al, (2005) com as modificações descritas em materiais e métodos (Figura 6).

Figura 6 - PERFIL DE PROTEÍNAS EM SDS-PAGE 12% DESCONTÍNUO DE RAIZ DE TRIGO OBTIDAS DOS MEIOS DE CULTIVOS SEM (SN) E COM (CN) FONTE DE NITROGÊNIO E SEM NITROGÊNIO INOCULADO COM A BACTÉRIA *H. seropedicae*.



FONTE: o Autor (2020). Amostras de proteínas extraídas de raízes 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 (\pm 2) °C e fotoperíodo de 14 horas de luz por 20 dias a partir da inoculação. Foram aplicados os extratos de proteínas no gel correspondendo a 218 μ g, 219 μ g (CN) e 219 μ g de proteínas totais, respectivamente das raízes obtidas dos tratamentos, SN, CN e SNI. O padrão de peso molecular utilizado foi LMW calibration kit for SDS electrophoresis da GE Healthcare.

5.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

As análises proteômicas resultaram em dados importantes a serem discutidos, contudo o seu volume é muito extenso portanto foram realizadas análises conjuntas por aplicação de software de análises de dados proteômicos.

Os dados proteômicos obtidos por espectrometria de massas (LC-MS/MS) em um equipamento LTQ Orbitrap XL ETD retornou resultado com 13.397 proteínas e 16.470 espécies de íons de peptídeos utilizando o software PatternLab For Proteomics, versão 5.0, (PatternLab V) (CARVALHO et al., 2016a). Após aplicadas restringências de máxima parcimônia (ZHANG, BING; CHAMBERS; TABB, 2007), de considerar os XIC do estado de carga preferencial do peptídeo, isto é, o obtido em todo o experimento que gera o maior XIC; de considerar proteínas com no mínimo um peptídeo único, e, de considerar XIC aceitáveis aqueles com no mínimo seis (06) pontos, foram resumidas a 1061 identificações proteicas, sendo que todas puderam ser quantificadas por XIC, e estas identificações com 6349 espécies de íons peptídicos, usando uma tolerância de 20 ppm em massa/carga (m/z) dos espectros de MS1.

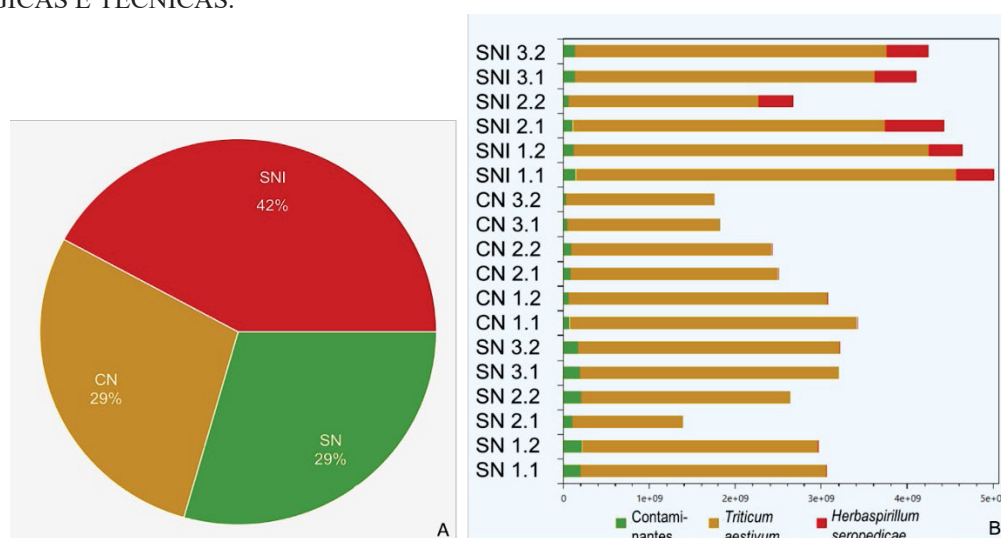
Essas 1061 proteínas foram oriundas dos tratamentos SN, CN e SNI, porém foram encontradas, respectivamente, 535, 519 e 765 proteínas em cada tratamento (Figura 7). Esses dados evidenciam que muitas proteínas são encontradas em comum entre os tratamentos.

Na Figura 8, em B, é apresentada a somatória da intensidade dos XIC considerando cada réplica técnica de cada réplica biológica. Nestes dados podemos ver que apenas nos tratamentos SNI são encontradas proteínas de *H. seropedicae* e que os contaminantes presentes significaram uma parte pequena dos resultados e puderam ser identificados pelo PatternLab V e serem retirados nas análises seguintes. Também é notável que 2 das réplicas técnicas não apresentaram próximas em resultados e que, apesar de terem se seguidos os mesmos passos de extração de proteínas, eletroforese para envio das amostras, tripsinização, purificação de proteínas, a performance da espectrometria de massa não foi semelhante, tal resultado pode ser o que pode estar relacionado ao destaque de dados diversos em termos de comprimento, massa fresca e seca de raiz e também a uma maior semelhança entre os dados de vias metabólicas entre os tratamentos CN e SNI.

É possível observar a redução significativa entre o número de proteínas identificadas, antes (13397) e depois da aplicação de restringências (1061), o que é uma redução à 8% do inicial aplicadas. porém, consideramos um bom número de identificações, com dados consistentes. Em trabalho recente de proteoma em raiz de trigo foram identificadas 6294 proteínas quantificadas confiáveis com um *False discovery rate* - taxa de descoberta falsa, FDR

$\leq 1\%$ e detectada em pelo menos duas réplicas biológicas (LI, LE et al., 2019), implicando serem dados mais numerosos que os nossos em se tratando de 2 amostras avaliadas apenas. Outra trabalho apresentou 3075 proteínas (XU et al., 2019). Estas diferenças, nas quantidades, podem indicar excesso nas restringências. Em trabalhos realizados pelo mesmo grupo de pesquisa da FIOCRUZ – ICC e com o mesmo equipamento usado nesse trabalho foram identificadas entre 3 a 4 mil proteínas em tecido mamários (GOMIG et al., 2019).

Figura 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS IDENTIFICAÇÕES OBTIDAS NO PATTERNLAB V (A) E SOMATÓRIA DAS INTENSIDADES DOS XIC OBTIDOS DOS DADOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS PROTEÍNAS RAIZ DE TRIGO OBTIDAS NAS CONDIÇÕES SN, CN E SNI A PARTIR DE RÉPLICAS BIOLÓGICAS E TÉCNICAS.



FONTE: PatternLab V editado pelo autor (2021). Percentual relativo às quantidades de proteínas identificadas (A). Em B o primeiro número significa uma das réplicas biológicas e o segundo número uma das réplicas técnicas da realizadas na espectrometria de massas das proteínas extraídas de raízes 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.

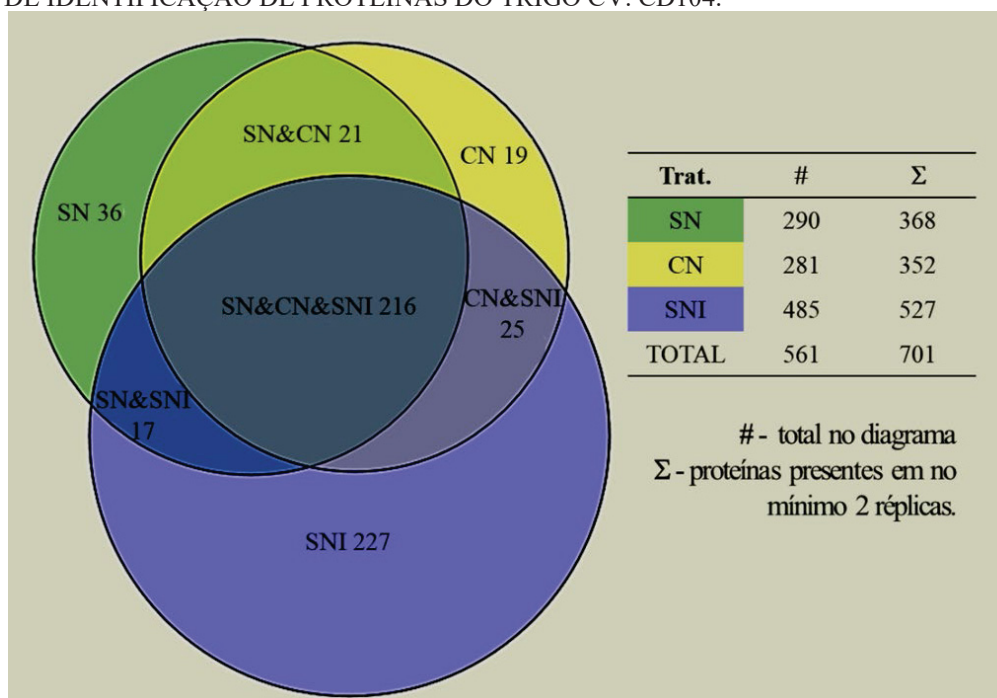
O software PatternLab V também possibilitou a análise dos dados por separação das identificações nos tratamentos e estes geraram diagramas de Venn triplo, onde os três tratamentos foram comparados, e duplos, comparando tratamentos de 2 em 2. Nestas análises foram retiradas as proteínas contaminantes e identificações de possíveis genes reversos, além de se fixar a presença da proteína (grupo de proteína/isoformas) em pelo menos 2 réplicas biológicas de modo restrigente.

A comparação entre os três tratamentos, CN, SN e SNI (Venn triplo) pode ser observada na Figura 9. De acordo com este diagrama, a cv. CD104 apresentou 290, 281 e 485 proteínas nos tratamentos CN, SN e SNI, respectivamente. As proteínas presentes exclusivamente nos tratamentos nesta comparação foi de 19, 36 e 227, respectivamente para os tratamentos CN, SN

e SNI, sendo que em SNI, das 227 proteínas, 211 proteínas foram identificadas como proteínas de *H. seropedicae* SmR1, portanto sendo apenas 17 proteínas do trigo. A interseção entre os tratamentos CN&SN, SN&SNI e CN&SNI, no Venn triplo, apresentou 21, 17 e 25 proteínas e na interseção entre CN&SN&SNI, foram identificadas 216 proteínas. As interseções significam proteínas em comum ou presentes em comum, mas sem informação de proporção ou abundância em cada comparação. Entretanto é possível observar que os tratamentos CN e SNI apresentam o menor número de proteínas de trigo exclusivas (19 e 17) do que SN, e que apresentam o maior número de proteínas na sua interseção (25).

O diagrama de Venn apresentado na Figura 8, mostra os resultados da comparação entre os tratamentos da cv CD 104 para as proteínas identificada. Os dados revelam que o número de proteínas identificadas na comparação entre os três tratamentos não diferiu significativamente para o número de proteínas totais, porém quando analisamos o número de proteínas específicas, fica evidente um aumento no número de proteínas exclusivas do tratamento SN em comparação aos demais. Sendo o primeiro indício de que o efeito da bactéria sobre as raízes aproximou o tratamento inoculado (SNI) do tratamento controle com nitrogênio (CN). Esta fato pode estar relacionada a característica de promoção do crescimento vegetal da bactéria presente no meio SNI. Em trigo, foi demonstrado que uma bactéria fixadora de nitrogênio, *Klebsiella pneumoniae*, aliviou os sintomas da deficiência em nitrogênio e aumentou o nitrogênio total, embora os efeitos na raiz tenham sido diferentes (INIGUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004).

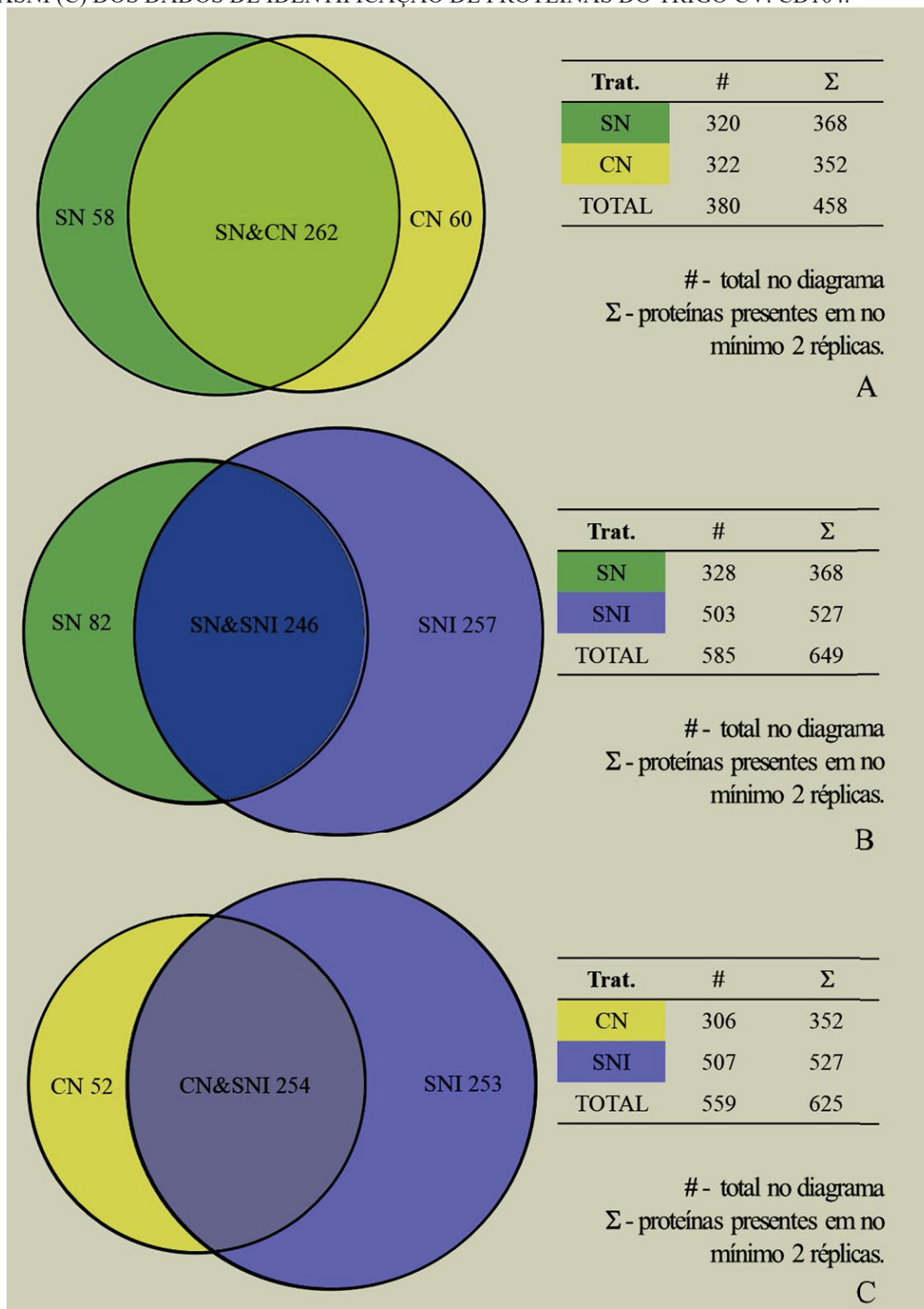
Figura 8 - DIAGRAMA DE VENN DE COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, SNxCNxSNI DOS DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TRIGO CV. CD104.



FONTE: PatternLabV editado pelo autor (2020). Análise proteômica de raízes de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com (CN), sem (SN) adição de fontes de nitrogênio, 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 2 repetições.

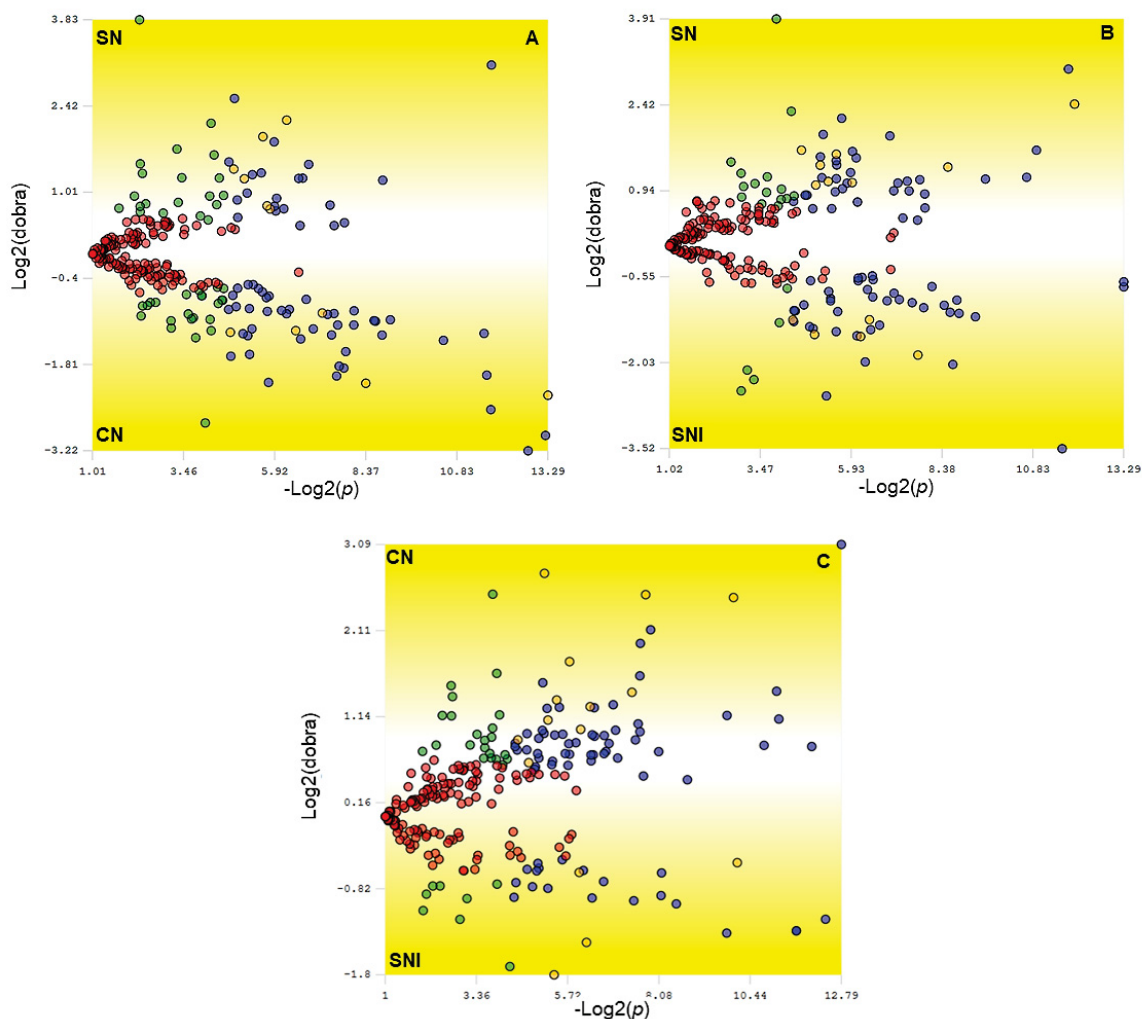
Com objetivo de reunir os dados das proteínas identificadas como presentes exclusivamente em cada tratamento e incluir os dados quantitativos (espectrometria de massas tipo *Label free*) ou abundância diferencial de proteínas que se encontravam nas interseções, foi necessário fazer comparação duplas e para isso foram obtidos os dados em diagramas de Venn duplos ou pareados entre os tratamentos: CN&SN, CN&SNI e SN&SNI (Figura 9 A, B e C). Isto foi devido ao uso do aplicativo para os dados quantitativos, T-Fold, do *software* PatternLab V. Esse aplicativo faz análise de abundância significativas apenas de modo pareado. Os dados são apresentados na distribuição de Vulcão na Figura 10 A, B e C.

Figura 9 – DIAGRAMA DE VENN DE COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, SNXCN (A), SNXSNI (B) E CNXSNI (C) DOS DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TRIGO CV. CD104.



FONTE: PatternLabV editado pelo autor (2020). Análise proteômica de raízes 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, 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 2 repetições.

Figura 10 – DISTRIBUIÇÃO DE DADOS QUANTITATIVOS NAS COMPARAÇÕES ENTRE OS TRATAMENTOS SNXCN (A), SNXSNI (B) E CNXSNI (C).



FONTE: PatternLab V, editado pelo autor. Pontos azuis correspondem a identificações de proteínas, que satisfazem o *q-value cutoff* e a variável de *fold change*, enquanto os pontos vermelhos não atendem a nenhum desses. Os pontos verdes satisfazem o *fold change* mas não o *q-value cutoff*. Os pontos laranjas, foram pontos azuis, porém os valores de quantificação foram muito baixos.

5.4.1 Comparação entre CN & SN

Para os tratamentos CN e SN, na comparação CN&SN, foram identificadas 262 proteínas. Dessas, 65 atendiam aos critérios *q-value cutoff* e a variável de *fold change*, portanto consideradas como pontos azuis na Figura 10 A, sendo 44 proteínas identificadas como mais abundantes nas raízes do tratamento CN (TABELA SUPLEMENTAR 1) e 21, mais abundantes em raízes do tratamento SN (TABELA SUPLEMENTAR 2). As demais identificações, 11 foram consideradas de valor muito baixo de quantificação (pontos laranjas), 43 identificações, satisfazem o *fold change* mas não o *q-value cutoff* (pontos verdes) e 143 não satisfizeram o *q-value cutoff* e a variável de *fold change* (pontos vermelhos). Somando então temos 104

proteínas diferencialmente expressas (*differentially abundant proteins* – DAP) em CN e 79 em SN. Estes números diferiram muito das DEP observadas nos trabalhos em raízes de trigo citados (JIAN et al., 2020; XU et al., 2019).

60 exclusivas presentes no tratamento CN e 58 proteínas exclusivas no tratamento SN (TABELA SUPLEMENTAR 3 e TABELA SUPLEMENTAR 4). Das proteínas exclusivas nas raízes do tratamento CN, na comparação CN&SN, 18 das 60 foram proteínas não caracterizadas, que após a aplicação de *Blast p*, mapeamento em *Gene Ontology* (GO) e anotação, através da ferramenta Blast2GO receberam alguma anotação, sendo 6 do próprio banco de dados do *T. aestivum* (WHEAT), 2 do banco de dados de *Zea Mays* (MAIZE) e 10 do banco de dados de *O. sativa japonicus* (ORYSJ). Entretanto, muitas dessas, ainda desconhecidas quanto a função. Destacaram-se: de trigo 3 identidades diferentes para montagem do genoma, cromossomo: II (A0A1D5UV66, A0A1D5V0W9 e A0A1D5URZ0), uma glutathione transferase (Q8RW01), uma proteína intrínseca tonoplástica (A7J2I4) e uma inibidora de xilanase (A7BJ78). De milho, a enzima 3-N-debenzoil-2-desoxitaxol N-benzoiltransferase (B6TQC0).

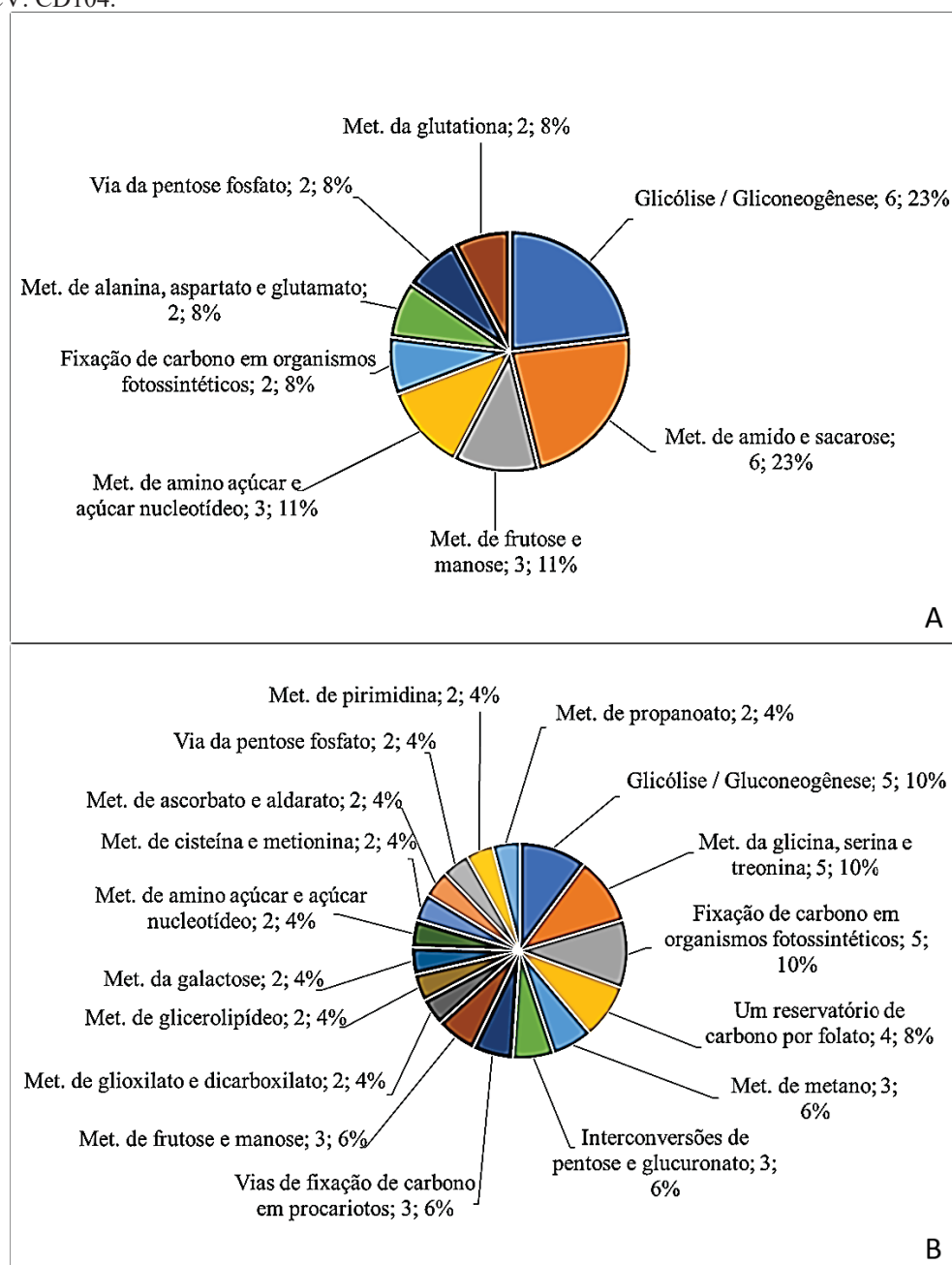
Entre as mais abundantes do tratamento CN, na comparação CN&SN, 10 identidades das 44, foram de proteínas não identificadas. Usando a mesma ferramenta para anotação, destacam-se de trigo (WHEAT): 2 proteínas contendo domínio da peptidase A1 (A0A3B6FJ19 e A0A3B6FJ19), 2 gluteínas tipo A2 (A0A3L6DAW0 e A0A3L6DAW0) e uma proteína ribossomal L6 60S (A0A3B6QGW3).

Na comparação ainda de CN&SN, entre as proteínas exclusivas de SN 14 das 58 identificações foram de proteínas não caracterizadas e que puderam receber alguma anotação através do Blast2GO, como descrito acima. Destacando-se, de trigo (WHEAT), 2 proteínas transportadoras de sacarose 2D (A0A075FFX7 e A0A075FFX7), uma protease de subtilisina associada à senescência (U3LW54) e Glutathione-S-transferase, Cla47 (Q8LGN6_WHEAT) e U16 (B4FB36_MAIZE).

Foram obtidos do software Blat2GO a partir dos dados anotados, proteínas correspondentes a enzimas presentes no catálogo do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e as vias do metabolismo em que possivelmente essas enzimas se encontraram. Essas buscas foram feitas para as proteínas identificadas como exclusivas no tratamento CN e no tratamento SN na comparação CN&SN e para as proteínas identificadas e anotadas como mais abundantes presentes na interseção entre mesmos tratamentos (CN&SN). Desses dados foram gerados gráfico de distribuição para aquelas vias com maior número de EC classificadas pelo KEGG (*Enzyme Commission number* ou *EC number*) e de identidades

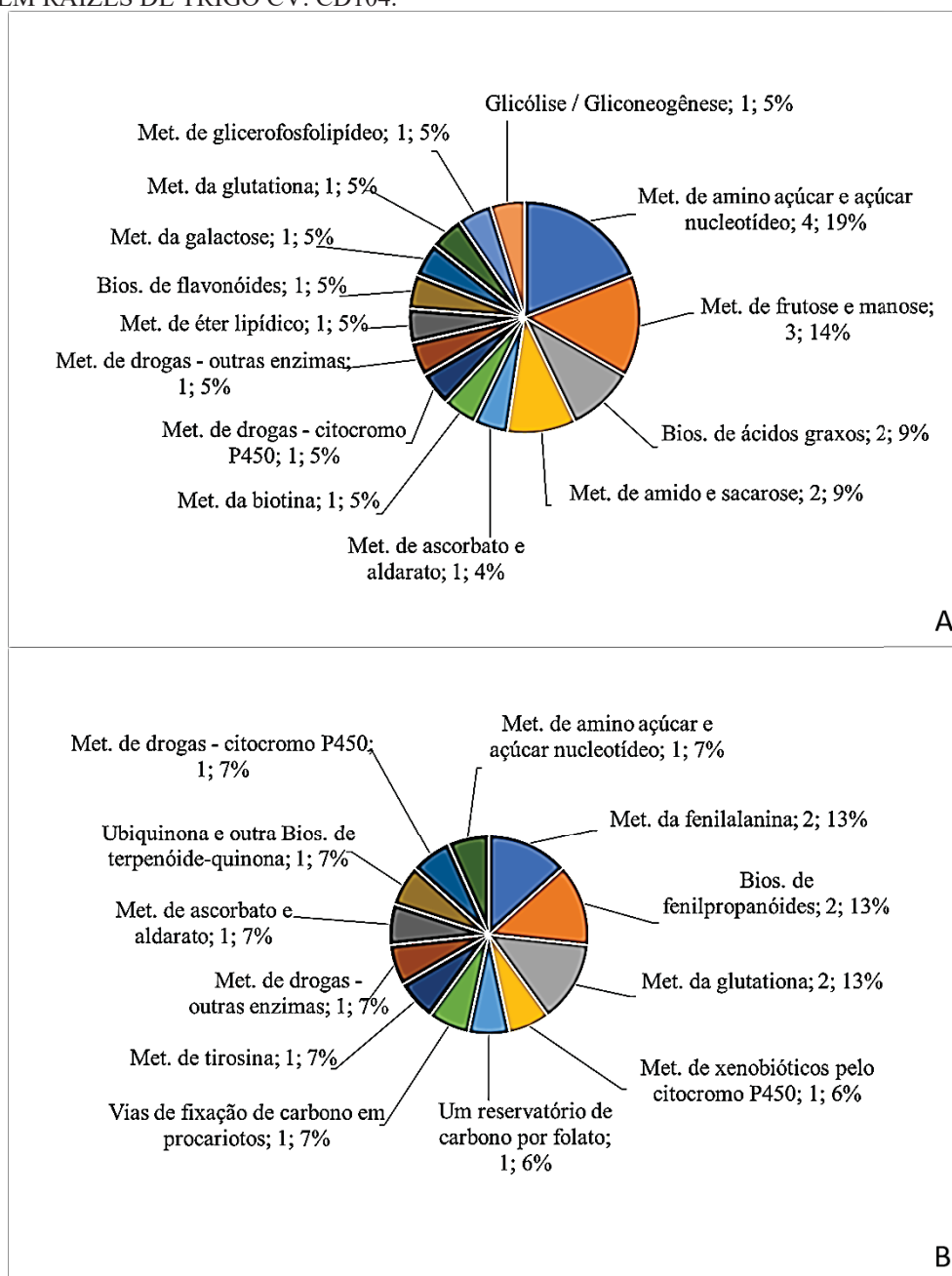
proteicas representadas, nas vias. A Figura 11 mostra as vias mais representadas por mais de uma identidade nas exclusivas e mais abundantes, respectivamente de CN (A) e CN (B) e na Figura 12 as vias exclusivas e mais abundantes, respectivamente, SN (A) e SN (B).

Figura 11 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVAS (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO CN NA COMPARAÇÃO CNXSN EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.



FONTE: o Autor (2021). Dados obtidos através da anotação e busca na base de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Proteínas exclusivas (A) e mais abundantes (B) provenientes da análise proteômica de raízes de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose e com fonte de nitrogênio (CN).

Figura 12 - DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS EXCLUSIVAMENTE NO TRATAMENTO SN (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO SN NA COMPARAÇÃO CN&SN EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.



FONTE: o Autor (2021). Dados obtidos através da anotação e busca na base de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Proteínas exclusivas provenientes da análise proteômica de raízes de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose e com fonte de nitrogênio (CN).

Para poder inferir a respeito do estado fisiológico de cada tratamento na comparação entre CN e SN foram reunidas as informações das proteínas exclusivas e mais abundantes das vias metabólicas e o número de E.C. do KEGG que estava sendo representadas em cada tratamento de modo a ter todas as vias. Assim foi possível verificar as vias e, portanto, a

predominância fisiológica da da raiz em cada tratamento, porém obtidas na comparação CN&SN.

As vias que mais se encontraram representadas em enzimas e em identificações no tratamento CN foram, glicólise / gliconeogênese, metabolismo de frutose e manose, de amido e sacarose, amino açúcar e açúcar nucleotídeo, da galactose, fixação de carbono em organismos fotossintéticos e via da pentose fosfato, todas relativas ao metabolismo de carboidratos e ainda ao metabolismo de energia. E ainda as vias do metabolismo de glicina, serina e treonina, de alanina, aspartato e glutamato, relativa ao metabolismo de aminoácidos e ainda algumas enzimas do metabolismo de cofatores e vitaminas e do metabolismo de lipídios. A observação no KEGG das vias mais representadas em identificações indicou que todas estas vias são relacionadas especialmente ao metabolismo de energia e de carboidratos. Este resultado foi constatado, pela verificação da repetição em muitas E.C. de enzimas e de identidades que se repetiram em vias do metabolismo distintas, porém próximas. Como foi o exemplo da E.C. 2.7.1.2 – glicocinase, encontrada na via da glicólise/gliconeogênese e no metabolismo de açúcares aminados e nucleotídeos, de amido e sacarose e de galactose, tendo a mesma identidade proteica.

No tratamento SN, as identificações e enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos (Metabolismo de açúcares aminados e nucleosídeos e de frutose e manose) possuíam em comum 6 sequências relacionadas. Seguida de representante, em atividades que estavam presentes no metabolismo da glutathione, de ascorbato e aldarato, de drogas - citocromo P450 e outras enzimas e de xenobióticos pelo citocromo P450. Ainda se seguindo a estas, seguiram-se as vias fortemente representadas por atividades da fenilalanina amônia liase, com representante da biossíntese de metabólicos secundários, como biossíntese de fenilpropanoides, ubiquinona e de terpenóide-quinona e metabolismo de fenilalanina.

Na TABELA SUPLEMENTAR 1 entre as enzimas, identificadas, está a Alanina glioxilato aminotransferase que está relacionada à via do glutamato, e enzimas inibidoras de xilanase, e uma xilose isomerase, essa enzima específica, costuma ter expressão reduzida na maioria das espécies de plantas e está relacionada a incorporação de carbonos através da xilose que é convertida em D-xilulose, passando a fazer parte da via das pentoses-fosfato (HALDRUP; NOERREMARK; OKKELS, 2001). O glutamato está envolvido na resposta ao estresse abiótico e na arquitetura de raiz, que em *A. thaliana* respondeu positivamente, retomando o crescimento, quando tratadas com glutamato exógeno (QIU et al., 2020). As alanina aminotransferases são enzimas que respondem ao estresse abiótico por hipóxia em soja (*Glycine max*) e mais que dobrou durante o período avaliado por De Sousa, C A F; Sodek, (2003),

retornando aos níveis normais após a normóxia. Os genes relacionados às enzimas inibidoras de xilanase foram significativamente expressos em plantas de arroz transgênicas, mostrando resposta à microrganismos patogênicos (ZHAN et al., 2017) e Tokunaga; Esaka, (2007), mostraram a expressão acentuada de genes relacionados a inibidoras de xilanase em arroz (*Oryza sativa*) em resposta ao estresse abiótico.

Em CN, na comparação CN&SN (Figura 11 A), as identificações de atividade desidrogenase estão presentes entre as representantes do metabolismo de carbono, principalmente ligado à fixação do carbono, glicólise / gliconeogênese, via das pentoses-fosfato e do pool de carbonos do folato. Em estudo com uma espécie selvagem de trigo, a presença de enzimas do metabolismo de carbono indicou, que o metabolismo primário pode ser modulado para estabelecer uma nova homeostase e que em estresse de curto prazo as enzimas na via das pentoses-fosfato estavam aumentadas; mas diminuíam com aumento do estresse (LIU et al., 2015). Desta forma indicando para a condição controle, CN, uma condição de estresse de curto prazo e que o metabolismo de carbono está ativo. Trabalho apresentado por Wang, Jingyi et al. (2019) demonstrou que a via da glicólise / gliconeogênese é enriquecida na resposta a tolerância ao estresse, assim como as vias da fosforilação oxidativa e metabolismo de carbono em plantas de trigo sob estresse.

Entre as vias do metabolismo que representam as proteínas exclusivas e mais abundantes em CN (Figura 11 A e 11 B), respectivamente, é possível observar que metabolismo primário está representado.

Em vias do metabolismo que estão comuns nessa condição, porém representadas por enzimas distintas são as vias glicólise / gliconeogênese, via da pentose fosfato, metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo, metabolismo de frutose e manose e fixação de carbono em organismos fotossintetizantes. Da mesma forma, foi observado por Xu et al (2019) e Wang, Jingyi et al. (2019), o aumento na abundância dessas vias. Em variedade de batata tolerante ao estresse por ausência de nitrogênio essas vias também foram melhor representadas (JOZEFOWICZ et al., 2017). O CD 104 é uma variedade dita tolerante ao estresse hídrico (COODETEC, 2014).

As proteínas identificadas e agrupadas, oriundas da comparação entre os tratamentos CN&SN e mais abundantes no tratamento SN, demonstrados na TABELA SUPLEMENTAR 2, 23,5% das proteínas como não caracterizadas. Kang et al. (2019) encontrou resultados semelhantes (23,7%) para proteínas não caracterizadas em mudas de trigo em condições de deficiência de nitrogênio. Esse resultado pode ser atribuído à complexidade do genoma do trigo, fazendo com que as pesquisas relacionadas, demandem mais tempo.

As peroxidases podem responder por 1% do total de proteínas de alguns tipos celulares (FERRARI et al., 2014). A presença de NAD(P)H desidrogenase pode ser um indicio do aumento da oxigenação na raiz. Entre as proteínas identificadas está a Fenilalanina amônia liase (FAL) (A0A3B6NR18), relacionada a questões de estresse biótico e abiótico (DIXON; PAIVA, 1995). A FAL, em trigo infestado com *Diuraphis noxia*, apresentou incremento de 3 vezes (BERNER; VAN DER WESTHUIZEN, 2010). Houve incremento na abundância da FAL quando sob estresse salino, como observado por Gholizadeh; kohnehrouz (2010). As sulfotransferases (A0A3B5Y3I8), que corresponderam a 5,9% das enzimas, apresentou o maior valor de dobra igual a 8,5 em SN na interseção de CN&SN. Hirschmann; Krause; Papenbrock (2014), relacionaram a presença dessa enzima ao estresse sob ausência de nitrogênio. Jin et al. (2019), também observou que houve incremento de genes relacionados a expressão de sulfotransferases em *A. thaliana* e *Brassica rapa* sob estresse salino.

A representatividade enzimas, em especial entre os mais abundantes do tratamento SN (Figura 12B), de enzimas que participam do metabolismo da glutathione (GSH) pode estar relacionado ao desenvolvimento do meristema apical da raiz pois a glutathione reduzida (GSH) atua como um redutor de peróxido de hidrogênio (YU, XIN et al., 2013), além de responder a diversos estímulos como seca, patógenos, metais pesados, H₂O₂, entre outros, levando ao aumento de GSH (KUMAR; TRIVEDI, 2018). O metabolismo da lignina está representado no tratamento exclusivamente no SN (Figura 12A) em comparação ao CN. Essa via é muito importante na formação de lignina, um importante componente da parede celular vegetal, principalmente em gramíneas, onde a lignina originada de tirosina corresponde a 50% (SCHENCK; MAEDA, 2018).

Em outro trabalho, foi também avaliada a importância e a maior representatividade de enzimas da via metabolismo da fenilalanina e biossíntese de fenilpropanoides pois são ativas na produção de lignina, o que está relacionado aumento da raiz e multiplicação celular (QIN et al., 2019; SCHENCK; MAEDA, 2018).

No trabalho com trigo cultivado em meio líquido com baixa concentração de nitrogênio é possível identificar as vias do metabolismo de fenilpropanoides e de éter lipídicos (XU et al., 2019) que também estão representada também na raiz cultivada em condição SN.

As enzimas em SN relacionadas ao metabolismo de Glutathione são transferases, relacionada ao metabolismo de xenobióticos. Quatro identificações têm a mesma atividade de Glutathione transferase (E.C.2.5.1.18). Apesar de que no tratamento CN também foi verificado o metabolismo da Glutathione e aparecem identificações de uma de outra glutathione transferase com uma 6-fosfogluconato desidrogenase relacionada a produção de NADPH (uma

descarboxilase) que pertence a via das pentoses fosfato (E.C.1.1.1.44) indicando que o metabolismo de carboidratos é funcional, cada uma dessas vias foi representada por 1 identificação. O metabolismo antioxidante se expressa tanto em condições normais quanto de estresse. Porém, em condições de estresse ou condições adversas, o metabolismo antioxidante não lida a ponto de anular os efeitos deletérios (HASANUZZAMAN et al., 2019). A maior expressão de genes de 6-fosfogluconato desidrogenase estava relacionado ao aumento de níveis de ácido jasmônico (jasmoil-isoleucina) e peróxido de hidrogênio e diminuição dos níveis de etileno induzidos pela infestação por inseto (CHEN, LIN et al., 2020). Ácido Jasmônico é um fitohormônio relacionado a resistência ao estresse, possivelmente a presença dessa enzima sugira esse aumento de resistência na condição do CN.

O metabolismo de amino açúcares e nucleotídeos em SN é representado pela atividade de provável uridina difosfato glucuronato carboxi-liase (E.C.4.1.1.35) que está relacionada a síntese de UDP-xilose (UDP-Xil). O produto dessa enzima é um açúcar nucleotídeo necessário para a síntese de diversos polissacarídeos da parede celular vegetal, incluindo xiloglucano (HARPER; BAR-PELED, 2002). A presença das enzimas confirma a direção de biossíntese de parede celular, indicada pela presença do metabolismo da fenilalanina e fenilpropanoides.

5.4.2 SN & SNI

Na comparação entre os tratamentos SN&SNI (Figura 10 B), as proteínas identificadas como exclusivas presentes no tratamento SN foram 82 e no tratamento SNI foram 257, sendo, porém, 46 proteínas do banco de dados de trigo (TABELA SUPLEMENTAR 5 e TABELA SUPLEMENTAR 6), e 211 proteínas identificadas como da bactéria *H. seropedicae* (do banco de dados do *H. seropedicae*, TABELA SUPLEMENTAR 7).

Na intersecção SN&SNI foram identificadas 246 proteínas. Dessas 246, pela análise de abundância relativa, 72 atendiam aos critérios *q-value cutoff* e a variável de *fold change*, portanto consideradas como pontos azuis na distribuição de Vulcão (Figura 11 B), sendo 33 proteínas ou identidades proteicas mais abundantes nas raízes do tratamento SN (TABELA SUPLEMENTAR 8) e 39, mais abundantes em raízes do tratamento SNI (TABELA SUPLEMENTAR 9). As demais identificações, 11 foram consideradas de valor muito baixo de quantificação (pontos laranjas), 43 identificações, satisfazem o *fold change* mas não o *q-value cutoff* (pontos verdes) e 143 não satisfizeram o *q-value cutoff* e a variável de *fold change* (pontos vermelhos).

Somando temos proteínas diferencialmente expressas (*differentially abundant proteins* – DAP) em SN foram 115 e em SNI, 85.

Das proteínas exclusivas nas raízes do tratamento SN, na comparação SN & SNI, 30 das 82 foram proteínas não caracterizadas, que após a aplicação de *blast-p*, mapeamento em *Gene Ontology* (GO) e anotação, através da ferramenta Blast2GO receberam alguma anotação, sendo 4 subunidades ribossomos, 2 pequenas e 2 grandes do próprio banco de dados do *T. aestivum* (WHEAT), 4 de Montagem do genoma, cromossomo: II (A0A7H4LM68, A0A1D5V061 e A0A1D5THS1 WHEAT) (essas atividades também foram verificadas no CN em CN&SN, mas as identidades proteicas foram diferentes), 4 glutationa-S-transferase, sendo uma do banco de dados de *O. sativa japonicus* (Q7XCK0, ORYSJ) e as demais de trigo (B4FB36, Q8LL15 e Q8LGN6, WHEAT). Ainda 3 identidades distintas de O-metiltransferases (B4ERX7 e Q2R6G9, WHEAT), sendo uma da família anotada a partir do banco de dados de *O. sativa japonicus* (Q9ZRC1, ORYSJ). Uma proteína ainda permaneceu sem de anotação e outras com atribuição de domínios e 3 prováveis atividades.

Entre as mais abundantes do tratamento SN, na interseção SN&SNI, 11 identidades das 33, foram de proteínas não identificadas do banco de dados do trigo. Usando a mesma ferramenta para anotação, destacaram-se para completar as proteínas ribossomais mais uma subunidade pequena (B6SNQ7, MAIZE), uma de montagem de genoma, cromossomo II, (A0A0C4BIW4, WHEAT), mais uma glutationa-S-transferase (Q8LL15, WHEAT) e 2 identidades, O-metiltransferase, que se assemelham a mesma identidade de trigo (B4ERX7, WHEAT) e 3 outras que se assemelharam a proteína da família O-metil-transferase de *O. sativa japonicus* (Q2R6G9, ORYSJ). Dentro desse grupo de proteínas não caracterizadas no banco de dados do trigo, destaca-se a protease de subtilisina associada à senescência (U3LW54, WHEAT). Esta última, tendo sido a mesma subtilisina (U3LW54) encontrada na comparação CN&SN. As subtilases desempenham diversas atividades no desenvolvimento das plantas, incluindo a formação de raízes laterais e resposta à patógenos (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

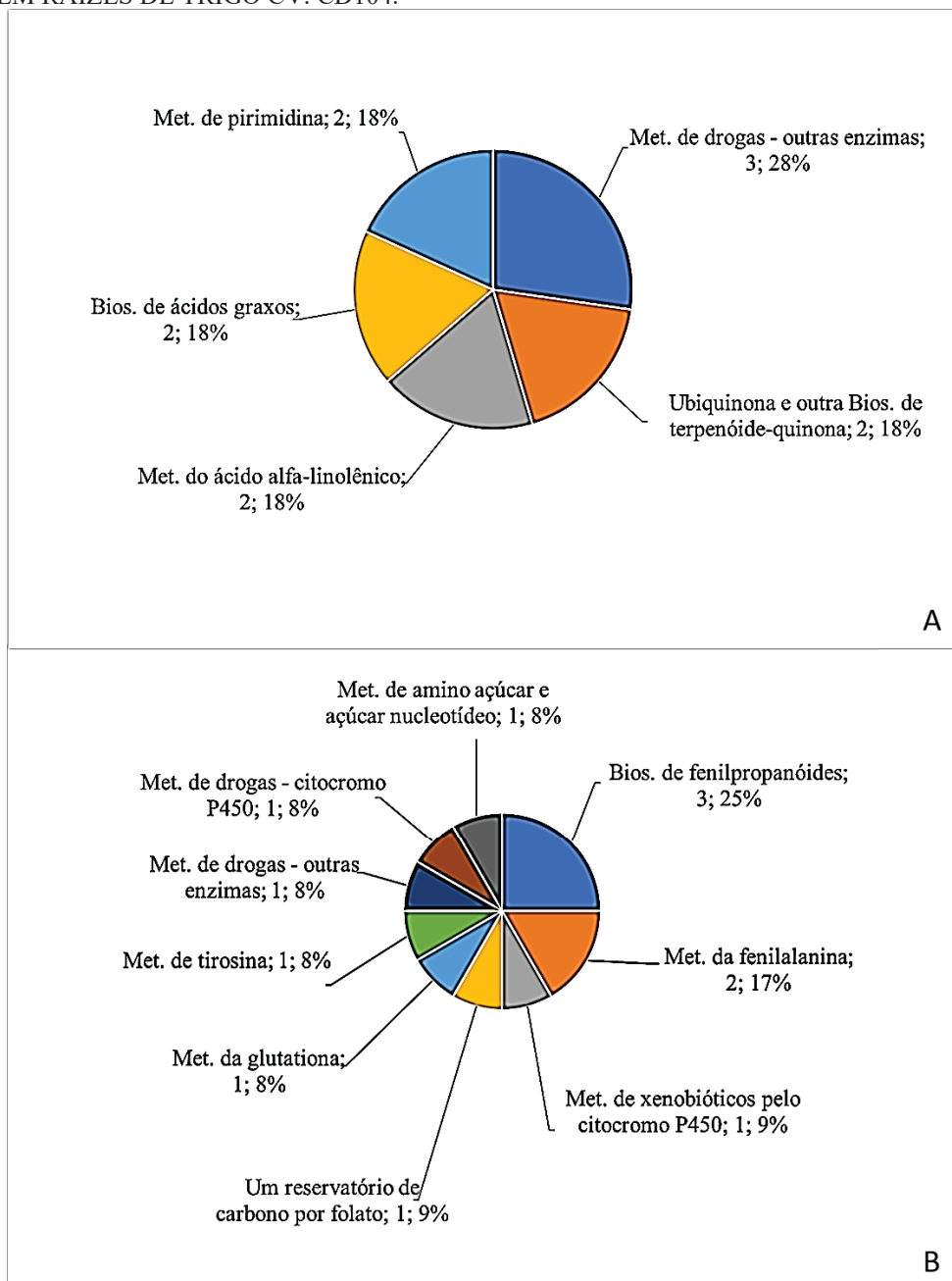
Das proteínas exclusivas em SNI 16 das 46 foram proteínas não identificadas. Das que encontraram anotação no banco de dados de arroz (ORYSJ) uma proteína homóloga de glicose e ribitol desidrogenase (GRDH), uma aleno óxido de sintase 4 (C74A4) e seis dessas que tiveram identidade com proteínas de arroz que também não tem função biológica atribuída. Com homologia no banco de dados de milho (MAIZE), foi atribuída uma triose fosfato isomerase 5 (B6SMQ5) e uma calnexina (B6TNF1). Proteínas de trigo, não caracterizadas que encontram semelhança com proteínas do mesmo banco de dados foram 2 de montagem de genoma: cromossomo II (A0A1D5V0W9 e A0A7H4LPC5), um fragmento de uma provável

beta-1,3-endoglicosidase de glicanas (Q5CAL1), uma glutathione transferase (Q8RW01), alanina-glioxilato aminotransferase (D2KZ10) e uma proteína contendo domínio de epimerase (A0A3B6H433).

Entre as proteínas mais abundantes no tratamento SNI na comparação SN&SNI, sete de 39 proteínas foram proteínas não caracterizadas no banco de dados do trigo. Chama atenção uma óxido de aleno sintase (T1WRJ1, WHEAT), que se soma a encontrada como exclusiva e é descrita como envolvida na produção de moléculas sinalizadoras em plantas, a partir de hidroperóxidos de ácido linolênico e linoleico (TIJET; BRASH, 2002). E ainda duas proteínas que se assemelharam as gluteína de milho (A0A3L6DAW0_MAIZE), sendo estas proteínas de reserva (JIANG et al., 2014). E ainda 2 dessas proteínas não caracterizadas foram propostas como proteínas contendo domínio de peptidase A1 (A0A3B6FJ19_WHEAT), uma nucleoredoxina (A0A6G7MCI4_WHEAT) e outra identidade de provável beta-1,3-endoglicosidase de glicanas (D8L9Q2_WHEAT) que também se soma àquela das proteínas exclusivas.

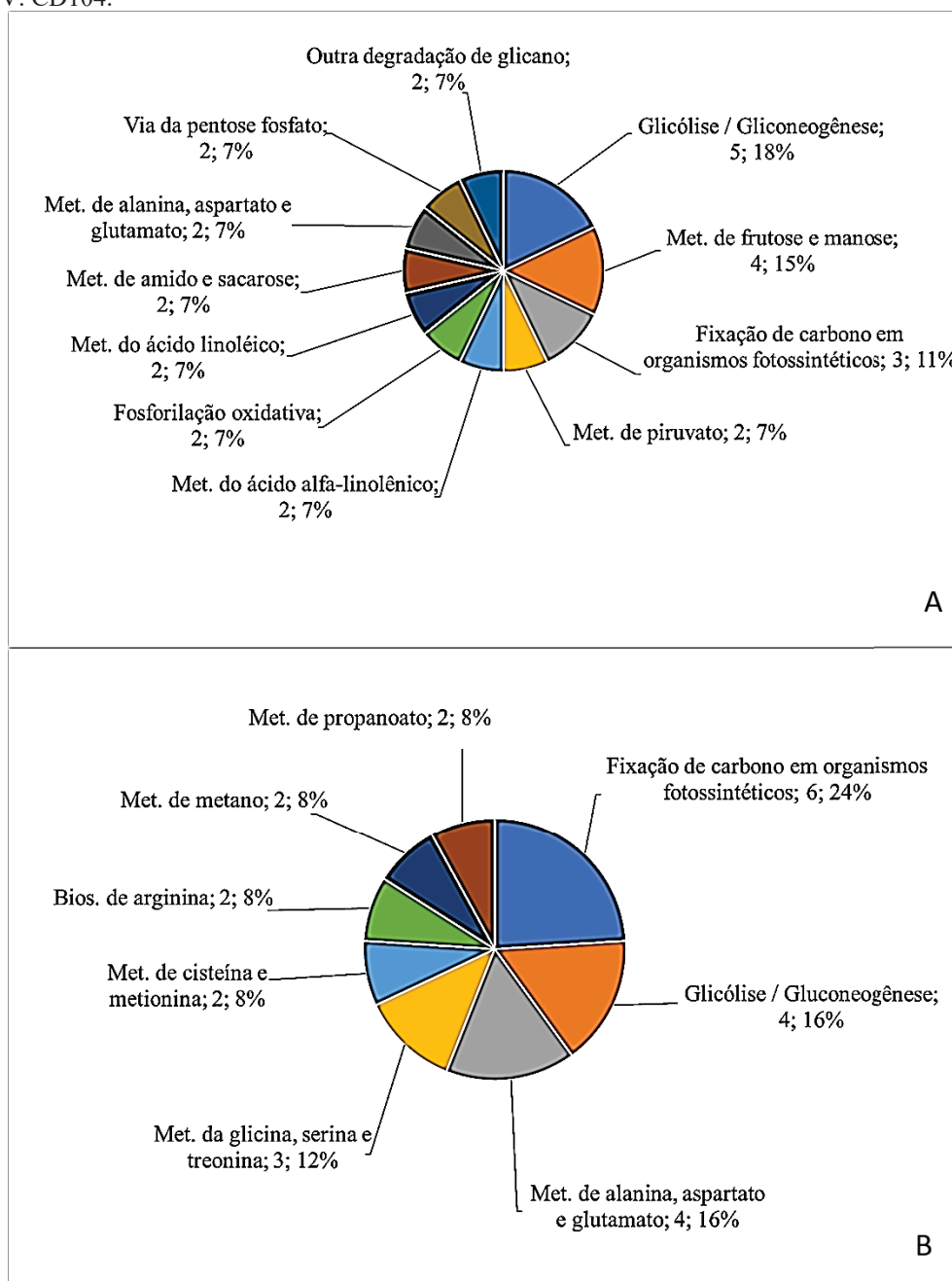
Nesta comparação, SN&SNI também foram obtidos do software Blat2GO a partir dos dados anotados, proteínas correspondentes a enzimas presentes no catálogo do KEGG e as vias do metabolismo em que possivelmente essas enzimas se encontraram. Foram verificadas as vias e as enzimas que se relacionam para as proteínas identificadas e anotadas como exclusivas no tratamento SN e no tratamento SNI na comparação SN&SNI e para as proteínas identificadas e anotadas como mais abundantes nos mesmos tratamentos presentes na interseção SN e SNI. Desses dados foram gerados gráfico de distribuição para aquelas vias com maior número de identidades proteicas representadas. A Figura 13 mostra as vias mais representadas por mais de uma identidade nas exclusivas e mais abundantes, respectivamente de SN (A) e SN(B) e a Figura 14, mostra as vias exclusivas e mais abundantes do tratamento SNI (A e B), respectivamente, na comparação entre os tratamentos SN e SNI.

Figura 13 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVOS NO TRATAMENTO SN (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO SN NA COMPARAÇÃO SNXSNI EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.



FONTE: o Autor (2021). Dados obtidos através da anotação e busca na base de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Proteínas exclusivas provenientes da análise proteômica de raízes 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 (SN).

Figura 14 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVAS (A) E MAIS ABUNDANTES (B) PARA O TRATAMENTO SNI NA INTERSEÇÃO SN&SNI EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.



FONTE: o Autor (2021). Dados obtidos através da anotação e busca na base de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Proteínas provenientes da análise proteômica de raízes 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 a bactéria *H. seropedicae* (SNI).

Para poder inferir a respeito do estado fisiológico de cada tratamento na comparação entre SN e SNI foram reunidas as informações das vias metabólicas e o número de enzimas do catálogo do KEGG que estava sendo representadas em cada tratamento. Assim foi possível verificar as vias predominantes em cada tratamento da comparação SN & SNI.

De fato, quando se reúne os dados das proteínas exclusivos com as mais abundantes é possível verificar a contribuição ou somatória desse conjunto para inferir a respeito da fisiologia da raiz nas condições de cultivo, tanto pela presença de proteínas complementares como observação de proteínas de um complexo, portanto reforçando o conceito de proteínas diferencialmente expressas pois são produto de expressões de genes.

Em SN, o metabolismo de droga – outras enzimas, se destaca por apresentar 3 atividades enzimáticas diferentes, porém uma delas com 8 identidades proteicas distintas (W5ERE6, A0A3B6TRP9, A0A3B5ZU59, A0A3B6IS32, A0A3B6IVD7, A0A3B6EIU5, A0A3B5XZ69, A0A3B5YXR1). As mesmas 8 atividades de transferases são a única atividade encontrada na via de metabolismo de drogas – Citocromo P-450, metabolismo de glutathiona de xenobióticos por citocromo P450 com uma única EC (2.5.1.18).

E ainda, vias da biossíntese de fenilpropanoides com 4 atividades enzimáticas do catálogo de enzimas (E.C.) sendo dois códigos distintos para a mesma atividade fenilalanina amônia liase, porém com as mesmas identidades proteicas. As mesmas que aparecem na via de metabolismo de fenilalanina com as mesmas EC todas para a mesma atividade e identidades.

Os fenilpropanoides são um grupo de metabólitos secundários de plantas derivados da fenilalanina e que possuem uma ampla variedade de funções tanto como moléculas estruturais quanto de sinalização. A fenilalanina é inicialmente convertida em ácido cinâmico por desaminação, seguido por hidroxilação e metilação, frequentemente para gerar ácido cumárico e outros ácidos com uma unidade fenilpropano. A redução dos grupos carboxila ativados com a CoA desses ácidos resulta nos aldeídos e álcoois correspondentes. Os álcoois são chamados de monolignóis, os compostos iniciais para a biossíntese da lignina (KANEHISA; GOTO, 2000). Já as enzimas que metabolizam drogas são chamadas de oxidase de função mista ou monoxigenase e contêm muitas enzimas, incluindo citocromo P450, citocromo b5 e NADPH-citocromo P450 redutase e outros componentes podem estar relacionados ao metabolismo oxidativo de ácidos graxos, drogas lipofílicas e outro produto químico (SHEWEITA, 2000).

As vias que se destacam em número de atividades enzimáticas em seguida são as vias metabolismo do ácido alfa-linolênico e de açúcares aminados e nucleotídeos, com respectivamente 2 E.C. cada, e com 3 e 2 proteínas identificadas. Por último, uma cinase do metabolismo de pirimidina, provável pirimidina nucleosídeo monofosfato quinase. Esta enzima eucariótica é uma enzima bifuncional que catalisa a fosforilação de CMP e UMP com eficiência semelhante. O dCMP também pode atuar como aceptor relacionada ao metabolismo de drogas e outras enzimas (KANEHISA; GOTO, 2000).

Entre as enzimas mais abundantes e exclusivas no tratamento SN em comparação ao tratamento SNI, estão peroxidases, enzimas relacionadas ao metabolismo da glutathione, relacionadas ao estresse biótico e abiótico. Ma et al. (2016) demonstrou que o metabolismo da glutathione foi regulado positivamente em raízes de trigo sob estresse osmótico, podendo atuar na proteção da raiz sob estresse oxidativo e peroxidação lipídica. As peroxidases podem estar envolvidas em uma série de funções na planta, que vão desde resposta a agentes patogênicos, germinação de sementes, amadurecimento de frutos, catabolismo de auxinas e tolerância ao estresse, como demonstrado por Pandey et al., (2017), quando as peroxidases podem atuar na lignificação da parede celular. A glutathione, através da glutathione S-transferase (GST), pode se ligar a uma série de compostos xenobióticos, protegendo, dessa forma, a planta do estresse abiótico. A superexpressão de genes relacionados a GST em *A. thaliana*, como demonstrado por Kumar; Trivedi, (2018), pode ser uma forma de proteger a planta contra o estresse oxidativo.

Quando comparamos os resultados obtidos na comparação entre os tratamentos SN&SNI, as vias exclusivas e mais abundantes no tratamento SN (Figuras 13 A e 13 B) são: biossíntese de fenilpropanoides, metabolismo de drogas e outras enzimas, com 4 identidades de enzimas em cada via; biossíntese de ácidos graxos, metabolismo da fenilalanina, metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo, metabolismo de pirimidina, metabolismo da glutathione, metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450, metabolismo de drogas - citocromo P450, compartilham a mesma enzima (E.C.2.5.1.18) uma glutathione transferase, metabolismo do ácido alfa-linolênico, ubiquinona e outra biossíntese de terpenoide-quinona, com 2 identidades de enzimas em cada uma das vias. O metabolismo de drogas e outras enzimas e o metabolismo de piridina, compartilham a mesma enzima, uma transferase (E.C.2.7.4.14 – quinase). As pirimidinas participam, desde a biossíntese de nucleotídeos e macromoléculas até a biossíntese de carboidratos complexos e a regulação metabólica do metabolismo intermediário (ZHOU; LACROUTE; THORNBURG, 1998). As enzimas presentes no metabolismo de ubiquinona e terpenoide-quinona, fazem parte da via do metabolismo de fenilpropanoides, que por sua vez estão relacionadas a produção de lignina na parede celular (SCHILMILLER et al., 2009), e o enriquecimento dessas vias pode ser um indicativo de estresse na planta.

Proteínas assemelhada à subtilisina, que são serino proteases, também foi observada como uma DAP em raízes de canola submetida a baixos níveis de nitrogênio (QIN et al., 2019). Foi observada que subtilisina é expressa dentro do endosperma de sementes em desenvolvimento para promover a mobilização de nitrogênio necessário (THOMPSON; BURSTIN; GALLARDO, 2009).

No trigo as Cafecoil-CoA 3-O-metiltransferases (CCoAOMTs) pertencem a um grupo de enzimas que realizam a transferência do grupo metil de S-adenosilmetionina para o grupo hidroxila e, desempenham papéis importantes na biossíntese de lignina e flavonoides (MA, QING HU; LUO, 2015). Esta expressão coincide com a expressão de O-metiltransferase (Q9ZRC1) (TABELA SUPLEMENTAR 4), enzimas da biossíntese de flavonoides observada e pode estar indicando a síntese de lignina na condição SN.

Assim como em CN, na comparação CN&SN, em SNI&SN comparação como SN mostra atividades principais representadas por identificações das vias do metabolismo de carboidratos e de energia. Mais especificamente, a glicólise / gliconeogênese estão representadas em inúmeras E.C. (9 com subclasses) e 11 identidades, 2 delas apresentando a mesma atividade de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase NAD(P) e enolase, em especial pela presença de fosfofrutocinase-1, enzima específica para a via glicolítica. Outra via, a da fixação de carbono em organismos fotossintéticos, com 8 atividades do E.C. e 12 identidades proteicas, está marcada pela presença da D-ribulose 1,5-difosfato carboxilase, enzima da fixação do Carbono, uma outra GAPDH NADP específica, fosfoglicerato cinase, fosfotriose isomerase e glutâmico-oxaloacetato transaminase. Seguindo de modo decrescente, a via que se apresenta é a via do metabolismo da alanina, aspartato e glutamato, que inclui 3 E.C. para a glutâmico-oxaloacetato transaminase e a alanina-glioxilato aminotransferase. Esta última enzima, parece estar relacionada com a via da fixação de carbono, pois é uma aminotransferase peroxissomal com um papel na fotorrespiração. A fotorrespiração é um desvio metabólico que é custoso em energia para a célula e que serve para a reciclagem do fosfoglicolato produzido pela atividade da RUBISCO em fosfoglicerato, interligando com a via da glicólise / gliconeogênese (BLOOM, 2015; RAHMANI et al., 2017).

Ainda é relevante o número de atividades enzimática que estão representadas por identificações na via do metabolismo de frutose e manose, também do metabolismo de carboidratos, com 4 E.C. distintas e 4 identidades proteicas. Destaca-se a atividade endo-1,4-beta-manosidase, que hidrolisa de ligações (β 1 - 4) de mananas, galactomananas e glicomananas. Esta atividade enzimática está relacionada a degradação da parede celular durante o amadurecimento dos frutos (GARCIA-SECO et al., 2017). Ainda em vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos, temos a via de interconversões de pentose e glucuronato, pelas 3 E.C apresentadas, aparentemente ligam a glicólise pela presença da atividade fosfofrutocinase-1 e a desidrogenase do glucoronato, intimamente ligada ao metabolismo de ascorbato e aldarato.

As vias de biossíntese de arginina e metabolismo de glicina, serina e treonina, cada uma representada por 3 enzimas, todas transaminases, porém 5 identidades proteicas distintas, também foram observadas. Das transaminases, ainda não descritas aqui, a hidroxipiruvato: L-alanina transaminase e serina-piruvato transaminase se destacam. Essas são relacionadas a processos que ligam o metabolismo do carbono e do nitrogênio e mantêm os níveis redox e de energia celular sob condições de estresse (IGAMBERDIEV; KLECZKOWSKI, 2018).

Destacamos ainda 2 atividades relacionadas ao metabolismo de linoleato, uma delas linoleate: O₂ 13-oxidoreductase, que é uma lipoxigenase comum de planta que oxida linoleato e alfa-linolenato, que insere oxigênio molecular na posição C-13 com configuração (S). Esta enzima produz precursores para vários compostos importantes, incluindo o hormônio vegetal ácido jasmônico (ROYO et al., 1996). E ainda linoleato hidroperóxido isomerase (óxido de aleno sintase), que atua sobre vários hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados, formando os óxidos de aleno correspondentes. O produto da reação acima é instável e sofre ação da aleno-óxido ciclase (não verificada neste grupo), para formar o derivado de ciclopentenona (15Z) - 12-oxofito-10,15-dienoato (OPDA), que é o primeiro metabólito cíclico e biologicamente ativo na via de biossíntese do jasmonato (LAUDERT et al., 1996).

Entre as vias com maior abundância no tratamento SNI (Figura 14 B), na comparação com o tratamento SN, destacam-se fixação de carbono em organismos fotossintéticos e Glicólise / Gliconeogênese, com 9 identificações em cada via; metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, com 6 identificações; metabolismo de frutose e manose, com 4 identificações; biossíntese de arginina, metabolismo da glicina, serina e treonina e metabolismo de metano, apresentam 3 identificações de enzimas em cada via; fosforilação oxidativa, metabolismo de amido e sacarose, metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo, metabolismo de cisteína e metionina, metabolismo de éter lipídico, metabolismo de fosfato de Inositol, metabolismo de glicerofosfolípido, metabolismo de glioxilato e dicarboxilato, metabolismo de piruvato, metabolismo de propanoato, metabolismo do ácido alfa-linolênico, metabolismo do ácido linoleico, outra degradação de glicano e via da pentose fosfato, apresentam 2 identidades de enzimas em cada uma das vias. Dessas 21 vias, 5 apresentam enzimas com atividade de transaminase (alanina – transaminase), essa enzima é chave na ligação do metabolismo primário de carbono à síntese de aminoácidos, convertendo alanina em piruvato e glutarato (KENDZIOREK; PASZKOWSKI; ZAGDAŃSKA, 2012) presentes nas vias de fixação de carbono, metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, biossíntese de arginina, metabolismo de metano e metabolismo de cisteína e metionina. Plantas de milho que cresceram em solo contendo bactérias promotoras de crescimento, tiveram sua produtividade e

tolerância ao estresse aumentados, devido à mudanças metabólicas, na indução do metabolismo da alanina, aspartato e glutamato (DHAWI; HESS, 2017).

A presença das vias relacionadas ao ácido linolênico, um ácido graxo de grande importância na constituição da membrana celular (SIMOPOULOS, 2002), em comum entre os dois tratamentos, SN&SNI, são mais um indicativo de que a planta encontra-se sob estresse, uma vez que essa classe de moléculas estão envolvidas na transdução de sinal intracelular, modificação de proteínas e construção de parede celular (CAO et al., 2016). As vias relacionadas à alanina, aspartato e glutamato, foram reguladas positivamente, possivelmente, em resposta ao estresse de oxigênio. Outra via encontrada e que responde à hipóxia, é a via de metabolismo do piruvato para produção de lactato através da enzima álcool desidrogenase (E.C. 1.1.1.2) em tecidos anóxicos de raízes de *arabidopsis*, conforme descrito por Limami et al. (2008).

Em destaque podemos relacionar a Calnexina que foi verificada como mais expressa em milho tolerante ao estresse hídrico na situação de estresse hídrico e está relacionada a maior conteúdo relativo de água. Essa proteína, juntamente com a calreticulina são proteínas de enovelamento ativadas pela agregação de proteínas (MAHESWARI et al., 2021).

5.4.3 CN & SNI

Entre os tratamentos CN&SNI (Figura 9 C) foram identificadas 52 (TABELA SUPLEMENTAR 10) e 253 proteínas exclusivas de cada tratamento, respectivamente, CN e SNI, sendo deste último, 42 proteínas de trigo (TABELA SUPLEMENTAR 11) e 211 proteínas da bactéria *H. seropedicae* (TABELA SUPLEMENTAR 7). Evidentemente que, as 211 proteínas de *H. seropedicae* SmR1 identificadas nas comparações CNxSNI e SNxSNI são exatamente as mesmas pois são exclusivas do tratamento SNI, no qual houve inoculação.

Para a intersecção entre CN&SNI, foram identificadas 254 proteínas. Destas, 254 pela análise de abundância relativa, 72 atendiam aos critérios *q-value cutoff* e a variável de *fold change*, portanto consideradas como pontos azuis na distribuição de Vulcão (Figura 11 C), sendo 52 proteínas ou identidades proteicas mais abundantes nas raízes do tratamento CN (TABELA SUPLEMENTAR 12) e 20, mais abundantes em raízes do tratamento SNI (TABELA SUPLEMENTAR 13). As demais identificações, 15 foram consideradas de valor muito baixo de quantificação (pontos laranjas), 30 identificações, satisfazem o *fold change* mas não o *q-value cutoff* (pontos verdes) e 137 não satisfizeram o *q-value cutoff* e a variável de *fold change* (pontos vermelhos).

Destas, então, formam um grupo de DAP na comparação CN&SNI um total de 104 proteínas em CN e 62 proteínas em SNI

Das proteínas exclusivas nas raízes do tratamento CN, na comparação CN&SNI, 16 das 52 foram proteínas não caracterizadas, que após a aplicação de blast-p, mapeamento em *Gene Ontology* (GO) e anotação, através da ferramenta Blast2GO receberam alguma anotação, sendo que 3 encontraram identidades com o banco de dados de arroz (ORYSJ) porém são proteínas preditas ou com evidência a nível transcricional. Portanto sem função biológica conhecida (Q0D4A3, Q7XXQ8 e A0A0N7KR63), 4 dessas não caracterizadas tiveram identidade com a montagem do genoma, cromossomo: II (A0A1D5UV66, A0A1D5THS1, W5AP46 e A0A1D5URZ0), 2 encontraram identidades no banco de dados do milho (MAIZE), sendo elas uma subunidade pequena e grande do ribossomo (S17-1 e L35a-3), sendo as ID A0A3L6DVA9 e B4FID1. E ainda a proteína de milho B4FF26 também foi observada como uma proteína do transporte intracelular, proteína vacuolar associada de classificação 26A, a A7J2I4, também de milho, de membrana relativa ao tonoplasto, uma neomentol desidrogenase do metabolismo de terpenos (B4FSX7), uma cadeia beta de ATP sintase (B6TBW2), ambas de milho e uma ligante de DNA (B9EZQ3_ORYSJ). Todas observada apenas a nível de transcritos. Interessante notar o grande número de anotações em banco de dados externos ao próprio trigo.

Entre as proteínas ou identidades exclusivas do tratamento SNI, na comparação CN&SNI, 9 identidades das 42, foram de proteínas não identificadas do banco de dados do trigo. Usando a mesma ferramenta para anotação, destacaram-se identidades relacionadas ao metabolismo de carboidratos como GRDH_ORYSJ que atuam sobre açúcar-polióis e possivelmente envolvidas na tolerância a seca (característica do CD 104), uma triosefosfato isomerase (B6SMQ5_MAIZE) e da fotorrespiração, uma alanina-glioxilato aminotransferase (D2KZ10_WHEAT). Duas proteínas, não caracterizadas, tiveram identidade com a montagem do genoma, cromossomo: II (A0A7H4LHK2 e A0A7H4LPC5), uma hidroquinona glicosiltransferase provável (D8LAL9_WHEAT) e mais uma vez a Calnexina, se apresenta para confirmar a sua exclusividade ao tratamento SNI entre todos os tratamentos (B6TNF1_MAIZE). E uma proteína de arroz, também pouco anotada, descrita com atividade GTPasica pelo UNIPROT ligante de C (Q75IJ1_ORYSJ).

Das proteínas da interseção CN&SNI, entre as mais abundantes no tratamento CN, apresentaram 15 de 52 como proteínas não caracterizadas no banco de dados do trigo, porém do próprio banco de dados do trigo (WHEAT) foi assemelhada uma 60S proteína ribossômica L6 (A0A3B6QGW3), uma proteína de montagem do genoma, cromossomo: II (A0A0C4BIW4)

e mais uma vez aparece a provável glucano-endo-1,3-beta-D-glucosidase (Fragmento) (Q5CAL1), antes no o tratamento SNI, comparado com SN e agora como mais expressa em CN na comparação com SNI. Duas dessas proteínas não caracterizadas não retornaram atividades conhecidas, pois tiveram identidades com proteínas preditas (C7JA73_ORYSJ). E, 7 identidades encontraram provável anotação com O-metil-transferases (2 com a mesma anotação (B4ERX7_WHEAT), ou da família, também com anotação idêntica (Q2R6G9_ORYSJ) e 2 específicas de flavonoides, com também identidade igual de anotação (Y1103_ORYSJ). No banco de dados do milho (MAIZE) foram assemelhadas as NADH desidrogenase e Actina-2 (A0A3L6EM29 e B6SI11), respectivamente. As O-metil-transferases, mesmo não tendo as mesmas identidades, foram observadas em todos os tratamentos, porém, mais abundantes em CN e SN comparados a SNI.

Entre as proteínas da interseção CN&SNI, as mais abundantes no tratamento SNI apresentaram 4 de 20 como proteínas não caracterizadas no banco de dados do trigo. Duas glutelinas tipo-A2 (uma das proteínas formadoras do glúten), porém, ambas com a mesma anotação provável (A0A3L6DAW0_MAIZE). E ainda do próprio banco de dados do trigo (WHEAT), uma foi assemelhada à uma sintase de oxido de aleno (T1WRJ1) e uma nucleoredoxina (A0A6G7MCI4). Sendo que a sintase de oxido de aleno, é então abundante em SNI, comparado aos demais tratamentos (TABELA SUPLEMENTAR 12).

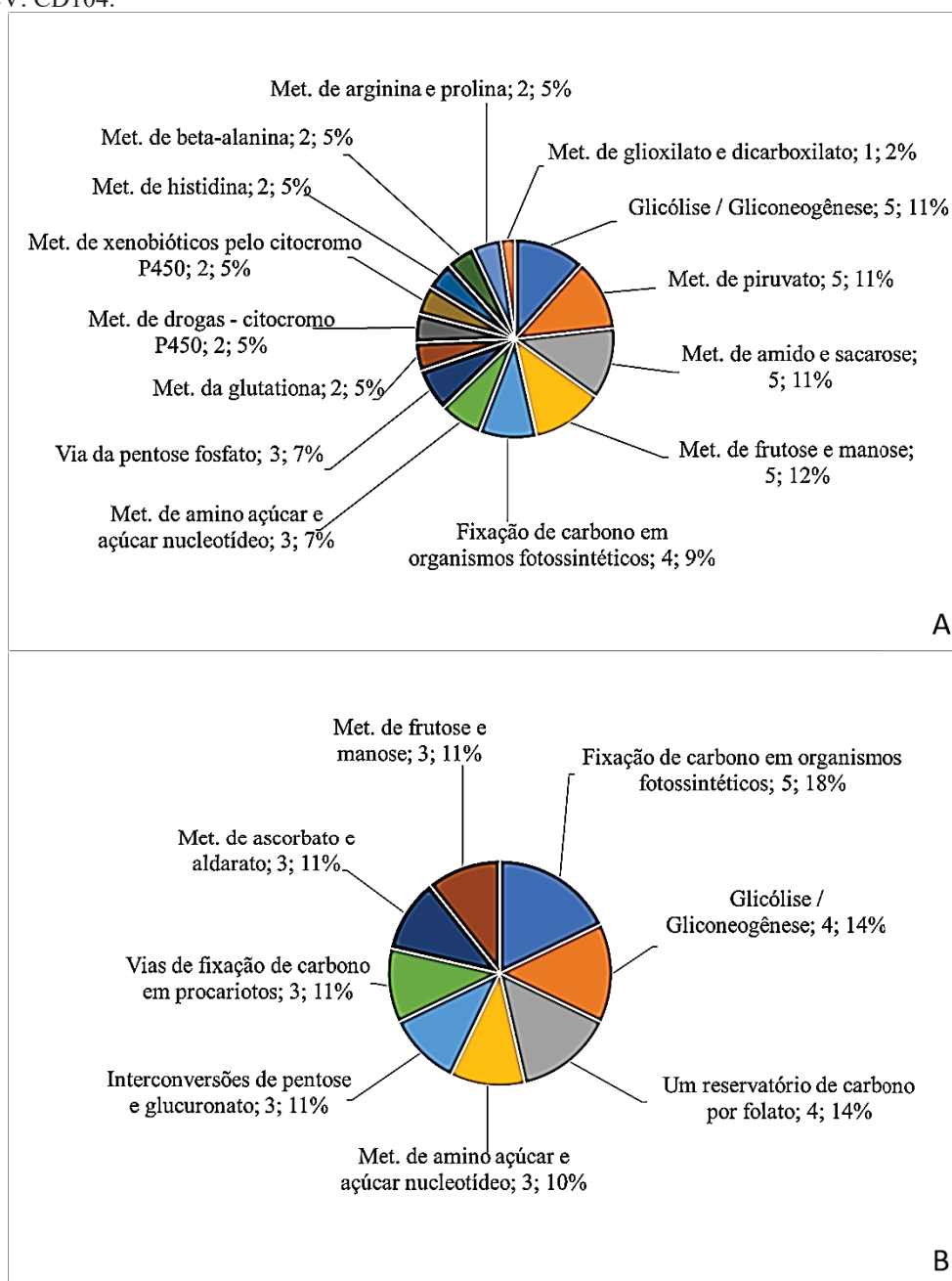
Nesta comparação, também foram obtidos, proteínas / identidade correspondentes a enzimas presentes no catálogo do KEGG e as vias do metabolismo em que essas enzimas se encontraram. Foram verificadas as vias e as enzimas que se relacionam para as proteínas identificadas e anotadas como exclusivas no tratamento CN e no tratamento SNI na comparação CN&SNI e para as proteínas identificadas e anotadas como mais abundantes nos mesmos tratamentos presentes na interseção CN e SNI. Desses dados, foram gerados gráfico de distribuição para aquelas vias com maior número de identidades proteicas representadas. As Figura 15 e Figura 16 respectivamente de CN e SNI, mostram as vias mais representadas por mais de uma identidade em exclusivas (A) e mais abundantes (B).

Para poder inferir a respeito do estado fisiológico de cada tratamento na comparação entre CN e SNI foram reunidas as informações das vias metabólicas e o número de enzimas do catálogo do KEGG que estava sendo representadas em cada tratamento. Assim foi possível verificar as vias predominantes em cada tratamento da comparação CN&SNI.

As vias, portanto, mais representadas em CN foram principalmente relacionadas ao metabolismo de carboidratos e energia, sendo essas a de fixação de carbono em organismos fotossintéticos, glicólise / gliconeogênese, via das pentoses-fosfato, metabolismo de frutose e

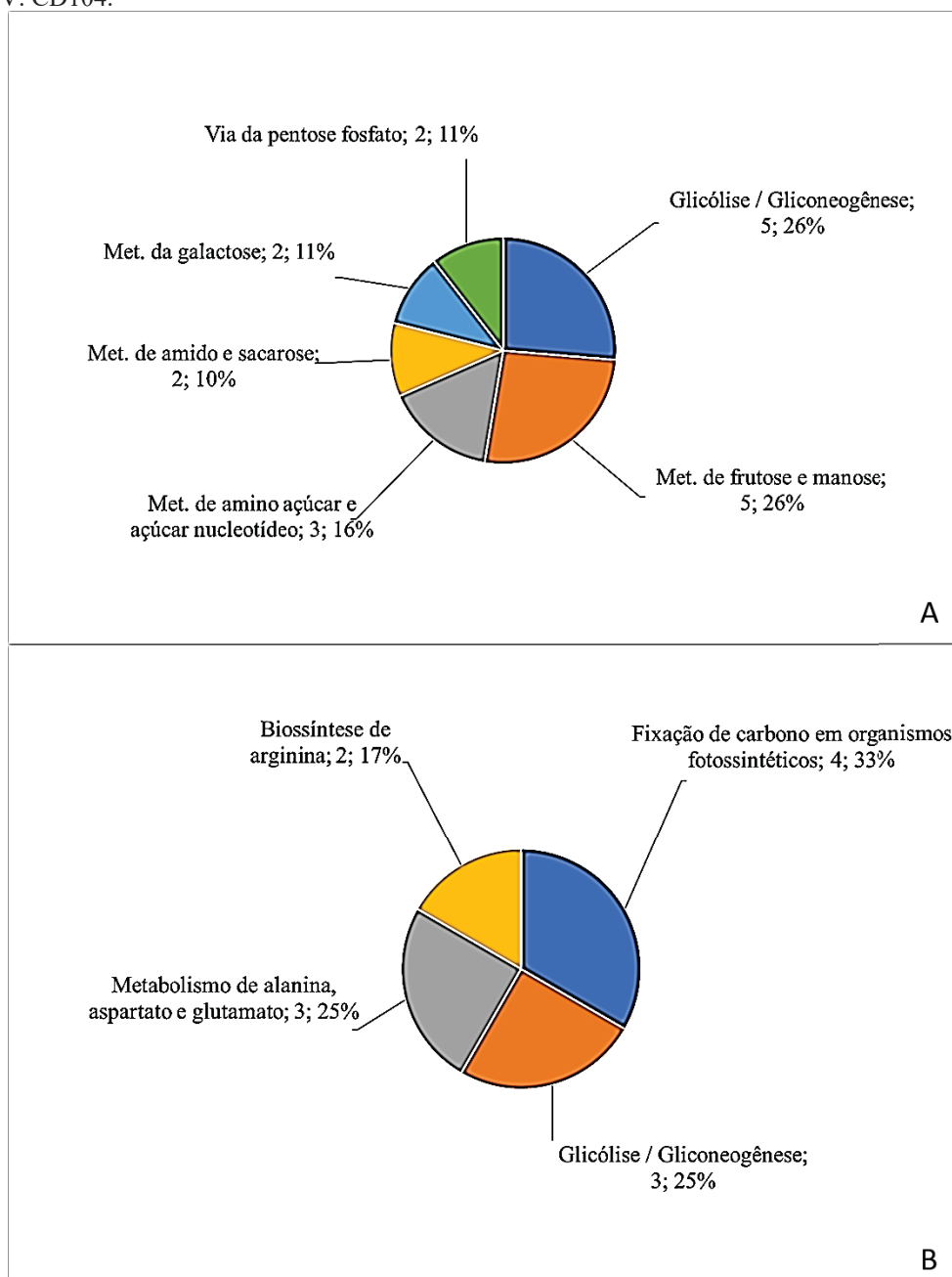
manose, de amido e sacarose, de açúcares aaminados e nucleosídeos e do piruvato descritas como do metabolismo energético (PAN et al., 2020), (Figuras 15 A e B).

Figura 15 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVOS (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO CN, NA COMPARAÇÃO CNXSNI EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.



FONTE: o Autor (2021). Dados obtidos através da anotação e busca na base de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Proteínas exclusivas provenientes da análise proteômica de raízes de plantas de trigo (*Triticum aestivum* var. Lini) da cultivar CD104, cultivadas *in vitro* em meio MS líquido sem adição de sacarose, com fonte de nitrogênio (CN).

Figura 16 – DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS ENCONTRADOS COMO EXCLUSIVOS (A) E MAIS ABUNDANTES (B) NO TRATAMENTO SNI NA COMPARAÇÃO CNXSNI EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.



FONTE: o Autor (2021). Dados obtidos através da anotação e busca na base de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Proteínas exclusivas provenientes da análise proteômica de raízes 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 a bactéria *H. seropedicae* (SNI).

Destacam-se os E.C. que mais aparecem entre essas vias: a hexocinase tipo IV, ou glicocinase e a enzima málica que é uma desidrogenase descarboxilante relacionada a síntese de lipídios. Existem várias formas de malato desidrogenases que diferem no uso de substratos e cofatores. A 1.1.1.39 é encontrada apenas no reino vegetal e contrário da EC 1.1.1.38,

1.1.1.40, não usa o oxaloacetato e, portanto, não descarboxila o oxaloacetato, apenas o malato para produção de piruvato. E ainda a frutocinase, uma das enzimas fosforilantes necessária ao uso da hexose. A frutocinase parece desempenhar um papel metabólico central nos tecidos vasculares, controlando as quantidades de açúcares alocados para o desenvolvimento vascular (GRANOT; DAVID-SCHWARTZ; KELLY, 2013). E ainda a 3-fosfoglicerato cinase; triose-fosfato isomerase se destacam em identidades com essas atividades, porém, não é menos significativa a presença de a frutose difosfato aldolase, UDP-glucuronato descarboxilase, para a síntese de UDP-xilose, beta-1,3 -D-glucosidase, que hidrolisa ligações beta-1,3 D-glucosídicas em beta-1,3-D-glucanos. Ação muito limitada na ligação mista (1-> 3,1-> 4)-beta-D-glucanos e hidrolisa laminarina, glicano β -1,3-glucano com ramificações, beta-1,6 (CHESTERS; BULL, 1965). Também uma L-fucose desidrogenase, relacionada ao metabolismo de ascorbato e aldaratos, presente entre as vias mais representadas. E, finalmente uma oxaloacetato descarboxilase. E ainda as transcetolase e transaldolase da via não oxidativa da via das pentoses fosfato / ciclo de Calvin.

Representada por 4 identidades proteicas, a via de *pool* de carbono por folato, uma via do metabolismo de cofatores e vitaminas, onde uma atividade hidroximetiltransferase está presente e aparece também na via bem representada do metabolismo de ácido cianoamino e, pode atuar como uma 5,10-metilenotetrahidrofolato:glicina hidroximetiltransferase. Ainda presente a atividade meteniltetraidrofolato ciclohidrolase, que em eucariotes, ocorre como uma enzima trifuncional que também tem atividade metilenotetrahidrofolato desidrogenase (NADP+) e de ligase formate-tetrahidrofolato.

É possível destacar a atividade 13S-lipoxigenase, já descrita e presente em SNI na comparação com SN. Essa enzima com a 12-oxofitodienoato redutase compõe os representantes de atividade de 3 identidades do metabolismo do alfa-linolenato, que se esperam significativas para a fisiologia de CN, na comparação com SNI. E estão envolvidos na conversão de linolenato em jasmonato em *Zea mays* (VICK; ZIMMERMAN, 1986).

Gentiobiase, presente no metabolismo de sacarose e amido, biossíntese de fenilpropanoides e metabolismo do ácido cianoamino, aparece como sendo uma única identidade proteica e tem atividade de hidrólise de resíduos beta-D-glicosil terminais não redutores com liberação de beta-D-glicose, usando, entre outros substratos, a celobiose e celodretrinas. Poderia estar atuando com a 1,3 glucanase acima descrita.

A fosforilação oxidativa está bem representada com 2 atividades e 3 identidades. Duas próton (H⁺) - ATPase transportadora entre dois setores. E uma NADH: ubiquinona redutase, que participa das cadeias de transferência de elétrons das mitocôndrias e bactérias aeróbias,

transferindo elétrons do NADH para o reservatório de ubiquinona. O transporte reverso de elétrons através desta enzima pode reduzir NAD^+ a NADH.

Outra via presente exclusivamente no tratamento CN é a do metabolismo da arginina e prolina (Q8W0Q1). Blume et al., (2019) observou que, em *Arabidopsis thaliana* em condição de baixa concentração de CO_2 (100 ppm), ocorre o cumulo de ornitina. A arginina pode ser sintetizada a partir da ornitina nos cloroplastos. A ornitina é carbamoilada em citrulina. O carbamoil-fosfato é sintetizado a partir de glutamina ou amônia e bicarbonato na presença de ATP pela enzima heteromérica carbamoil fosfato sintetase (CPS) em *Arabidopsis thaliana*. A descarboxilação de ornitina ou arginina inicializa sua produção. A ornitina descarboxilase parece estar ausente em *Arabidopsis thaliana*, dessa forma a arginina descarboxilase parece ser a única fonte para a síntese de poliaminas. A ornitina também é um precursor potencial da síntese de prolina. Ornitina e ureia são produtos de uma reação catalisada pela arginase na qual a arginina é usada como substrato e essa via pode estar relacionada ao estresse abiótico.

O metabolismo do cianoaminoácido é outra via que está presente, exclusivamente, no tratamento CN e está relacionado ao metabolismo de aminoácidos. A via do metabolismo da histidina, também se apresenta como exclusiva no tratamento CN. Dupont (2008), trabalhando com amiloplasto do endosperma de trigo realizou estudos proteômicos e identificou enzimas relacionadas a essa via, que podem estar relacionadas a formação de histidina, exclusivamente, ou fazer parte das vias que podem originar o imidazol, que entram na via do metabolismo do aspartato, alanina e glutamato.

É possível destacar algumas enzimas neste tratamento CN em comparação a SNI da TABELA SUPLEMENTAR 12. Entre essas enzimas, uma proteína que apresenta domínio PNP_UDP, mesma identificação encontrada no tratamento CN na comparação com o tratamento SN. Uma dissulfeto-isomerase, que pode estar envolvida no desenvolvimento do endosperma do trigo (WANG, SHUNLI et al., 2013). Zhang, Junwei et al. (2021) verificaram aumento na abundância da dissulfeto-isomerase em folhas de trigo, respondendo ao estresse salino por acúmulo de espécies reativas do oxigênio (EROs). Outra proteína com abundância elevada em relação ao tratamento SNI, foi uma glicosidase, que pode estar envolvida em processos de divisão celular e transporte através dos plasmodesmos em resposta ao estresse abiótico (BALASUBRAMANIAN et al., 2012). A atividade da glicosidase verificada por Zang et al. (2018) estava relacionada a degradação da celulose, de forma indireta, na conversão da celobiose em glicose, em comunidades microbianas, durante a compostagem de esterco de gado misturado com palha de arroz. Também se verifica que a abundância de lipoxigenase em plantas de trigo duro (*Triticum durum*) apresentou aumento de expressão de gene e parece estar

envolvida em processos de crescimento e resposta ao estresse hiperosmótico, conforme demonstrado por Menga e Trono (2020). Le Roux et al. (2020) demonstrou que a presença de lipoxigenases, respondendo ao estresse hídrico em folhas de trigo, ocorreu apenas após o sétimo dia de indução ao estresse. As proteínas inibidoras de xilanase (A7BJ77) e glutathione transferase (A0A3B6LFQ7), já relacionadas à processos de resposta ao estresse. Estão presentes também proteínas ribossomais (W5FPA7 e W5C5U5) que desempenham papel estrutural dos ribossomos e são expressas por DNA mitocondrial (HANDA; KUBO; KADOWAKI, 1998). Zhang, Junwei et al. (2021) demonstraram a diminuição de proteínas ribossomais em folhas de trigo sob estresse abiótico salino, contrário ao observado em nosso estudo.

E por fim, as vias mais representadas em SNI na comparação CN&SNI. Tendo sido reunidas informações das vias, enzimas representadas por seus códigos E.C. e as identidades, exclusivas e as mais abundantes em SNI, foi possível observar que as vias do metabolismo de carbono são as mais representadas. Apesar se semelhantes às de CN, nessa comparação, as identidades ou proteínas são distintas ou prováveis isoformas ou proteoformas. As vias são: Glicólise / gliconeogênese com 8 identidades e classes do E.C., onde se verificam as mesmas atividades como em CN, como a glicocinase, frutocinase, uma 6-fosfofrutocinase (pirofosfato). A enzima catalisa uma reação semelhante a fosfofrutocinase-1, mas utiliza pirofosfato em vez de ATP como o doador de fosfato. A mesma foi descrita em plantas superiores, eucariotos primitivos, bactérias e arqueas (SIEBERS; KLENK; HENSEL, 1998). Ainda as atividade gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase-NAD(P), piruvato cinase, álcool desidrogenase (NADP⁺) de álcoois primários, triose-fosfato isomerase são compartilhadas na via de fixação de carbono em organismos fotossintéticos. Uma identidade com E.C. de transaminase glutâmico-pirúvica, é compartilhada dessa via com a via do metabolismo de alanina, aspartato e glutamato. Este também está bem representado com as atividades: transaminase glutâmico-oxaloacética (com 2 identidades) e uma alanina-2-ceto-ácido transaminase.

Presente com 4 identidades a via do metabolismo de açúcares aminados e nucleosídeos, além das glicocinase e da frutocinase, de identidades distintas das descritas neste tratamento, apresenta também uma atividade quitinase, com 2 identidades. Quitinase são hidrolases de quitina, polissacarídeo de parede celular de fungos e invertebrados. As quitinases são enzimas de defesa da planta à medida que agem sobre a quitina, e tornam os fungos inativos (GRAHAM; STICKLEN, 1994).

Ademais, todas as enzimas /identidades já citadas neste tratamento, aparecem nas vias do metabolismo de frutose e manose, amido e sacarose, de piruvato, da galactose e na biossíntese de arginina. A via da frutose e manose apresenta enzimas com atividade de

isomerase (E.C.5.3.1.1) em comum com a via da glicólise / gliconeogênese, via da fixação de carbonos em organismos fotossintéticos, relacionadas ao metabolismo de carbono, conforme observado por Xu et al. (2019) e via metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo (A0A077S6B3) relacionada à via da glicólise / gliconeogênese (E.C.2.7.1.1). Lee et al. (2016) verificou que o metabolismo do amino-açúcar e do açúcar nucleotídeo, na interação parasitária planta-fungo, está relacionado a três vias, interconversão de pentose e glicuronato, metabolismo de galactose e metabolismo de frutose e manose que fornecem substratos a montante para o metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo. Na via do metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, a elevação de glutamato e glutamina pode ser um indicativo de elevada absorção de nitrogênio durante o estresse hídrico refletindo em outros níveis de aminoácidos e que incluiu o metabólito intermediário lisina, sacaropina. O metabolismo da sacaropina leva à produção de glutamato, observações essas, que sugeriram que o glutamato seja importante para a tolerância à seca em *Brachypodium* (SKALSKA et al., 2021). O glutamato, desempenha um papel muito importante no crescimento e desenvolvimento das plantas. Descobriu-se que o glutamato surge como um papel de sinalização. Em condições de estresse, glutamato participa da resposta da ferida, resistência do patógeno, resposta e adaptação ao estresse abiótico e estimulação local (estresse abiótico ou biótico) e transdução de sinalização desencadeada por longa distância (QIU et al., 2020).

A via de biossíntese de arginina (A0A3B5XVF6) compartilha com a via do metabolismo de alanina, aspartato e glutamato as mesmas enzimas transaminases (E.C. 2.6.1.2). Essa via é possivelmente relacionada a síntese de sacarídeos de parede celular em trigo (LU et al., 2021). A via da galactose (A0A077S6B3 e A0A3B6LFH5), coincide com as vias do amino açúcar e açúcar nucleotídeo e do metabolismo do amido e sacarose que podem estar relacionadas a presença de parasitas (LEE et al., 2016).

A via da pentose fosfato (A0A3B6LFH5) está envolvida na oxidação da glicose e seu papel principal é anabólico, e não catabólico e foi detectado nas raízes de mudas de trigo selvagem em resposta ao estresse hídrico de curto prazo (LIU, HUI et al., 2015).

As vias da glicólise / gliconeogênese, via da pentose-fosfato e metabolismo de amino açúcar e açúcar nucleotídeo estão presentes nos três tratamentos (SNI, SN e CN), apesar de apresentarem enzimas diferentes, e como já mencionado, demonstra a atividade de vias do carbono. Pan et al. (2020) encontraram enriquecimento das vias da glicólise / gliconeogênese, com 11 proteínas diferencialmente abundantes, metabolismo de açúcar de amino e nucleotídeo, com 8 proteínas diferencialmente abundantes, metabolismo de frutose e manose, 7 proteínas diferencialmente abundantes, e via de pentose fosfato, também com 7 proteínas

diferencialmente abundantes, quando analisou o milho em resposta à ataque de um herbívoro subterrâneo, sugerindo que, essas mudanças podem ser uma resposta ao estresse sofrido pela planta ao ataque sofrido.

Nos destaques de SNI da comparação CN e SNI (TABELA SUPLEMENTAR 13), podemos verificar a presença de enzimas inibidoras de xilanose, envolvida na resposta ao estresse biótico e abiótico das plantas (IGAWA et al., 2005). Enzimas inibidoras de xilanose, desempenham papel de resposta à organismos patogênicos, como reportado por Zhan et al., (2017) em que plantas de arroz apresentaram aumento na expressão de genes relacionadas a essas enzimas. Neste tratamento, é possível somar essa proteína em SNI como mais uma resposta a infecção por *H. seropedicae*. Uma transferase (e.c. 2.6.1.2 – alanina transaminase – A0A3B6SHQ4). Essa enzima está presente na via do piruvato de raízes de plantas em condições hipóxias (DE SOUSA; SODEK, 2002).

As peroxidases presentes podem estar relacionadas a resposta por infecção por patógenos, mas também envolvidas em processos de lignificação e suberificação, também aparece em resposta ao estresse causado pela seca ou salinidade, sendo que o gene responsável, é regulado positivamente quando raízes de arroz são infectadas por fungos (KOMATSU; KAMAL; HOSSAIN, 2014). Uma proteína de resposta hipersensível e envolvida na resposta a patógenos também se destaca por que também está relacionado a resposta a infecção, que como descrito anteriormente, e tem sua abundância aumentada, quando na presença de patógenos (YU, XIU MEI et al., 2008).

A enzima fosfopiruvato hidratase relacionada à glicólise/gliconeogênese. O incremento dessa enzima, também foi observado por Zeleneva; Khavkin, (1980), durante o crescimento de calos de milho (*Zea mays*). Ainda no tratamento SNI, em comparação ao tratamento CN (TABELA SUPLEMENTAR 13), destaca-se uma triticain beta, uma protease de cisteína, sendo uma proteína envolvida na quebra de ligações peptídicas de uma proteína. Proteases de cisteína foram inibidas de forma significativa nas amostras estudadas por Simova-Stoilova et al. (2010) em folhas de trigo sob estresse hídrico, além de peroxidases. A atividade de peroxidases tiveram sua abundância aumentada em raízes de milho cultivadas em meio líquido, inoculadas com *H. seropedicae*, assim como em raiz de arroz inoculadas com a mesma bactéria (NUNES et al., 2021).

5.4.4 Proteínas identificadas exclusivamente de *Herbaspirillum seropedicae*

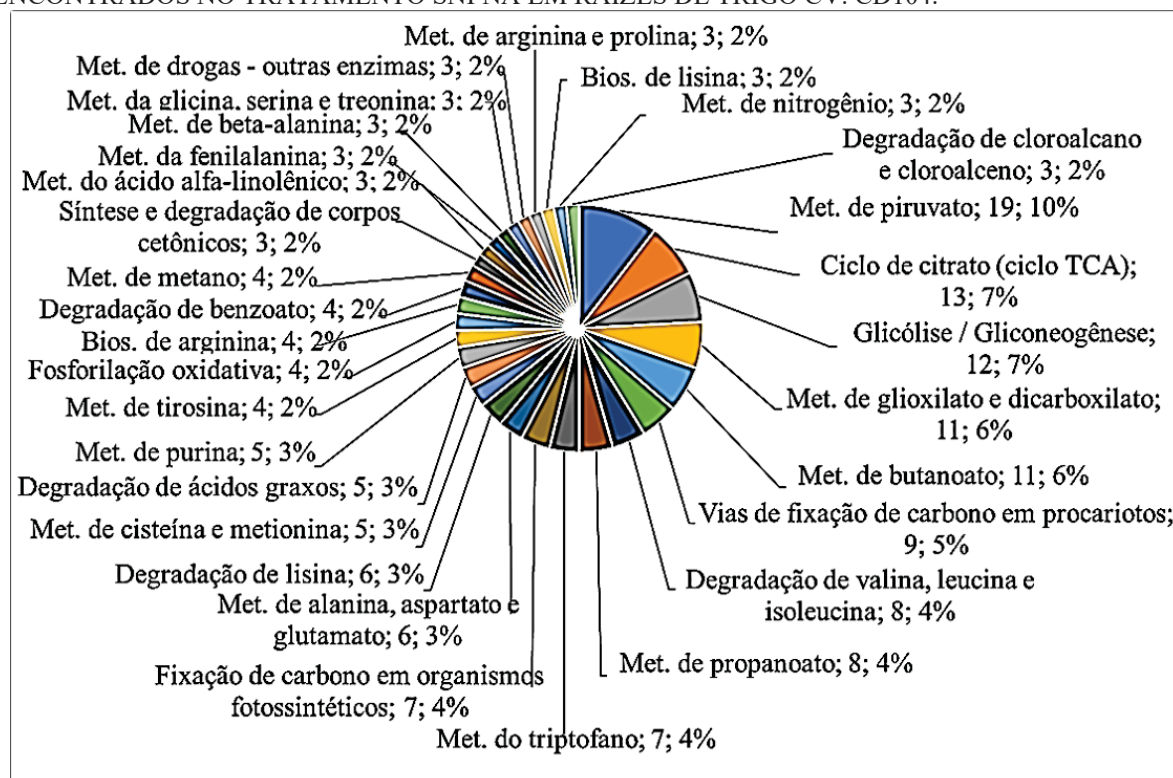
Na TABELA SUPLEMENTAR 7, podemos observar o grande número de identidades proteicas de *H. seropedicae*. Mesmo não tendo sido o foco deste trabalho identificar proteínas de *H. seropedicae*, foi possível identificar 211 proteínas. Destas, apenas 6 não são caracterizadas. É notável que 17 proteínas foram diferentes proteínas (L) do ribossomo 50S e 5 foram diferentes proteínas (S) do ribossomo 30S. Vinte e sete de transportadores tipo ABC, sendo 2 componentes proteicos do sistema de transporte periplasmático de aminoácidos e mais uma relativo a um domínio proteico sinalizar desse mesmo transporte, 5 de componentes para transporte de aminoácidos ramificados, 2 para dipeptídios, 1 para D-xilose, 3 de sistema de transporte para glutamato e aspartato, sendo um desse componente de ATPase, 7 de transporte de açúcar, um componente de lipoproteína de superfície, um para ureia, um para molibdato, uma para espermina e putrescina, e um para nitrato, sulfonato e bicarbonato, e ainda um desconhecido.

Ainda, foram identificadas 10 proteínas de membrana externa (Omp) distintas e muitas outras importante, porém que não se apresentaram quantidade de destaque.

Cabe enfatizar, por se tratar de bactéria diazotrófica que o sistema da fixação biológica do nitrogênio foi representado pelas proteínas nitrogenase-ferro-proteína, pela cadeia beta da proteína nitrogenase ferro-molibdênio e pela cadeia alfa da proteína nitrogenase. E ainda 2 proteínas P-II reguladora de nitrogênio, sendo uma assemelhada. E as fix, flavoproteína de transferência de elétrons, subunidade alfa (fixB) e Cbb3-tipo de citocromo c oxidase subunidade (fixP) (TABELA SUPLEMENTAR 7). Proteínas relacionadas FBN.

Ao usar o software para encontrar as vias expressas pelas atividades enzimáticas apresentadas nessas identificações, verificamos que 18 foram do metabolismo do piruvato 13 ciclo do ácido cítrico (ciclo TCA), 12 da glicólise / gliconeogênese, 10 do metabolismo de glioxilato e dicarboxilato, 10 do metabolismo de butanoato, 9 das vias de fixação de carbono em procariotos, 8 do metabolismo do propanoato, 7 do metabolismo do triptofano, 7 da degradação de valina, leucina e isoleucina, 7 da fixação de carbono em organismos fotossintéticos, 6 do metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, 6 da degradação de lisina, 5 do metabolismo de cisteína e metionina, 5 da degradação de ácidos graxos, 4 do metabolismo de tirosina, 4 da fosforilação oxidativa, 4 do metabolismo de purina, 4 da biossíntese de arginina, 4 da degradação de benzoato, 4 do metabolismo de metano. Ainda outras vias foram representadas por 3, 2 e 1 enzima/identidade (Figura 17).

Figura 17 - DISTRIBUIÇÃO DE IDENTIDADES, Nº DE ENZIMAS E PERCENTUAL DO TOTAL CONSIDERADOS EM VIAS METABÓLICAS DAS PROTEÍNAS DE *H. seropedicae* SmR1, ENCONTRADOS NO TRATAMENTO SNI NA EM RAÍZES DE TRIGO CV. CD104.



FONTES: o Autor (2021). Dados obtidos através da anotação e busca na base de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Proteínas exclusivas provenientes da análise proteômica de raízes 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 *H. seropedicae* (SNI).

As vias e enzimas apresentadas indicam que as bactérias estavam sintetizando proteínas pela presença de ribossomos, obtendo energia do seu metabolismo celular e realizando a fixação biológica do nitrogênio.

Proteínas relacionadas com a constituição de ribossomos, podem estar relacionadas a alta síntese proteica, além de nitrogenases, e proteínas reguladoras de nitrogênio, ambas envolvidas em vias de fixação do nitrogênio.

A presença de proteínas ribossomais abundantes, como identificadas em nosso trabalho, pode ser um bom indicativo da interação entre planta e bactéria, conforme avaliado na interação entre *A. thaliana* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* descrita por Dos Santos et al., (2020). É possível identificar, entre as enzimas, fatores de alongamento, relacionados à síntese proteica, atuando na ligação do RNAt ao ribossomo, durante a fase de alongamento em *Escherichia coli* (GROMADSKI; WIEDEN; RODNINA, 2002).

As nitrogenase estão presentes entre os resultados de identidades de *H. seropedicae*, sendo transcritas por genes Nif, entre eles o gene NifA, que é sensível a presença de oxigênio,

mas regulado positivamente pelo gene GlnK (ALVES STEFANELLO et al., 2019), que em nosso trabalho foi identificada (D8ITX3) como proteína semelhante a PII.

Identificamos uma proteína de membrana externa e que não teve expressão diferencial no trabalho realizado por Rosconi et al. (2018) avaliando a expressão diferencial de *H. seropedicae* em resposta ao ferro, mas teve sua expressão aumentada quando *H. seropedicae* estava anexada à raízes de trigo e regulada negativamente, quando anexadas em raízes de milho (ROSCONI; DE VRIES; et al., 2016).

Foi possível verificar, a presença de quitinase. Essa enzima pode ser produzida por alguns organismos diazotróficos, como *Azospirillum*, auxiliando a planta no combate a organismos patogênicos (CURÁ et al., 2017).

A presença de putrescina, uma poliamina, parece estar relacionada ao estresse osmótico, causado na rizosfera (PINSKI et al., 2019). Foi relatado por De Sousa; Sodek (2002) que a formação da putrescina, pela descarboxilação da arginina, em plântulas de arroz, poderiam contribuir para a alcalinização dos tecidos, sob condições de hipóxia.

Outra proteína que chama a atenção é a flagelina, que está relacionada à adsorção da bactéria à superfície da raiz (PANKIEVICZ, V., 2014).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que:

A cv. CD104 de trigo em cultivo *in vitro* a partir de sementes tem desenvolvimento de raízes aumentado em resposta a ausência do nitrogênio no meio.

Tanto a massa fresca quanto a massa seca aumentam quando na ausência de nitrogênio;

A presença de nitrogênio, no meio, promove a formação de pelos radiculares;

A cv. CD104 responde a inoculação com *H. seropedicae* com a formação de pelos radiculares;

A bactéria *H. seropedicae* comporta-se como endofítica na variedade de trigo CD 104;

A análise proteômica foi capaz de mostrar diferenças fisiológicas/bioquímicas da cv. CD104 em meio com e sem nitrogênio e sem nitrogênio inoculado com bactéria. E que no tempo avaliado, vias do metabolismo de carbono e produção de energia estavam presentes nas raízes sob os tratamentos avaliados; e ainda que a fisiologia dos tratamentos CN e SNI são próximos e mais distintos que o tratamento SN; sendo que o tratamento SN mostra respostas de estresse abiótico, e que houve respostas específicas à patogenicidade na raiz do CD104 inoculadas com *H. seropedicae*. E por fim que existem indícios de fixação biológica de nitrogênio na interação entre o trigo cv. CD 104 e *H. seropedicae*.

REFERÊNCIAS

- ABITRIGO. Brasil - importação de trigo 2019 (por país). v. 2019, 2021. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/wp-content/uploads/2019/09/1.TRIGO-IMPORT-2019.xlsx-Agrupar-1.pdf>>.
- AHMAD, Parvaiz *et al.* Role of Proteomics in Crop Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. September, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.01336/abstract>>.
- ALVES STEFANELLO, Adriano *et al.* Regulation of *Herbaspirillum seropedicae* NifA by the GlnK PII signal transduction protein is mediated by effectors binding to allosteric sites. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140348>>.
- 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, 2017.
- AQUINO, B. *et al.* Effect of point mutations on *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 8, p. 683–690, 2015.
- ASHRAF, A.; BANO, A.; ALI, S. A. Characterisation of plant growth-promoting rhizobacteria from rhizosphere soil of heat-stressed and unstressed wheat and their use as bio-inoculant. *Plant Biology*, v. 21, n. 4, p. 762–769, 2019.
- ASTA, Dall *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* promotes maize growth but fails to control the maize leaf anthracnose. v. 25, n. February, p. 167–176, 2019.
- 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. 1–14, 2020.
- BAETZ, Ulrike; MARTINOIA, Enrico. Root exudates: The hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, v. 19, n. 2, p. 90–98, 2014.
- BALASUBRAMANIAN, Vaiyapuri *et al.* Plant β -1,3-glucanases: Their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. *Biotechnology Letters*, v. 34, n. 11, p. 1983–1990, 2012.
- BALDANI, J. I. *et al.* Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, 1997.
- BALDANI, J I *et al.* a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. p. 86–93, 1986.
- BALSANELLI, Eduardo *et al.* Maize Root Lectins Mediate the Interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-Acetyl Glucosamine Residues of Lipopolysaccharides. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. 77001, 2013. Disponível em: <www.plosone.org>.
- BALSANELLI, Eduardo *et al.* Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during

colonization of the maize rhizosphere. *Environmental microbiology*, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016.

BARBOZA, Rodrigo *et al.* Can the false-discovery rate be misleading? *Proteomics*, v. 11, n. 20, p. 4105–4108, out. 2011.

BASHAN, Yoav *et al.* Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014.

BATEMAN, Alex *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D480–D489, 2021.

BEATTY, Perrin H.; GOOD, Allen G. Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science*, v. 333, n. 6041, p. 416–417, 2011.

BENNETT, Alan B.; PANKIEVICZ, Vânia C.S.; ANÉ, Jean Michel. A Model for Nitrogen Fixation in Cereal Crops. *Trends in Plant Science*, v. 25, n. 3, p. 226–235, 2020.

BERNER, J M; VAN DER WESTHUIZEN, A J. The Selective Induction of the Phenylalanine Ammonia-lyase Pathway in the Resistance Response of Wheat to the Russian Wheat Aphid. 2010.

BLOCH, Sarah E. *et al.* Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 62, p. 181–188, 2020.

BLOOM, Arnold J. Photorespiration and nitrate assimilation : a major intersection between plant carbon and nitrogen. p. 117–128, 2015.

BLUME, Christian *et al.* Low CO₂ induces urea cycle intermediate accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, v. 14, n. 1, p. 1–25, 2019.

BOSE, U., WIJFFELS, G., HOWITT, CA, & COLGRAVE, ML. Tools of the Trade. In: SPRINGER, CHAM (Org.). *Emerging Sample Treatments in Proteomics*. Emerging S ed. [S.l.]: Springer, Cham, 2019. v. 1073. p. 1–22. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-12298-0_1>.

BOTELHO, Diane *et al.* Top-down and bottom-up proteomics of sds-containing solutions following mass-based separation. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 6, p. 2863–2870, 2010.

BRADER, Günter *et al.* Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p. 30–37, 2014.

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.

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, 2004.

CAO, Jingjing *et al.* Effects of MeJA on Arabidopsis metabolome under endogenous JA deficiency. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep37674>>.

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, 2020.

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, 2016a.

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, jan. 2016b.

CARVALHO, Paulo C *et al.* Search engine processor: Filtering and organizing peptide spectrum matches. *PROTEOMICS*, v. 12, n. 7, p. 944–949, abr. 2012.

CERUSO, Marina *et al.* Evaluation and comparison of four protein extraction protocols for mono- and two-dimensional electrophoresis in *Mytilus galloprovincialis*. *Italian Journal of Food Safety*, v. 4, n. 3, p. 179–181, 2015.

CHEN, Kong *et al.* Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*. [S.l: s.n.], 2020

CHEN, Lin *et al.* Overexpression of a cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase gene enhances the resistance of rice to *Nilaparvata lugens*. *Plants*, v. 9, n. 11, p. 1–15, 2020.

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, 2010.

CHESTERS, C.G.C; BULL, A.T. The enzymic degradation of laminarin. *biochemical journal*, v. 86, n. 1, p. 31–38, 1965.

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.

CONESA, Ana *et al.* Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

CONESA, Ana; GÖTZ, Stefan. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, v. 2008, 2008.

CONSORTIUM, The UniProt. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D506–D515, jan. 2019.

COODETEC. *Guia de produtos: trigo*. Cascavel: COODETEC, 2010.

COODETEC. *Guia de Produtos*. [S.l: s.n.], 2014.

CPD, Leica E M; CRITICAL, Automated; DRYER, Point. *Application Booklet*. [S.l: s.n.], 2014.

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. 41–57, 2017.

DA FONSECA BREDA, 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, 2019.

DE SOUSA, C. A. F.; SODEK, Ladaslav. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 14, n. 2, p. 83–94, 2002.

DE SOUSA, C A F; SODEK, L. *Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (Glycine max) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia*. [S.l: s.n.], 2003. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/envexpbot>.

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, 2017.

DHAWI, Faten; HESS, Anna. Plant Growth-Prompting Bacteria Influenced Metabolites of *Zea mays* var. *amylacea* and *Pennisetum americanum* p. in a Species-Specific Manner. *Advances in Biological Chemistry*, v. 07, n. 05, p. 161–169, 2017.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, v. 7, n. 7, p. 1085–1097, 1995.

DOBBELAERE, Sofie; VANDERLEYDEN, Jos; OKON, Yaacov. Critical Reviews in Plant Sciences Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere Plant Growth. *Critical reviews in Plant Sciences*, v. 22, n. 2, p. 107–149, 2003.

DOBEREINER, J.; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas*. Brasília, DF: EMBRAPA, 1995.

DOS SANTOS, Tamires Cruz *et al.* *Arabidopsis thaliana* exudates induce growth and proteomic changes in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *PeerJ*, v. 8, 2020.

DUPONT, Frances M. Metabolic pathways of the wheat (*Triticum aestivum*) endosperm amyloplast revealed by proteomics. *BMC Plant Biology*, v. 8, p. 1–19, 2008.

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.

FAORO, Helisson *et al.* Genome comparison between clinical and environmental strains of *Herbaspirillum seropedicae* reveals a potential new emerging bacterium adapted to human

hosts. *BMC Genomics*, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2019.

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, 2014. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>.

GARCIA-SECO, D. *et al.* Transcriptome and proteome analysis reveal new insight into proximal and distal responses of wheat to foliar infection by *Xanthomonas translucens*. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10568-8>>.

GARCIA, Amanda Carvalho *et al.* Bacterial small RNAs in the genus *Herbaspirillum* spp. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 1, 2019.

GHOLIZADEH, Ashraf; KOHNEHROUZ, B. Baghban. Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt-challenged maize leaves. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1677-04202010000400001>>.

GOEMINNE, Ludger J.E.; GEVAERT, Kris; CLEMENT, Lieven. Experimental design and data-analysis in label-free quantitative LC/MS proteomics: A tutorial with MSqRob. *Journal of Proteomics*, v. 171, p. 23–36, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.004>>.

GÓMEZ-GODÍNEZ, Lorena Jacqueline *et al.* Metatranscriptomics and nitrogen fixation from the rhizoplane of maize plantlets inoculated with a group of PGPRs. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 42, n. 4, p. 517–525, 2019.

GOMIG, Talita Helen Bombardelli *et al.* Quantitative label-free mass spectrometry using contralateral and adjacent breast tissues reveal differentially expressed proteins and their predicted impacts on pathways and cellular functions in breast cancer. *Journal of Proteomics*, v. 199, p. 1–14, 2019.

GÖTZ, Stefan *et al.* B2G-FAR, a species-centered GO annotation repository. *Bioinformatics*, v. 27, n. 7, p. 919–924, 2011.

GÖTZ, Stefan *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, v. 36, n. 10, p. 3420–3435, 2008.

GRAHAM, L. S.; STICKLEN, M. B. Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany*, v. 72, n. 8, p. 1057–1083, 1994.

GRANOT, David; DAVID-SCHWARTZ, Rakefet; KELLY, Gilor. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. MAR, p. 1–17, 2013.

GROMADSKI, K. B.; WIEDEN, H. J.; RODNINA, M. V. Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry*, v. 41, n. 1, p. 162–169, 2002.

GROVER, Minakshi *et al.* *PGPR Mediated Alterations in Root Traits: Way Toward Sustainable Crop Production. Frontiers in Sustainable Food Systems.* [S.l: s.n.]. Disponible em: <www.frontiersin.org>. , 2021

GUIZELINI, Dieval *et al.* Complete Genome Sequence of *Herbaspirillum hiltneri* N3 (DSM 17495), Isolated from Surface-Sterilized Wheat Roots. *Genome Announcements*, v. 3, n. 5, p. 2–3, 2015.

HALDRUP, Anna; NOERREMARK, Michael; OKKELS, Finn Thyge. Plant selection principle based on xylose isomerase. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 37, n. 2, p. 114–119, 2001.

HAMMER, Øyvind. Manual Past 3.25. *Manual*, n. 1999, 2019.

HANDA, H.; KUBO, N.; KADOWAKI, K. Genes for the ribosomal S4 protein encoded in higher plant mitochondria are transcribed, edited, and translated. *Molecular and General Genetics*, v. 258, n. 3, p. 199–207, 1998.

HASANUZZAMAN, Mirza *et al.* Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, v. 8, n. 9, 2019.

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, 2019.

HIRSCHMANN, Felix; KRAUSE, Florian; PAPENBROCK, Jutta. The multi-protein family of sulfotransferases in plants: Composition, occurrence, substrate specificity, and functions. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, n. OCT, p. 1–13, 2014.

IGAMBERDIEV, Abir U.; KLECZKOWSKI, Leszek A. The glycerate and phosphorylated pathways of serine synthesis in plants: The branches of plant glycolysis linking carbon and nitrogen metabolism. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. March, p. 1–12, 2018.

IGAWA, Tomoko *et al.* A wheat xylanase inhibitor gene, Xip-I, but not Taxi-I, is significantly induced by biotic and abiotic signals that trigger plant defense. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 69, n. 5, p. 1058–1063, 2005.

INIGUEZ, A Leonardo; DONG, Yuemei; TRIPLETT, Eric W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 17, n. 10, p. 1078–1085, 2004.

JAMES, Euan K. *et al.* Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, n. 9, p. 894–906, 2002.

JIAN, Mingyang *et al.* Differential expression pattern of the proteome in response to cadmium stress based on proteomics analysis of wheat roots. *BMC Genomics*, v. 21, n. 1, p. 1DUMM, 2020.

JIANG, Chunmiao *et al.* Proteomic analysis of seed storage proteins in wild rice species of

the *Oryza* genus. *Proteome Science*, v. 12, n. 1, 2014.

JIN, Lu *et al.* Genome-wide analysis of sulfotransferase genes and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221422>>.

JOZEFOWICZ, Anna Maria *et al.* Nitrogen Deficiency Induced Alterations in the Root Proteome of a Pair of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties Contrasting for their Response to Low N. *Proteomics*, v. 17, n. 23–24, 2017.

KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.

KANG, Guozhang *et al.* Proteomics combined with BSMV-VIGS methods identified some N deficiency-responsive protein species and ABA role in wheat seedling. *Plant and Soil*, v. 444, n. 1–2, p. 177–191, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11104-019-04260-1>>.

KENDZIOREK, Maria; PASZKOWSKI, Andrzej; ZAGDAŃSKA, Barbara. Differential regulation of alanine aminotransferase homologues by abiotic stresses in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Cell Reports*, v. 31, n. 6, p. 1105–1117, 2012.

KHATABI, Behnam *et al.* *Plant–Microbe Symbiosis: What Has Proteomics Taught Us? Proteomics*. [S.l.: s.n.], 2019

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, set. 1997.

KOMATSU, Setsuko; KAMAL, Abu H. M.; HOSSAIN, Zahed. Wheat proteomics: proteome modulation and abiotic stress acclimation. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, n. December, p. 1–19, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00684/abstract>>.

KUMAR, Smita; TRIVEDI, Prabodh K. Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAPLAZE, Laurent; LUCAS, Mikaël; CHAMPION, Antony. Rhizobial root hair infection requires auxin signaling. *Trends in Plant Science*, v. 20, n. 6, p. 332–334, 2015.

LARANCA, Mark; LAMOND, Angus I. Multidimensional proteomics for cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 16, n. 5, p. 269–280, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3970>>.

LAUDERT, Dietmar *et al.* Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Molecular Biology*, v. 31, n. 2, p. 323–335, 1996.

LE ROUX, Marlon Schylor L. *et al.* Wheat Line “RYNO3936” Is Associated With Delayed Water Stress-Induced Leaf Senescence and Rapid Water-Deficit Stress Recovery. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, 2020. Disponível em: <www.frontiersin.org>.

LEE, Dong Kyu *et al.* Metabolic response induced by parasitic plant-fungus interactions hinder amino sugar and nucleotide sugar metabolism in the host. *Scientific Reports*, v. 6, n. October, p. 1–11, 2016.

LEGHARI, Shah Jahan *et al.* Role of nitrogen for plant growth and development: a review. *Advances in Environmental Biology*, v. 10, n. 9, p. 209–219, 2016.

LEREIM, Ragnhild R. *et al.* Visualization, inspection and interpretation of shotgun proteomics identification results. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 919, n. 227, p. 227–235, 2016.

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, 2011.

LI, Le *et al.* Comparative Proteomic Analysis Provides Insights into the Regulatory Mechanisms of Wheat Primary Root Growth. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

LI, Yongbin *et al.* Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content. *PeerJ*, v. 2020, n. 3, 2020.

LI, Zhi *et al.* Protein Dynamics in Young Maize Root Hairs in Response to Macro- and Micronutrient Deprivation. *Journal of Proteome Research*, v. 14, n. 8, p. 3362–3371, 2015.

LIMAMI, Anis M. *et al.* Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 9, p. 2325–2335, 2008.

LINDSTRÖM, Kristina; MOUSAVI, Seyed Abdollah. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, v. 0, p. 1–22, 2019.

LIU, Bohan *et al.* Nitrate regulation of lateral root and root hair development in plants. *Journal of Experimental Botany*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <http://jxb.oxfordjournals.org/open_access.html>. , 2020

LIU, Hui *et al.* Physiological and comparative proteomic analysis reveals different drought responses in roots and leaves of drought-tolerant wild wheat (*Triticum boeoticum*). *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–29, 2015.

LU, Min *et al.* Physiological and metabolomics responses of two wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes differing in grain cadmium accumulation. *Science of the Total Environment*, v. 769, p. 145345, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145345>>.

LUKASZEWSKI, Adam J. *et al.* A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, v. 345, n. 6194, p. 1251788–1251788, jul. 2014.

- MA, Jianhui *et al.* Proteomic profiling analysis reveals that glutathione system plays important roles responding to osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *PeerJ*, v. 2016, n. 8, 2016.
- MA, Qing Hu; LUO, Hao Ran. Biochemical characterization of caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase from wheat. *Planta*, v. 242, n. 1, p. 113–122, 2015.
- MACHADO, Kelly C.; BATISTA, Michel. Procedimento Operacional Padrão Título : PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM STAGETIP Revisão : 02 Procedimento Operacional Padrão Título : PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEO SEM STAGETIP Revisão : 02. p. 1–5, 2017.
- MAHESWARI, Mandapaka *et al.* Tolerance mechanisms in maize identified through phenotyping and transcriptome analysis in response to water deficit stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 27, n. 6, p. 1377–1394, 2021.
- MAHMUD, Kishan *et al.* Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2020.
- MARUTHI SRIDHAR, Balaji B. *et al.* Effect of phytoaccumulation of arsenic and chromium on structural and ultrastructural changes of brake fern (*Pteris vittata*). *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 23, n. 4, p. 285–293, 2011.
- MÉCHIN, Valérie; DAMERVAL, Catherine; ZIVY, Michel. Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 355, n. 2, p. 1–8, 2007.
- MENGA, Valeria; TRONO, Daniela. The molecular and functional characterization of the durum wheat lipoxygenase TdLOX2 suggests its role in hyperosmotic stress response. *Plants*, v. 9, n. 9, p. 1–23, 2020.
- MIA, M.A. Baset; SHAMSUDDIN, Z. H. Enhanced emergence and vigor seedling production of rice through growth promoting bacterial inoculation. *Research journal of seed science*, v. 2, n. 4, p. 96–104, 2009.
- MIKULÁŠEK, Kamil *et al.* SP3 Protocol for Proteomic Plant Sample Preparation Prior LC-MS/MS. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, n. March, p. Article 635550, 2021.
- MONTEIRO, Rose Adele *et al.* Herbaspirillum-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, v. 356, n. 1–2, p. 175–196, 2012.
- MURASHIGE, Toshio UFM; 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.
- NAG, P.; SHRITI, S.; DAS, S. Microbiological strategies for enhancing biological nitrogen fixation in nonlegumes. *Journal of Applied Microbiology*, p. 1–13, 2019.
- 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, 2014.

NUNES, Rosane de Oliveira *et al.* Quantitative proteomic analysis reveals altered enzyme expression profile in *Zea mays* roots during the early stages of colonization by *Herbaspirillum seropedicae*. *Proteomics*, v. 21, n. 7–8, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pmic.202000129>>.

O'DONNELL, K. L.; HOOPER, G. R. Cryofracturing as a Technique for the Study of Fungal Structures in the Scanning Electron Microscope. *Mycologia*, v. 69, n. 2, p. 309–320, 1977.

OECD; FAO. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*. [S.l: s.n.], 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>>.

OLANREWAJU, Oluwaseyi Samuel; GLICK, Bernard R.; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 11, p. 1–16, 2017.

PAN, Yu *et al.* Quantitative proteomics suggests changes in the carbohydrate metabolism of maize in response to larvae of the belowground herbivore *Holotrichia parallela*. *PeerJ*, v. 8, p. 1–14, 2020.

PANDEY, Veda P *et al.* A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, v. 06, n. 01, 2017.

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, 2016.

PANKIEVICZ, Vânia Carla Silva. Mecanismos moleculares envolvidos na interação *Herbaspirillum Seropedicae* - gramíneas e adoção da planta modelo *Setaria viridis* para estudo da interação diazotrofo - gramíneas. p. 120, 2014. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/40372>>.

PINSKI, Artur *et al.* Defining the genetic basis of plant–endophytic bacteria interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 8, 2019.

PITTS, R. Jason; CERNAC, Alex; ESTELLE, Mark. Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 16, n. 5, p. 553–560, 1998.

POOLE, Robert K.; HILL, Susan. Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* - Roles of the terminal oxidases. *Bioscience Reports*, v. 17, n. 3, p. 303–317, 1997.

QIN, Lu *et al.* Adaption of roots to nitrogen deficiency revealed by 3D quantification and proteomic analysis. *Plant Physiology*, v. 179, n. 1, p. 329–347, 2019.

QIU, Xue Mei *et al.* Signaling Role of Glutamate in Plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. January, p. 1–11, 2020.

RAHMANI, Nanik *et al.* Mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Kitasatospora* sp. isolated in

- Indonesia and its potential for production of mannoooligosaccharides from mannan polymers. *AMB Express*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- RODRIGUEZ, Patricia A. *et al.* Systems Biology of Plant-Microbiome Interactions. *Molecular Plant*, v. 12, n. 6, p. 804–821, 2019.
- RONCATO-MACCARI, Lauren D.B. *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 45, n. 1, p. 39–47, 2003.
- ROSCONI, Federico; DE VRIES, Stefan P.W.; *et al.* Essential genes for in vitro growth of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 as revealed by transposon insertion site sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, n. 22, p. 6664–6671, 2016.
- ROSCONI, Federico *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* Differentially Expressed Genes in Response to Iron Availability *Herbaspirillum seropedicae* Iron Limitation Response. *Frontiers in Microbiology* | www.frontiersin.org, v. 1, p. 1430, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01430>>.
- ROSCONI, Federico; TROVERO, María F; *et al.* Serobactins-mediated iron acquisition systems optimize competitive fitness of *Herbaspirillum seropedicae* inside rice plants. v. 18, p. 2523–2533, 2016.
- ROSENBLUETH, Mónica *et al.* Nitrogen Fixation in Cereals. v. 9, n. August, p. 1–13, 2018.
- 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, 2020.
- ROYO, Joaquín *et al.* Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 35, p. 21012–21019, 1996.
- RUDNICK, Paul A. *et al.* A Description of the Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) Common Data Analysis Pipeline. *Journal of Proteome Research*, v. 15, n. 3, p. 1023–1032, 2016.
- SANTI, Carole; BOGUSZ, Didier; FRANCHE, Claudine. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013.
- SANTOYO, Gustavo *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, v. 183, p. 92–99, 2016.
- SCHENCK, Craig A.; MAEDA, Hiroshi A. Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry*, v. 149, p. 82–102, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.003>>.
- SCHILMILLER, Anthony L. *et al.* Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 60, n. 5, p. 771–782, 2009.
- SHEWEITA, Salah. Drug-Metabolizing Enzymes Mechanisms and Functions. *Current Drug Metabolism*, v. 1, n. 2, p. 107–132, 2000.

SIEBERS, Bettina; KLENK, Hans Peter; HENSEL, Reinhard. PP(i)-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution. *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 8, p. 2137–2143, 1998.

SIMOPOULOS, Artemis P. Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v. 11, n. SUPPL. 6, 2002.

SIMOVA-STOILOVA, Lyudmila *et al.* Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, n. 2–3, p. 200–206, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.11.003>>.

SINGH, Nisha *et al.* A comparative method for protein extraction and 2-D gel electrophoresis from different tissues of *Cajanus cajan*. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, n. 606, p. 1–7, 2015.

SKALSKA, Aleksandra *et al.* Metabolomic Variation Aligns with Two Geographically Distinct Subpopulations of *Brachypodium distachyon* before and after Drought Stress. *Cells*, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2021.

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, 2006.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SMITH, Pete *et al.* Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 363, n. 1492, p. 789–813, 2008.

THERMO SCIENTIFIC. *BCA protein assay*. . Delaware, USA: [s.n.], 2017

THOMPSON, Richard; BURSTIN, Judith; GALLARDO, Karine. Post-Genomics Studies of Developmental Processes in Legume Seeds. v. 151, n. November, p. 1023–1029, 2009.

TIJET, Nathalie; BRASH, Alan R. Allene oxide synthases and allene oxides. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, v. 68–69, p. 423–431, 2002.

TOKUNAGA, Takaaki; ESAKA, Muneharu. Induction of a Novel XIP-Type Xylanase Inhibitor by External Ascorbic Acid Treatment and Differential Expression of XIP-Family Genes in Rice. 2007. Disponível em: <www.pcp.oxfordjournals.org>.

TSUKANOVA, K. A. *et al.* Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African Journal of Botany*, v. 113, p. 91–102, 2017.

TYANOVA, Stefka; TEMU, Tikira; COX, Juergen. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*, v. 11, n. 12, p. 2301–2319, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.136>>.

VAN DEYNZE, Allen *et al.* Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a

mucilage-associated diazotrophic microbiota. *PLoS Biology*, v. 16, n. 8, p. 1–21, 2018.

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, 2005.

Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-005-0637-1>>.

VICK, Brady A.; ZIMMERMAN, Don C. Characterization of 12-Oxo-Phytodienoic Acid Reductase in Corn. *Plant Physiology*, v. 80, n. 1, p. 202–205, 1986.

WANG, Jingyi *et al.* Identification of wheat stress-responding genes and TaPR-1-1 function by screening a cDNA yeast library prepared following abiotic stress. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>.

WANG, Shunli *et al.* Molecular Mechanisms of HMW Glutenin Subunits from 1Sl Genome of *Aegilops longissima* Positively Affecting Wheat Breadmaking Quality. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, 2013.

WANG, Wei; TAI, Fujun; CHEN, Shaoning. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of Separation Science*, v. 31, n. 11, p. 2032–2039, 2008.

WEI, Hairong *et al.* Nitrogen deprivation promotes *Populus* root growth through global transcriptome reprogramming and activation of hierarchical genetic networks. *New Phytologist*, v. 200, n. 2, p. 483–497, 2013.

WHITE, James F. *et al.* Hydrogen peroxide staining to visualize intracellular bacterial infections of seedling root cells. *Microscopy Research and Technique*, v. 77, n. 8, p. 566–573, 2014.

WHITE, Philip J. *et al.* Matching roots to their environment. *Annals of Botany*, v. 112, n. 2, p. 207–222, 2013. Disponível em: <www.aob.oxfordjournals.org>.

WILKINS, Marc R. *et al.* Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis*, v. 17, n. 5, p. 830–838, 1996.

XU, Yanhua *et al.* Comparative proteomic analysis provides new insights into low nitrogen-promoted primary root growth in hexaploid wheat. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. February, p. 1–14, 2019.

YU, Xin *et al.* Plastid-localized glutathione reductase2-regulated glutathione redox status is essential for *Arabidopsis* root apical meristem maintenance. *Plant Cell*, v. 25, n. 11, p. 4451–4468, 2013.

YU, Xiu Mei *et al.* Cloning of a putative hypersensitive induced reaction gene from wheat infected by stripe rust fungus. *Gene*, v. 407, n. 1–2, p. 193–198, 2008.

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.

ZANG, Xiangyun *et al.* The structural and functional contributions of β -glucosidase-

producing microbial communities to cellulose degradation in composting. *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1045-8>>.

ZEFFA, Douglas Mariani *et al.* Azospirillum brasilense promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLoS ONE*, v. 14, n. 4, p. 1–19, 2019.

ZELENEVA, Inessa V; KHAVKIN, Emil E. *Rearrangement of Enzyme Patterns in Maize Callus and Suspension Cultures Is it Relevant to the Changes in the Growing Cells of the Intact Plant? Planta*. [S.l.: s.n.], 1980.

ZHAN, Yihua *et al.* Expression regulation of a xylanase inhibitor gene riceXIP in rice (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 40, n. 4, p. 983–991, 2017.

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, 2007.

ZHANG, Hanma; RONG, Honglin; PILBEAM, David. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 9, p. 2329–2338, 2007.

ZHANG, Junwei *et al.* Endoplasmic Reticulum Subproteome Analysis Reveals Underlying Defense Mechanisms of Wheat Seedling Leaves under Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences Article*, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms22094840>>.

ZHOU, Lan; LACROUTE, François; THORNBURG, Robert. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of *Arabidopsis thaliana* UMP/CMP kinase. *Plant Physiology*, v. 117, n. 1, p. 245–254, 1998.

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, 2017.

TABELAS SUPLEMENTARES

TABELA SUPLEMENTAR 1 – LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAIZES DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSN COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO CN.

Locus	<i>Fold Change</i>	Descrição (origem)	Nome da sequência (após Blast-p anotação)	Descrição (após Blast-p anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	<i>e-Value</i>	Similaridade média
A0A3B6FKL0	9.3	PNP_UDP_1 proteína contendo domínio	A0A3B6FKL0 WHEAT	PNP_UDP_1 proteína contendo domínio		361	20	0	78.51
A7BJ77	7.8	Inibidor de xilanase GN = Xip-R1	A7BJ77 WHEAT	Inibidor de xilanase	Xip-R1	297	20	0	77.18
A0A3B6SHQ4	5.8	Alanina - glioxilato aminotransferase	A0A3B6SHQ4 WHEAT	Alanina - glioxilato aminotransferase		401	16	0	87.35
A0A3B6MMF1	4.3	Proteína não caracterizada	C7JA73 ORYSJ	Os12g0569100 proteína	Os12g0569100	164	20	1.52E- 121	79.12
A0A3B6KDM2	4.0	Proteína não caracterizada	C7JA73 ORYSJ	Os12g0569100 proteína	Os12g0569100	164	20	1.36E- 121	77.5
A0A3B5ZQU4	3.9	Proteína contendo domínio Lipase_3	A0A3B5ZQU4 WHEAT	Proteína contendo domínio Lipase_3		519	20	0	72.22
A0A1D5TTT2	3.6	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	A0A1D5TTT2 WHEAT	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase		401	20	0	93.66
Q9XPS4	3.6	Proteína GN do centro de reação CP43 do fotossistema II = psbC	PSBC WHEAT	Proteína do centro de reação do fotossistema II CP43	psbC	473	20	0	97.16
Q5TMB2	3.2	Inibidor de xilanase TAXI-IV GN = Taxi-IV	Q5TMB2 WHEAT	Inibidor de xilanase TAXI- IV	Taxi-IV	408	20	0	87.6
A0A3B5YWB5	3.1	Proteína não caracterizada	Q9SWZ5 WHEAT	Proteína secretora	WAS-2	225	20	1.78E- 165	87.36
A0A3B6TID0	3.0	Transcetolase	A0A3B6TID0 WHEAT	Transcetolase		745	20	0	92.19

A0A3B6KJA2	2.7	Formiltetrahidrofolato sintetase	A0A3B6KJA2 WHEAT	Formiltetrahidrofolato sintetase	710	20	0	95.62
A0A3B6DFG8	2.6	Proteína contendo domínio Aldo_ket_red	A0A3B6DFG8 WHEAT	Proteína contendo domínio Aldo_ket_red	326	20	0	87.82
A0A3B6RIZ5	2.5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	A0A3B6RIZ5 WHEAT	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	260	20	0	93.26
A0A3B6H6A6	2.5	Orotato fosforibosiltransferase	A0A3B6H6A6 WHEAT	Orotato fosforibosiltransferase	479	20	0	84.59
A0A3B5Z298	2.5	Fosfoglicerato quinase	A0A3B5Z298 WHEAT	Fosfoglicerato quinase	568	20	0	94.45
A0A3B6TJG2	2.5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	A0A3B6TJG2 WHEAT	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	261	20	0	92.98
A0A3B6JDN5	2.5	Proteína não caracterizada	Y1103 ORYSJ	Proteína semelhante a flavonóide O-metiltransferase	363	20	0	83.77
A0A3B6B623	2.3	D-3-fosfoglicerato desidrogenase	A0A3B6B623 WHEAT	D-3-fosfoglicerato desidrogenase	616	20	0	93.03
W5F8Z5	2.3	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	W5F8Z5 WHEAT	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	263	20	0	93.18
A0A3B6CDE3	2.2	Metilmalonato-semialdeído desidrogenase (acilação CoA)	A0A3B6CDE3 WHEAT	Metilmalonato-semialdeído desidrogenase (acilação CoA)	534	20	0	92.89
A0A3B6ASQ9	2.2	Isomerase xilose	A0A3B6ASQ9 WHEAT	Isomerase xilose	480	20	0	94.48
A0A341ZKV6	2.1	Proteína contendo domínio Pept_C1	A0A341ZKV6 WHEAT	Proteína contendo domínio Pept_C1	199	20	1.33E-147	90.62
A0A1D6AM47	2.1	Aquaporina GN = PIP1	A0A1D6AM47 WHEAT	Aquaporina	292	20	0	95.04
A5HE90	2.1	Proteína de resposta hipersensível GN = hir1	A5HE90 WHEAT	Proteína de resposta hipersensível	284	20	0	95.93
A0A3B6GKE8	2.0	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B6GKE8 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1	349	20	0	71.17
A0A3B5ZNE8	2.0	Proteína não caracterizada	A0A3L6DAW0 MAIZE	Glutelina tipo A 2	358	20	0	93.06
A0A3B6EBI2	2.0	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B6EBI2 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1	349	20	0	70.98
D5MTE2	1.9	Glicosiltransferase GN = TaGTd	D5MTE2 WHEAT	Glicosiltransferase	456	20	0	82.13

	Fosfolipase D	A0A3B6EEL3 WHEAT	Fosfolipase D		812	20	0	94.5
A0A3B6EEL3	1.9							
Q93XQ7	1.9	Proteína dissulfeto-isomerase GN = PDI3	Q93XQ7 WHEAT	Proteína dissulfeto- isomerase	PDI3	20	0	97.44
A0A3B6H5R7	1.9	Proteína não caracterizada	D8L9Q2 WHEAT	Glucano endo-1,3-beta- glucosidase GII, putativo, expresso	TAA_ctg0 661b.0007 0.1	20	0	87.05
A0A3B6H1U9	1.9	OMPdecase	A0A3B6H1U9 WHEAT	OMPdecase		20	0	90.67
A0A3B5XTY5	1.9	Proteína não caracterizada	A0A3L6DAW0 MAIZE	Glutelina tipo A 2	GLUA2	20	0	93.15
A0A3B6U9K3	1.8	Glicosiltransferase	A0A3B6U9K3 WHEAT	Glicosiltransferase		20	0	75.35
W5F826	1.7	Subunidade beta de proteassoma	W5F826 WHEAT	Subunidade beta de proteassoma		20	1.17E- 165	96.81
W5ECL2	1.6	Proteína contendo domínio ribossomal_L2_C	W5ECL2 WHEAT	Proteína contendo domínio ribossomal_L2_C		20	0	96.63
A0A3B6GPC8	1.6	Proteína não caracterizada	A0A3B6FJ19 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1		20	0	71.93
D8L9Q2	1.6	Glucano endo-1,3-beta- glucosidase GII, putativo, GN expresso = TAA_ctg0661b.00070.1	D8L9Q2 WHEAT	Glucano endo-1,3-beta- glucosidase GII, putativo, expresso	TAA_ctg0 661b.0007 0.1	20	0	87.64
A0A0C4BJE5	1.5	Serina hidroximetiltransferase	A0A0C4BJE5 WHEAT	Serina hidroximetiltransferase		20	0	93.37
A0A3B6FG58	1.5	Proteína não caracterizada	A0A3B6FJ19 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1		20	0	69.9
W5GVR2	1.5	Proteína não caracterizada	A0A3B6QGW3 WHEAT	Proteína ribossomal L6 60S		20	5.31E- 160	92.91
Q93W25	1.4	Peptidil-prolil cis-trans isomerase GN = CyP3	Q93W25 WHEAT	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	CyP3	20	7.50E- 126	90.95
A0A3B6HW60	1.4	Fosfoglucmutase (dependente de alfa-D- 1,6-bifosfato)	A0A3B6HW60 WHEAT	Fosfoglucmutase (dependente de alfa-D- glicose-1,6-bifosfato)		20	0	93.94

FONTE: O autor (2021). As identificações satisfizeram tanto a dobra automática quanto os critérios estatísticos, $p < 0,05$. Dados obtido da análise dos dados de espectrometria de massas a partir da busca no banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), analisados na aplicação T-Fold do software PatternLab V e anotadas pelo software Blast2Go usando o banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, sub japonicus, 3994), arábidoopsis (*Arabidopsis thaliana*, 3702) e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

TABELA SUPLEMENTAR 2 – LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAIZES DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS SNXCN E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO SN.

Locus	Fold Change	Descrição (origem)	Nome da sequência Organismo (após Blast-p e anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
A0A3B5Y3I8	8.5	Sulfotransferase	A0A3B5Y3I8 WHEAT	Sulfotransferase		350	20	0	71.97
A0A3B6GP60	5.8	NAD (P) H desidrogenase (quinona)	A0A3B6GP60 WHEAT	NAD (P) H desidrogenase (quinona)		205	20	3.28E- 151	87.67
W5FFT4	3.6	Proteína não caracterizada	B6SNQ7 MAIZE	Proteína ribossomal S16 40S	1001942 65	149	20	3.65E- 104	92.06
A0A3B6H3P5	2.8	Peroxidase	A0A3B6H3P5 WHEAT	Peroxidase		358	20	0	82.59
A0A3B6NR18	2.8	Fenilalanina amônia-liase	A0A3B6NR18 WHEAT	Fenilalanina amônia-liase		704	20	0	95.5
A0A3B5XVD9	2.5	Proteína não caracterizada	Q84UH6 WHEAT	Deidrosscorbato redutase	DHAR	311	20	0	89.91
W5C851	2.5	Histona H4	W5C851 WHEAT	Histona H4	CAMPL R22A2D LOCUS 1956	103	20	2.31E- 67	94.87
A0A3B6SJM6	2.4	Peroxidase	A0A3B6SJM6 WHEAT	Peroxidase		322	20	0	88.68
A0A3B6TMP4	2.4	Peroxidase	A0A3B6TMP4 WHEAT	Peroxidase		322	20	0	88.96
A0A3B6SHP8	2.3	Peroxidase	A0A3B6SHP8 WHEAT	Peroxidase		344	20	0	84.18
A0A3B6QE56	2.0	Proteína não caracterizada	Q8LL15 WHEAT	Glutationa-S-transferase 28e45		230	20	2.08E- 165	87.01
A0A3B5ZWC2	1.9	Proteína não caracterizada	B4FBC9 MAIZE	Patelina-1	1001921 06	610	20	0	83.68
A0A3B6HQJ2	1.8	NAD (P) H desidrogenase (quinona)	A0A3B6HQJ2 WHEAT	NAD (P) H desidrogenase (quinona)		204	20	3.69E- 147	96.12

W5DZS4	1.7	Proteína contendo domínio NAD (P) -bd_dom	W5DZS4 WHEAT	UDP-glucuronato descarboxilase	348	20	0	96.26
W5FX66	1.7	Metilenoetrahidrofolato redutase	W5FX66 WHEAT	Metilenoetrahidrofolato redutase	594	20	0	93.49
C6ES53	1.7	Peroxidase GN = Prx111-A	C6ES53 WHEAT	Peroxidase	Prx111- 316	20	0	87.24
Q41577	1.6	Peroxidase GN = pox1	Q41577 WHEAT	Peroxidase	pox1 316	20	0	86.94
C6ETA8	1.5	Peroxidase GN = Prx111-L	C6ETA8 WHEAT	Peroxidase	Prx111- L 316	20	0	86.8
A0A3B6SPN2	1.4	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	Proteína da família da O- metiltransferase, expressa	LOC_Os 11g2009 0 369	20	0	88.93
A0A3B6TT17	1.4	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	Proteína da família da O- metiltransferase, expressa	LOC_Os 11g2009 0 369	20	0	89.1
C6ETA5	1.4	Peroxidase GN = Prx112-A	C6ETA5 WHEAT	Peroxidase	Prx112- A 314	20	0	97.28

FORNTE: O autor (2021). As identificações satisfizeram tanto a dobra automática quanto os critérios estatísticos, $p < 0,05$. Dados obtido da análise dos dados de espectrometria de massas a partir da busca no banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), analisados na aplicação T-Fold do software PatternLab V e anotadas pelo software Blast2Go usando o banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, sub japonicus, 3994), arábidoopsis (*Arabidopsis thaliana*, 3702) e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

TABELA SUPLEMENTAR 3 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO CN NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSN.

Índice Proteína	Locus	Nº réplicas	Descrição (origem)	Nome da sequência (após Blast-p e anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	<i>e-Value</i>	Similaridade média
8	A0A3B6LRK8	3	Lipoxigenase	A0A3B6LRK8	Lipoxigenase		864	20	0	90.19
13	P20858	3	ATP sintase subunidade beta, cloroplástico GN = atpB	WHEAT A0A2I4R1S2	ATP sintase subunidade beta, cloroplástico	atpB	498	20	0	98.7
15	W5D322	2	Fosfoglicerato mutase (2,3-difosfoglicerato independente) GN = TRAES_3BF013300030CF D_cl	WHEAT W5D322	Fosfoglicerato mutase (independente de 2,3-difosfoglicerato)	TRAES_3BF013300030CF D_cl	557	20	0	94.69
35	W5D4Q6	2	Fosfolipase D GN = TRAES_3BF048200040CF D_cl	W5D4Q6 WHEAT	Fosfolipase D	TRAES_3BF048200040CF D_cl	812	20	0	94.42
56	A0A3B6CIR4	3	Piruvato quinase	A0A3B6CIR4	Piruvato quinase		514	20	0	94.51
58	A0A3B5XVF6	3	Proteína contendo domínio aminotran_1_2	WHEAT A0A3B5XVF6	Proteína contendo domínio aminotran_1_2		482	20	0	93.56
74	Q8W0Q1	3	Aldeído desidrogenase putativo WIS1 GN = wis1	WHEAT Q8W0Q1	Aldeído desidrogenase putativo WIS1	wis1	551	20	0	92.93
79	A0A3B6QMZ5	3	Proteína contendo domínio CYTOSOL_AP	WHEAT A0A3B6QMZ5	Proteína contendo domínio CYTOSOL_AP		633	20	0	89.87
88	A0A1D5UV66	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A1D5UV66	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPL R22A2D	578	20	0	94.31

		WHEAT			LOCUS_410				
92	A0A3B6JD70	2	Lipoxigenase	A0A3B6JD70	Lipoxigenase	829	20	0	90.14
96	A0A3B6MRE2	2	Endo-1,3 (4) -beta-glucanase	WHEAT A0A3B6MRE2	Endo-1,3 (4) -beta-glucanase	748	20	0	86.43
98	A0A3B5ZMV6	2	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	WHEAT A0A3B5ZMV6	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	362	20	0	93.58
109	Q1XH04	3	4-hidroxi-7-metoxi-3-oxo-3,4-di-hidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il glucosídeo beta-D-glucosidase 1c, GN cloroplástico = GLU1C	WHEAT HGL1C	4-hidroxi-7-metoxi-3-oxo-3,4-di-hidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il glucosídeo beta-D-glucosidase 1c, cloroplástico	570	20	0	88.14
127	A0A3B6KN33	2	Proteína não caracterizada	A0A0N7KR63	Os09g0535000 proteína cloroplástico	301	20	0	91.98
148	A0A3B6H1E6	3	Proteína não caracterizada	ORYSJ Q5CAL1	Putative glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (Fragment)	310	20	0	92.43
160	A0A3B6GRV2	2	ATP sintase subunidade alfa	WHEAT A0A3B6GRV2	ATP sintase subunidade alfa	500	20	0	95.94
166	A0A3B5Y6G2	3	Proibitina	WHEAT A0A3B5Y6G2	Proibitina	288	20	0	92.5
167	A0A3B6KIN5	3	Proteína contendo domínio Aldedh	WHEAT A0A3B6KIN5	Proteína contendo domínio Aldedh	509	20	0	96.19
176	A0A3B5ZNI3	2	Mannan endo-1,4-beta-manosidase	WHEAT A0A3B5ZNI3	Mannan endo-1,4-beta-manosidase	1074	20	0	85.67
196	A0A3B5Z289	2	Fosfotransferase	WHEAT A0A3B5Z289	Fosfotransferase	507	20	0	94.64
220	A0A3B6HY41	2	Aldeído desidrogenase	WHEAT A0A3B6HY41	Aldeído desidrogenase	481	20	0	88.74

247	A0A096URP1	2	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	WHEAT A0A096URP1	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	286	20	0	88.76	
251	P58311	3	Clorofila a apoproteína A1 GN do fotossistema I P700 = psaA	WHEAT A0A2I4R1R9	Clorofila a apoproteína A1 do fotossistema I P700	750	20	0	99.63	
276	A0A3B6I733	2	Ferredoxina - NADP redutase, cloroplástico	WHEAT A0A3B6I733	Ferredoxina - NADP redutase, cloroplástico	362	20	0	90.18	
288	A0A3B6IPZ0	3	Proteína contendo domínio SERPIN	WHEAT A0A3B6IPZ0	Proteína contendo domínio SERPIN	399	20	0	88.03	
293	A0A3B6JDF8	3	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A0P0W1B6	Proteína Os03g0661600 (Fragmento)	233	20	1,40 E-166	86.2	
318	A0A1D5UH99	2	Quitinase	ORYSJ A0A1D5UH99	Quitinase	CAMPL R22A2D _LOCUS 3502	275	20	0	79.54
348	A0A3B6TMY1	2	Frutose-bisfosfato aldolase	WHEAT A0A3B6TMY1	Frutose-bisfosfato aldolase	360	20	0	90.16	
350	A0A3B6DAI8	3	Peroxidase	WHEAT A0A3B6DAI8	Peroxidase	313	20	0	90.59	
356	A0A3B6IXG9	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A3L6EDY7		VSPA	276	20	0	88.83
368	A0A3B6LFV2	3	Proteína não caracterizada	MAIZE C7JA73	Os12g0569100 proteína	Os12g05 69100	164	20	2,38 E-116	77.66
401	A0A3B6QKN1	3	Proteína semelhante a germin	ORYSJ A0A3B6QKN1	Proteína semelhante a germin	216	20	2,29 E-151	91.81	
436	A0A3B6LSI4	3	Proteína não caracterizada	WHEAT Q0LZS5 ORYSJ	Proteína Os09g052600	Os09g05 52600	358	20	0	67.97

455	A0A3B5XZ66	3	Proteína não caracterizada	Q8RW01	Glutaciona transferase	gstu2	233	20	1,15 E- 163	83.12
504	A0A3B6C1U7	2	Proteína não caracterizada	WHEAT Q0D4A3	Os07g0638100 proteína	OJ1340_ C08.105	654	20	0	75.03
508	A0A3B5Y1A6	3	Proteína semelhante a CASP	ORYSJ A0A3B5Y1A6	Proteína semelhante a CASP		189	20	4,62 E- 130	71.39
509	A0A3B6LM04	2	Trehalose 6-fosfato fosfatase	WHEAT A0A3B6LM04	Trehalose 6-fosfato fosfatase		871	20	0	85.98
510	A0A3B6SHK0	2	Transaldolase	WHEAT A0A3B6SHK0	Transaldolase		396	20	0	84.28
545	A0A3B6JDX6	3	Proteína semelhante a germin	WHEAT A0A3B6JDX6	Proteína semelhante a germin		224	20	1,65 E- 159	96.13
549	A0A3B6EUA2	3	Proteína não caracterizada	WHEAT Q5CAL1	Glucano putativo endo- 1,3-beta-D-glucosidase (Fragmento)	wgluc5	310	20	0	92.56
554	A0A3B6MY02	2	Lipoxigenase	WHEAT A0A3B6MY02	Lipoxigenase		864	20	0	90.23
578	Q6QU77	2	Proteína intrínseca Delta tonoplast TIP2; 3	WHEAT Q6QU77	Proteína intrínseca Delta tonoplast TIP2; 3		248	20	8,14 E- 169	93.06
590	A0A1D5V0W9	3	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A1D5V0W9	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPL R22A2D _LOCUS _1601	367	20	0	78.2
628	P11534	3	Proteína ribossomal L2 50S, GN cloroplástico = rp12-A	RK2	Proteína ribossômica L2 50S, cloroplástica	rp12-A	273	20	0	92.63
641	A0A3B6HXP8	3	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A0P0W1B6	Proteína Os03g0661600 (Fragmento)	Os03g06 61600	229	20	1,63 E- 163	86.22
				ORYSJ						

666	A0A3B6H679	2	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilação	A0A3B6H679	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilação	495	20	0	96.93
668	A0A3B6GXH5	3	Proteína contendo domínio ATP-synt_ab	WHEAT A0A3B6GXH5	Proteína contendo domínio ATP-synt_ab	136	20	7,93 E-90	86.42
703	A0A3B6LMJ2	2	Proteína não caracterizada	WHEAT Q84VG2	Proteína Os09g0425900	270	20	0	79.77
704	A0A3B6THF8	3	Plastocianina	ORYSJ A0A3B6THF8	Plastocianina	154	16	7,91 E-	81.82
706	A0A3B5Z338	2	Folato gama-glutamil hidrolase	WHEAT A0A3B5Z338	Folato gama-glutamil hidrolase	337	20	103 0	82.74
775	A0A3B6HPC0	2	Fosfomanomutase	WHEAT A0A3B6HPC0	Fosfomanomutase	189	20	4,39 E-	95.88
813	A0A3B6SGH3	2	Frutose-bisfosfato aldolase	WHEAT A0A3B6SGH3	Frutose-bisfosfato aldolase	360	20	139 0	90.36
826	A0A3B6IM98	2	Proteína não caracterizada	WHEAT B6TQC0	3-N-desbenzoil-2-desoxitaxol N-benzoiltransferase	427	20	0	86.1
831	A0A3B6IS97	2	Proteína não caracterizada	MAIZE A7BJ78	Inibidor de xilanase	238	20	9,78 E-	61.19
832	A0A3B6ET26	3	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A3B6H433	Proteína contendo domínio de epimerase	397	20	175 0	87.04
843	A0A3B6B1C5	3	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	WHEAT A0A3B6B1C5	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	401	20	0	93.66
920	W5HY47	2	Proteína contendo domínio KOW	WHEAT W5HY47	Proteína contendo domínio KOW	191	20	2,88 E-	76.2
921	A0A1D5URZ0	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A1D5URZ0	Montagem do genoma, cromossomo: II	170	20	7,31 E-	87.84
				WHEAT	CAMPL R22A2D			118	

	LOCUS									
926	A0A3B6U2W8	2	Proteína dirigente	A0A3B6U2W8	Proteína dirigente	316	20	0	77.58	
				WHEAT						
932	A0A3B6PPU9	2	Proteína não caracterizada	A7J2I4	Proteína intrínseca Tonoplast	249	20	1,05 E-	95.2	
				WHEAT					169	

FONTE: O Autor (2021) - Dados obtido por análise proteômica a partir da busca no banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), expressos no diagrama de venn pelo software pattemlab v e anotadas pelo software blast2go usando o banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*oriza sativa*, sub japonicus, 3994), arábido (*Arabidopsis thaliana*, 3702) e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae*, 757424)

TABELA SUPLEMENTAR 4 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SN NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSN.

Índice Proteína	Locus	Nº réplicas	Descrição (origem)	Nome da sequência (após anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
34	A0A3B6EDX0	3	Proteína não caracterizada	Q9FVM9	Citocromo P450		501	20	0	93.23
				WHEAT						
53	A0A3B6A203	2	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	A0A3B6A203	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD		540	20	0	85.38
				WHEAT						
59	A0A3B6ISB7	2	UDP-arabinopiranosose mutase	A0A3B6ISB7	UDP-arabinopiranosose mutase		368	20	0	95.62
				WHEAT						
77	A0A3B6FYA0	3	Peroxidase	A0A3B6FYA0	Peroxidase		357	20	0	82.68
				WHEAT						
89	A0A3B6TDG8	3	Peroxidase	A0A3B6TDG8	Peroxidase		348	20	0	82.66
				WHEAT						
102	A0A3B6EBZ6	3	14_3_3 proteína contendo domínio	A0A3B6EBZ6	14_3_3 proteína contendo domínio		262	20	0	97.41
				WHEAT						
111	A0A3B6SSM1	2	Peroxidase	A0A3B6SSM1	Peroxidase		345	20	0	85.81
				WHEAT						
208	A0A3B6TKT0	2	Peroxidase	A0A3B6TKT0	Peroxidase		318	20	0	89.94
				WHEAT						
213	A0A3B6RP58	3	Quitinase	A0A3B6RP58	Quitinase		317	20	0	90.54
				WHEAT						
225	A0A3B6R8P8	2	Peroxidase	A0A3B6R8P8	Peroxidase		362	20	0	85.1
				WHEAT						

239	D8LAL9	3	Hidroquinona glucosiltransferase, putativa, expressa	WHEAT D8LAL9	Hidroquinona glucosiltransferase, putativa, expressa	HGT_1	493	20	0	87.49
246	A0A3B6MMK9	2	Proteína contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse	WHEAT A0A3B6MMK9	Proteína contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse		109	20	8.35E-75	78.72
252	A0A3B6PQA3	3	Proteína não caracterizada	WHEAT K7U9N2	Proteína da família da subtilase putativa	103654	784	20	0	86.94
279	A0A3B6MVZ5	2	Proteína contendo domínio Aldo_ket_red	MAIZE A0A3B6MVZ5	Proteína contendo domínio Aldo_ket_red		350	20	0	90.23
283	A0A3B6SEU6	2	3-oxoacil- [acil-carreadora de proteína] sintase	WHEAT A0A3B6SEU6	3-oxoacil- [acil-carreadora de proteína] sintase		463	20	0	94.71
309	A0A3B6H0S2	2	Proteína contendo o domínio DEK_C	WHEAT A0A3B6H0S2	Proteína contendo o domínio DEK_C		492	20	0	71.82
310	A0A3B5YUD2	3	Glutationa transferase	WHEAT A0A3B5YUD2	Glutationa transferase		222	20	2.15E-162	85.55
314	C5H4Q6	3	Peroxidase GN = Prx109-C	WHEAT C5H4Q6	Peroxidase	Prx109-C	329	20	0	95.34
364	A0A3B6IS32	2	Proteína não caracterizada	WHEAT O82071	Proteína In2.1 putativa	cla30	243	20	0	85.23
366	A0A3B6KCR72	2	Proteína contendo domínio H15	WHEAT A0A3B6KCR72	Proteína contendo domínio H15		289	20	1.29E-170	84.7
406	A0A3B5Y4N2	2	Proteína não caracterizada	WHEAT Q9ZRC1	O-metiltransferase		372	20	0	74.5
411	A0A3B5XZ69	3	Proteína não caracterizada	WHEAT B4FB36	Glutationa S-transferase U16	100192	236	20	4.64E-173	83.32
				MAIZE						

414	A0A3B6TLT2	2	Proteína não caracterizada	B4FMB1 MAIZE	Proteína da família DUF538	100276 213	157	20	7.55E-113	81.48
418	A0A1D5UXT7	2	Inibidor de Cisteína Proteinase	A0A1D5UXT7 WHEAT	Inibidor de Cisteína Proteinase	CAMP LR22A 2D_LO CUS11 34	123	20	2.56E-84	82.72
454	A0A3B6IVD7	2	Proteína não caracterizada	Q8LGN6 WHEAT	Glutationa-S-transferase Cla47		233	20	2.74E-171	82.58
464	A0A3B5Y7F7	2	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	A0A3B5Y7F7 WHEAT	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD		510	20	0	80.6
478	F8S6V1	2	Proteína relacionada à patogênese 1-21 GN = Pr-1-21	F8S6V1 WHEAT	Proteína relacionada à patogênese 1-21	Pr-1-21	174	20	1.35E-128	88.67
487	A0A3B6C3H9	3	Proteína contendo domínio de fitocianina	A0A3B6C3H9 WHEAT	Proteína contendo domínio de fitocianina		188	20	1.21E-132	68.38
535	Q43312	2	Proteína H2A.7 GN = H2A-4	A0A7H4LFQ6 WHEAT	Histona H2A	CAMP LR22A 2D_LO CUS20 54	134	20	4.34E-91	95.5
550	A0A3B6NTD5	3	Proteína não caracterizada	U3LW54 WHEAT	Protease de subtilisina associada à senescência	SSP1	783	20	0	82.02
553	A0A3B6TN46	2	Peroxidase	A0A3B6TN46 WHEAT	Peroxidase		320	20	0	84.26
557	A0A3B6KJV1	2	Proteína contendo domínio de fitocianina	A0A3B6KJV1 WHEAT	Proteína contendo domínio de fitocianina		163	20	8.71E-109	79.57
571	A0A3B6A3X8	2	Proteína contendo domínio SHSP	A0A3B6A3X8 WHEAT	Proteína contendo domínio SHSP		292	20	0	65.5
579	A0A3B6LD45	2	Proteína não caracterizada	A0A075FFX7 WHEAT	Transportador de sacarose 2D	SUT2D	510	20	0	89.81

627	A0A3B6ATD7	3	Proteína contendo domínio EFI_GNE	WHEAT A0A3B6ATD7	Proteína contendo domínio EFI_GNE	218	20	5.21E- 158	86.2
630	A0A3B6QKK8	2	Proteína não caracterizada	WHEAT B4ERX7	O-metiltransferase	403	20	0	89.15
634	A0A3B6ERA2	2	Carboxipeptidase	WHEAT A0A3B6ERA2	Carboxipeptidase	498	20	0	83.52
639	A0A3B6C058	2	Peroxidase	WHEAT A0A3B6C058	Peroxidase	319	20	0	90.29
644	A0A3B6SQ77	2	Peroxidase	WHEAT A0A3B6SQ77	Peroxidase	325	20	0	94.25
652	A0A3B5ZZ53	3	Sulfotransferase	WHEAT A0A3B5ZZ53	Sulfotransferase	350	20	0	73.14
655	A0A3B6ASF0	2	Peroxidase	WHEAT A0A3B6ASF0	Peroxidase	316	20	0	86.12
664	A0A077S6B3	2	Proteína GN contendo domínio PfkB = TRAES_3BF078000040CFD_c 1	WHEAT A0A077S6B3	Proteína contendo domínio PfkB	323	20	0	92.3
691	A0A3B6MVV0	3	Proteína não caracterizada	WHEAT B6U525	Proteína da família DUF674	287	20	0	65.61
694	A0A3B6IUD0	2	Proteína contendo domínio AAI	MAIZE A0A3B6IUD0	Proteína contendo domínio AAI	141	20	4.28E- 97	84.59
695	A0A3B6FXL1	2	Serina / treonina proteína quinase não específica	WHEAT A0A3B6FXL1	Serina / treonina proteína quinase não específica	466	20	0	89.21
778	A0A3B6U6P5	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A075FFX7	Transportador de sacarose 2D	483	20	0	84.72

785	A0A3B6SPD7	2	Peroxidase	A0A3B6SPD7	Peroxidase	320	20	0	83.56
812	A0A3B6Q9Q4	2	Histona H2A	WHEAT A0A3B6Q9Q4	Histona H2A	147	20	3.49E-100	99.25
827	A0A3B6MNY1	2	Proteína contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse	WHEAT A0A3B6MNY1	Proteína contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse	133	20	3.08E-94	78.18
829	A0A3B6GN02	3	Proteína não caracterizada	D8LAL9	Hidroquinona glucosiltransferase, putativa, expressa	HGT_1 491	20	0	87.37
837	A0A3B6RLR1	2	Peroxidase	WHEAT A0A3B6RLR1	Peroxidase	319	20	0	88.55
847	A0A3B6C7J8	2	Histona H2B	WHEAT A0A3B6C7J8	Histona H2B	152	20	1.31E-102	92.34
856	A0A3B6GQ57	3	Fosfolipase D	WHEAT A0A3B6GQ57	Fosfolipase D	812	20	0	94.54
862	A0A3B6SEF5	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A7H4LLT0	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMP LR22A 2D_LO CUS41 87	20	1.02E-95	79.35
863	Q5S1S6	2	Peroxirredoxina Q, cloroplástico GN = PRX1	PRXQ	Peroxirredoxina Q, cloroplástico	PRX1 217	20	1.96E-160	84.04
871	A0A3B6AW96	2	Proteína contendo domínio CAAD	WHEAT A0A3B6AW96	Proteína contendo domínio CAAD	166	20	2.07E-118	62.78
878	A0A3B6PKJ3	2	5'-nucleotidase	WHEAT A0A3B6PKJ3	5'-nucleotidase	302	20	0	76.18
881	B2B9T8	3	Subunidade F GN de próton ATPase tipo V = TRAES_3BF067200020CFD_c 1	WHEAT B2B9T8	Subunidade F de próton ATPase tipo V	TRAES_3BF06720002 130	18	5.58E-91	97.48

OCFD_c

1

FONTE: O Autor (2021) - Dados obtido por análise proteômica a partir da busca no banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), expressos no diagrama de venn pelo software patternlab v e anotadas pelo software blast2go usando o banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, sub japonicus, 3994), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, 3702 e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae*, 757424)

TABELA SUPLEMENTAR 5 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SN NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI.

Índice Proteína	Locus	Nº réplicas	Descrição (origem)	Nome da sequência Blast-p e anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
34	A0A3B6EDX0	3	Proteína não caracterizada	Q9FVM9 WHEAT	Citocromo P450		501	20	0	93.23
50	A0A1D6B308	3	S-adenosilmetionina sintase	A0A1D6B308 WHEAT	S-adenosilmetionina sintase		394	20	0	97.6
59	A0A3B6ISB7	2	UDP-arabinopiranosose mutase	A0A3B6ISB7 WHEAT	UDP-arabinopiranosose mutase		368	20	0	95.62
77	A0A3B6FYA0	3	Peroxidase	A0A3B6FYA0 WHEAT	Peroxidase		357	20	0	82.68
101	A0A3B6GN50	3	Histona H2B	A0A3B6GN50 WHEAT	Histona H2B		152	20	2,86E-99	92.9
102	A0A3B6EBZ6	3	14_3_3 proteína contendo domínio Proteína não caracterizada	A0A3B6EBZ6 WHEAT	14_3_3 proteína contendo domínio		262	20	0	97.41
108	W5FEV1	3		A0A7H4LM68 WHEAT	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPLR 22A2D_L OCUS433 0	244	20	1,92E-173	96.49
111	A0A3B6SSM1	2	Peroxidase	A0A3B6SSM1 WHEAT	Peroxidase		345	20	0	85.81
175	W5D739	3	Proteína GN contendo domínio KOW = TRAES_3BF073700020CFD_c1	W5D739 WHEAT	Proteína contendo domínio KOW	TRAES_3 BF073700 020CFD_ c1	157	20	6,50E-106	95.73
193	A0A3B6EIU5	3	Glutationona transferase	A0A3B6EIU5 WHEAT	Glutationona transferase		212	20	1,88E-152	88.7
208	A0A3B6TKT0	2	Peroxidase	A0A3B6TKT0 WHEAT	Peroxidase		318	20	0	89.94
216	A0A3B6LSA0	2	Proteína não caracterizada	Q01ZS6 ORYSJ	Proteína Os09g0552500	Os09g055 2500	338	20	0	69.76

245	A0A3B6HTK9	3	Subunidade gama de Coatomer	A0A3B6HTK9 WHEAT	896	20	0	92.12	Subunidade gama de Coatomer
246	A0A3B6MMK9	2	Proteína contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse	A0A3B6MMK9 WHEAT	109	20	8,35E-70	78.72	Proteína contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse
252	A0A3B6PQA3	3	Proteína não caracterizada	K7U9N2 WHEAT	784	20	0	86.94	Proteína da família da subtilase putativa
253	A0A3B5XY60	3	Proteína não caracterizada	B4FID1 WHEAT	143	20	1,83E-97	92.09	Proteína ribossômica 40S S17-1
279	A0A3B6MVZ5	2	Proteína contendo domínio Aldo_ket_red	A0A3B6MVZ5 WHEAT	350	20	0	90.23	Proteína contendo domínio Aldo_ket_red
280	Q5I7L3	2	Proteína ribossomal	Q5I7L3 WHEAT	216	20	1,56E-154	97.22	Proteína ribossomal
283	A0A3B6SEU6	2	3-oxoacil- [acil-carreadora de proteína] sintase	A0A3B6SEU6 WHEAT	463	20	0	94.71	3-oxoacil-
301	A0A3B5ZU59	3	Proteína não caracterizada	Q7XCK0 ORYSJ	253	20	0	79.99	Glutathiona S-transferase GST
305	A0A3B6B891	3	Peroxidase	A0A3B6B891 WHEAT	346	20	0	77.5	Peroxidase
309	A0A3B6H0S2	2	Proteína contendo o domínio DEK_C	A0A3B6H0S2 WHEAT	492	20	0	71.82	Proteína contendo o domínio DEK_C
312	A0A3B6DFD8	3	Proteína contendo domínio Aldo_ket_red	A0A3B6DFD8 WHEAT	344	20	0	90.13	Proteína contendo domínio Aldo_ket_red
322	A0A3B6B996	3	Peroxidase	A0A3B6B996 WHEAT	352	20	0	73.92	Peroxidase
344	A0A1D5UL37	3	Peroxidase	A0A1D5UL37 WHEAT	344	20	0	81.34	Peroxidase CAMPLR 22A2D_L OCUS572 4
364	A0A3B6IS32	2	Proteína não caracterizada	O82071 WHEAT	243	20	0	85.23	Proteína In2.1 putativa cla30
399	A0A3B6TDB6	3	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	368	20	0	87.46	Proteína da família da O-metiltransferase, expressa l20090
405	W5ERE6	2	Proteína não caracterizada	B9FB70 ORYSJ	610	20	0	94.27	Proteína de ligação a GTP putativa OsJ_1233 3
411	A0A3B5XZ69	3	Proteína não caracterizada	B4FB36 WHEAT	236	20	4,64E-168	83.32	Glutathiona S-transferase U16 3
414	A0A3B6TLT2	2	Proteína não caracterizada	B4FMB1 WHEAT	157	20	7,55E-108	81.48	Proteína da família DUF538 3

415	A0A3B6D5G4	3	Proteína não caracterizada	A0A1D5V061 WHEAT	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPLR 22A2D_L OCUS108 2	306	20	0	82.61
418	A0A1D5UXT7	2	Inibidor de Cisteína Proteinase	A0A1D5UXT7 WHEAT	Inibidor de Cisteína Proteinase	CAMPLR 22A2D_L OCUS113 4	123	20	2,56E-79	82.72
424	A0A3B6QK15	2	Proteína não caracterizada	B6TBW2 WHEAT	Cadeia delta da sintase ATP	10028283 7	232	20	7,38E-165	84.37
431	W5ET99	3	Proteína não caracterizada	B4FF26 WHEAT	Proteína associada à classificação de proteína vacuolar 26A	10019344 9	304	20	0	93.55
454	A0A3B6IVD7	2	Proteína não caracterizada	Q8LGN6 WHEAT	Glutamina-S-transferase Cla47	2,74E-166	233	20	2,74E-166	82.58
457	A0A3B6C101	3	Proteína contendo domínio EF1_GNE	A0A3B6C101 WHEAT	Proteína contendo domínio EF1_GNE	2,92E-152	218	20	2,92E-152	85.8
467	A0A3B6TRP9	3	14_3_3 proteína contendo domínio	A0A3B6TRP9 WHEAT	14_3_3 proteína contendo domínio	0	261	20	0	89.68
474	A0A3B6B937	3	Peroxidase	A0A3B6B937 WHEAT	Peroxidase	0	337	20	0	74.09
478	F8S6V1	2	Proteína relacionada à patogênese 1-21 GN = Pr-1- 21	F8S6V1 WHEAT	Proteína relacionada à patogênese 1-21	Pr-1-21	174	20	1,35E-123	88.67
493	A0A3B6A1A1	2	Proteína não caracterizada	B4FSX7 WHEAT	(+) - neomentol desidrogenase	10028107 6	312	20	0	79.24
532	A0A3B6NUS8	3	Proteína semelhante a germin	A0A3B6NUS8 WHEAT	Proteína semelhante a germin	5,89E-152	216	20	5,89E-152	91.34
553	A0A3B6TN46	2	Peroxidase	A0A3B6TN46 WHEAT	Peroxidase	0	320	20	0	84.26
555	A0A1D5THS1	3	Proteína não caracterizada	A0A1D5THS1 WHEAT	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPLR 22A2D_L OCUS325 8	119	20	9,83E-76	97.78
579	A0A3B6LD45	2	Proteína não caracterizada	A0A075FFX7 WHEAT	Transportador de sacarose 2D	SUT2D	510	20	0	89.81
584	W5CT58	3	Proteína GN não caracterizada =	B9EQZ3 ORYSJ	Relacionado a proteínas de ligação a DNA	Os01g075 4100	139	20	7,47E-94	82.5

TRAES_3BF046100030CFD

625	A0A3B5ZNP1	3	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	A0A3B5ZNP1 WHEAT	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	362	20	0	93.87
627	A0A3B6ATD7	3	Proteína contendo domínio EF1_GNE	A0A3B6ATD7 WHEAT	Proteína contendo domínio EF1_GNE	218	20	5,21E-153	86.2
629	A0A3B6H355	2	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B6H355 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1	416	20	0	81.45
639	A0A3B6C058	2	Peroxidase	A0A3B6C058 WHEAT	Peroxidase	319	20	0	90.29
644	A0A3B6SQ77	2	Peroxidase	A0A3B6SQ77 WHEAT	Peroxidase	325	20	0	94.25
652	A0A3B5ZZ53	3	Sulfotransferase	A0A3B5ZZ53 WHEAT	Sulfotransferase	350	20	0	73.14
656	A0A3B5Z6K1	3	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	A0A3B5Z6K1 WHEAT	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	538	20	0	85.76
672	A0A3B5ZYU5	2	Tioredoxina	A0A3B5ZYU5 WHEAT	Tioredoxina	126	20	1,08E-82	89.03
678	W5AP46	3	Proteína não caracterizada	W5AP46 WHEAT	Montagem do genoma, cromossomo: II	113	20	9,41E-70	89.86
679	W5EE50	2	Glicosiltransferase	W5EE50 WHEAT	Glicosiltransferase	461	20	0	80.03
682	A0A3B6KP84	3	Subunidade 7 do complexo citocromo b-c1	A0A3B6KP84 WHEAT	Subunidade 7 do complexo citocromo b-c1	123	20	1,54E-81	90.06
688	A0A3B6PHS5	2	Proteína não caracterizada	A0A3B6PHS5 WHEAT	Proteína não caracterizada	1421	20	0	84.4
695	A0A3B6FXL1	2	Serina / treonina proteína quinase não específica	A0A3B6FXL1 WHEAT	Serina / treonina proteína quinase não específica	466	20	0	89.21
779	W5HFJ0	3	Proteína não caracterizada	B6SJB0 WHEAT	Proteína ribossomal L31 60S	122	20	3,05E-81	92.94
785	A0A3B6SPD7	2	Peroxidase	A0A3B6SPD7 WHEAT	Peroxidase	320	20	0	83.56
810	A0A3B5YXR1	3	Proteína não caracterizada	Q8LL15 WHEAT	Glutationa-S-transferase 28e45	114	20	1,52E-74	90.65
812	A0A3B6Q9Q4	2	Histona H2A	A0A3B6Q9Q4 WHEAT	Histona H2A	147	20	3,49E-95	99.25

814	A0A3B6FVD4	2	Proteína contendo o domínio DEK_C	A0A3B6FVD4 WHEAT	492	20	0	70.52	Proteína contendo o domínio DEK_C
821	A0A3B6GP60	3	NAD(P)H desidrogenase (quinona)	A0A3B6GP60 WHEAT	205	20	3,28E-146	87.67	NAD(P)H desidrogenase (quinona)
825	A0A3B5YWZ3	3	Proteína não caracterizada	B4FID1 WHEAT	143	20	2,28E-97	92.17	Proteína ribossômica 40S S17-1
827	A0A3B6MNY1	2	Proteína contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse	A0A3B6MNY1 WHEAT	133	20	3,08E-89	78.18	Proteína contendo domínio barrel A / B de resposta ao estresse
837	A0A3B6RLR1	2	Peroxidase	A0A3B6RLR1 WHEAT	319	20	0	88.55	Peroxidase
847	A0A3B6C7J8	2	Histona H2B	A0A3B6C7J8 WHEAT	152	20	1,31E-97	92.34	Histona H2B
855	A0A3B6ARQ4	2	Proteína não caracterizada	A0A3L6F3I7 WHEAT	864	20	0	84.96	Proteína do ciclo de divisão celular 48
863	Q5S1S6	2	Peroxirredoxina Q, cloroplástico	PRXQ WHEAT	217	20	1,96E-155	84.04	PRX1
868	W5HPH0	3	Proteína semelhante a Sm LSM2	Q0J7Y5 ORYSJ	93	20	3,15E-59	83.91	Os08g0154700
871	A0A3B6AW96	2	Proteína contendo domínio CAAD	A0A3B6AW96 WHEAT	166	20	2,07E-113	62.78	Proteína contendo domínio CAAD
881	B2B9T8	3	Subunidade F GN de próton ATPase tipo V = TRAES_3BF067200020CFD	B2B9T8 WHEAT	130	18	5,58E-86	97.48	Subunidade F de próton ATPase tipo V TRAES_3BF067200020CFD_c1
882	A0A3B6JG47	2	Proteína contendo domínio de isocorismatase	A0A3B6JG47 WHEAT	248	20	0	88.33	Proteína contendo domínio de isocorismatase
260	A0A3B6LM27	2	Proteína não caracterizada	Q0WYG6 WHEAT	361	20	0	88.18	Triticain gama
307	A0A3B6EFT9	2	S-adenosilmetionina sintase	A0A3B6EFT9 WHEAT	394	20	0	98.29	S-adenosilmetionina sintase
406	A0A3B5Y4N2	2	Proteína não caracterizada	Q9ZRC1 WHEAT	372	20	0	74.5	O-metiltransferase
486	A0A0C4BK11	2	Proteína não caracterizada	A0A3L6DVA9 WHEAT	112	20	2,73E-74	97.23	Proteína ribossômica 60S L35a-3
557	A0A3B6KJV1	2	Proteína contendo domínio de fitocianina	A0A3B6KJV1 WHEAT	163	20	8,71E-106	79.57	Proteína contendo domínio de fitocianina
630	A0A3B6QKK8	2	Proteína não caracterizada	B4ERX7 WHEAT	403	20	0	89.15	O-metiltransferase

778	A0A3B6U6P5	2	Proteína não caracterizada	A0A075FFX7 WHEAT	Transportador de sacarose 2D	SUT2D	483	20	0	84.72
818	A0A3B6D567	2	Proteína contendo domínio Oxidored FMN	A0A3B6D567 WHEAT	Proteína contendo domínio Oxidored FMN		330	20	0	82.08

FONTE: O Autor (2021) - dados obtido por análise proteômica a partir da busca no banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), expressos no diagrama de venn pelo software patternlab v e anotadas pelo software blast2go usando o banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, SUB japonicus, 3994), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, 3702 e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae*, 757424)

TABELA SUPLEMENTAR 6 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SNI NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS SNI/SNI.

Índice Proteína	Locus	Nº réplicas	Descrição (origem)	Nome da sequência (após Blast-p e anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
58	A0A3B5XVF6	3	Proteína contendo domínio aminotran_1_2	A0A3B5XVF6_WH EAT	Proteína contendo domínio aminotran_1_2		482	20	0	93.56
13	P20858	2	ATP sintase subunidade beta, cloroplástico GN = atpB	A0A2I4R1S2_WHE AT	ATP sintase subunidade beta, cloroplástico	atpB	498	20	0	98.7
233	Q4JH28	3	Beta-1,3-glucanase	Q4JH28_WHEAT	Beta-1,3-glucanase		334	20	0	92.91
318	A0A1D5UH99	3	Quitinase	A0A1D5UH99_WH EAT	Quitinase	CAMP LR22 A2D LOCU S3502	275	20	0	79.54
79	A0A3B6QMZ5	2	Proteína contendo domínio CYTOSOL_AP	A0A3B6QMZ5_W HEAT	Proteína contendo domínio CYTOSOL_AP		633	20	0	89.87
578	Q6QU77	3	Proteína intrínseca Delta tonoplast TIP2; 3	Q6QU77_WHEAT	Proteína intrínseca Delta tonoplast TIP2; 3		248	20	8,14E-169	93.06
429	A0A3B6LJD4	2	Proteína contendo o domínio DUF3700	A0A3B6LJD4_WH EAT	Proteína contendo o domínio DUF3700		236	20	7,51E-168	88.95
96	A0A3B6MRE2	2	Endo-1,3 (4) -beta-glucanase	A0A3B6MRE2_W HEAT	Endo-1,3 (4) -beta-glucanase		748	20	0	86.43
82	A0A3B6FKR5	2	Proteína contendo domínio N-terminal importina	A0A3B6FKR5_WH EAT	Proteína contendo domínio N-terminal importina		981	20	0	90.94
369	A0A3B6NUM8	2	Proteína contendo domínio Lipase_GDSL	A0A1D6HJU1_MA IZE	GDSL esterase / lipase	10362 7703	372	20	0	76.59
92	A0A3B6JD70	2	Lipoxigenase	A0A3B6JD70_WH EAT	Lipoxigenase		829	20	0	90.14
8	A0A3B6LRK8	2	Lipoxigenase	A0A3B6LRK8_WH EAT	Lipoxigenase		864	20	0	90.19

176	A0A3B5ZJN3	2	Mannan endo-1,4-beta-manosidase	A0A3B5ZJN3_WH EAT	1074	20	0	85.67	Mannan endo-1,4-beta-manosidase
1031	A0A3B6B913	2	Proteína contendo domínio NB-ARC	A0A3B6B913_WH EAT	1300	20	0	66.74	Proteína contendo domínio NB-ARC
375	A0A3B5ZXE5	3	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B5ZXE5_WH EAT	436	20	0	81.39	Proteína contendo domínio da peptidase A1
597	A0A3B6T8A9	3	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B6T8A9_WH EAT	509	20	0	65.45	Proteína contendo domínio da peptidase A1
982	A0A3B6C0C3	2	Peroxidase	A0A3B6C0C3_WH EAT	330	20	0	79.06	Peroxidase
15	W5D322	3	Fosfoglicerato mutase (2,3-difosfoglicerato independente) GN = TRAES_3BF013300030CF D_c1	W5D322_WHEAT	557	20	0	94.69	TRAE S_3BF 01330 0030C FD_c1
35	W5D4Q6	2	Fosfolipase D GN = TRAES_3BF048200040CF D_c1	W5D4Q6_WHEAT	812	20	0	94.42	TRAE S_3BF 04820 0040C FD_c1
251	P58311	3	Clorofila a apoproteína A1 GN do fotossistema I P700 = psaA	A0A2I4R1R9_WH EAT	750	20	0	99.63	psaA
592	A0A3B6IWB7	2	Proteína contendo domínio de fitocianina	A0A3B6IWB7_WH EAT	210	20	5,04E-146	80.15	Proteína contendo domínio de fitocianina
704	A0A3B6THF8	3	Plastocianina	A0A3B6THF8_WH EAT	154	16	7,91E-103	81.82	Plastocianina
166	A0A3B5Y6G2	2	Proibitina	A0A3B5Y6G2_WH EAT	288	20	0	92.5	Proibitina
799	A0A1D6CXF2	2	Tipo alfa da subunidade proteassoma	A0A1D6CXF2_WH EAT	249	20	0	97.05	Tipo alfa da subunidade proteassoma
425	A0A3B6FQJ9	3	Proteína contendo domínio de proteína quinase	A0A3B6FQJ9_WH EAT	676	20	0	82.88	Proteína contendo domínio de proteína quinase
165	A0A3B6LFH5	2	Pirofosfato - frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase subunidade alfa GN = PFP-ALPHA	A0A3B6LFH5_WH EAT	664	20	0	92.89	PFP- ALPH A

56	A0A3B6CIR4	3	Piruvato quinase	A0A3B6CIR4_WH EAT	Piruvato quinase	514	20	0	94.51
0	P11383	3	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande GN = rbcL	A0A2I4R1S4_WHEAT	Ribulose bifosfato carboxilase de cadeia grande	rbcL	477	20	99.18
288	A0A3B6IPZ0	2	Proteína contendo domínio SERPIN	A0A3B6IPZ0_WH EAT	Proteína contendo domínio SERPIN		399	20	88.03
148	A0A3B6H1E6	2	Proteína não caracterizada	Q5CAL1_WHEAT	Glucano putativo endo-1,3-beta-D-glucosidase (Fragmento)	wgluc5	310	20	92.43
195	A0A3B6HMZ7	2	Proteína não caracterizada	D2KZ10_WHEAT	Alanina-glioxilato aminotransferase	TaSA G4	479	20	89.8
266	A0A3B6EM13	3	Proteína não caracterizada	B6SMQ5_MAIZE	Triose fosfato isomerase 5	10028 0823	256	20	90.93
590	A0A1D5V0W9	2	Proteína não caracterizada	A0A1D5V0W9_W HEAT	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMP LR22 A2D_	367	20	78.2
786	A0A3B6PI06	3	Proteína não caracterizada	B6TNF1_MAIZE	Calnexin	LOCU S1601 10028 3947	533	20	89.67
703	A0A3B6LMJ2	2	Proteína não caracterizada	Q84VG2_ORYSJ	Proteína Os09g0425900	Os09g 04259 00	270	20	79.77
105	A0A3B6NPM1	2	Proteína não caracterizada	C74A4_ORYSJ	Aleno óxido sintase 4	CYP74 A4	529	20	76.63
275	A0A1D5SB94	2	Proteína não caracterizada	Q75I1_ORYSJ	Os05g0516600 proteína	Os05g 05166 00	206	20	1,17E-148
436	A0A3B6LS14	2	Proteína não caracterizada	Q0IZS5_ORYSJ	Proteína Os09g0552600	Os09g 05526 00	358	20	67.97
455	A0A3B5XZ66	2	Proteína não caracterizada	Q8RW01_WHEAT	Glutationa transferase	gstu2	233	20	1,15E-163
641	A0A3B6HXP8	3	Proteína não caracterizada	A0A0P0W1B6_ORYSJ	Proteína Os03g0661600 (Fragmento)	Os03g 06616 00	229	20	1,63E-163
832	A0A3B6ET26	2	Proteína não caracterizada	A0A3B6H433_WH EAT	Proteína contendo domínio de epimerase		397	20	87.04

965	A0A3B6RQH9	2	Proteína não caracterizada	A0A7H4LPC5_WH EAT	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMP LR22 A2D_ LOCU S5096	217	20	3,35E- 155	64.66
293	A0A3B6JDF8	2	Proteína não caracterizada	A0A0P0W1B6_OR YSJ	Proteína Os03g0661600 (Fragmento)	Os03g 06616 00	233	20	1,40E- 166	86.2
368	A0A3B6LFV2	2	Proteína não caracterizada	C7JA73_ORYSJ	Os12g0569100 proteína	Os12g 05691 00	164	20	2,38E- 116	77.66
438	A0A3B5ZRA1	2	Proteína não caracterizada	GRDH_ORYSJ	Homólogo de glicose e ribitol desidrogenase	Os05g 01408 00	347	20	0	84.16
798	A0A3B6B6I4	2	WD_REPEATS_REGION proteína contendo domínio	A0A3B6B6I4_WH EAT	WD_REPEATS_REGION N proteína contendo domínio	00	317	20	0	87.21

FONTE: O autor (2021) - dados obtido por análise proteômica a partir da busca no banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), expressos no diagrama de venn pelo software patternlab v e anotadas pelo software blast2go usando o banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, SUB japonicus, 3994), arábidoide (*Arabidopsis thaliana*, 3702) e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

TABELA SUPLEMENTAR 7 - LISTA DE PROTEÍNAS DE BACTÉRIA *H. seropedicae* SmR1 IDENTIFICADAS COMO EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SNI NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI E CNXSNI.

Índice Proteína	Locus	Nº réplicas	Descrição (origem)	Gene
611	D8ITA2	2	2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato N-succiniltransferase	dapD
327	D8IR41	3	Proteína ribossômica S1 30S	rpsA
610	D8IU15	2	Proteína ribossomal S2 30S	rpsB
531	D8IUS7	2	Proteína ribossômica 30S S3	rpsC
752	D8IUT8	2	Proteína ribossomal S5 30S	rpsE
449	D8IRY4	2	Proteína ribossômica 30S S9	rpsI
115	D8IVY3	3	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase	fadB
528	D8J1X4	2	4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintase	dapA
300	D8ITY7	3	Proteína ribossômica 50S L1	rplA
753	D8ITY8	2	Proteína ribossômica 50S L10	rplJ
741	D8IRY5	2	Proteína ribossomal L13 50S	rplM
380	D8IUT1	3	Proteína ribossomal L14 50S	rplN
1004	D8IUU0	2	Proteína ribossômica 50S L15	rplO
743	D8IUS8	2	Proteína ribossomal L16 50S	rplP
598	D8IPX8	3	Proteína ribossômica 50S L19	rplS
439	D8IUS4	3	Proteína ribossomal L2 50S	rplB
1017	D8IW91	2	Proteína ribossomal L21 50S	rplU
523	D8IUT2	2	Proteína ribossomal L24 50S	rplX
736	D8IW92	2	Proteína ribossomal L27 50S	rpmA
760	D8J1S9	2	Proteína ribossomal L28 50S	rpmB
384	D8ITZ9	3	Proteína ribossomal L3 50S	rplC
615	D8IU00	2	Proteína ribossomal L4 50S	rplD
386	D8IUT3	2	Proteína ribossomal L5 50S	rplE
530	D8IUT6	2	Proteína ribossomal L6 50S	rplF
383	D8IT18	3	Proteína ribossomal L9 50S	rplI
9	D8J0V8	3	60 kDa chaperonina	groL
159	D8IZ51	3	Sistema de transporte de aminoácidos do tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_4794
517	D8IZT0	3	Sistema de transporte de aminoácidos do tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_2931
337	D8IT97	2	Sistema de transporte de aminoácidos / transdução de sinal do tipo ABC, componente periplasmático / proteína de domínio	Hsero_2157
75	D8IPP8	3	Sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada do tipo ABC, proteína componente periplasmática	livK
237	D8IQR4	3	Sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada do tipo ABC, proteína componente periplasmática	livK
204	D8IRH3	3	Sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada do tipo ABC, proteína componente periplasmática	livK

182	D8IUY1	3	Sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada do tipo ABC, proteína componente periplasmática	livK
717	D8IXM9	2	Sistema de transporte de aminoácidos de cadeia ramificada do tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_2635
332	D8IRM9	3	Sistema de transporte de dipeptídeo tipo ABC, proteína periplasmática	ddpA
963	D8J1M6	3	Transportador de dipeptídeo tipo ABC, proteína de ligação a peptídeo periplasmática	Hsero_1130
87	D8IWS3	3	Sistema de transporte de D-xilose tipo ABC, proteína componente periplasmática	xylF
726	D8IRY9	3	Sistema de transporte de glutamato / aspartato do tipo ABC, proteína componente ATPase	gltL
70	D8IRZ2	3	Sistema de transporte de glutamato / aspartato do tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_3857
719	D8IRZ1	2	Sistema de transporte de glutamato / aspartato do tipo ABC, proteína componente de permease	gltJ
443	A7L4W6	3	Sistema de transporte de molibdato tipo ABC, proteína componente periplasmática	modA1
721	D8IUJ8	3	Sistema de transporte de nitrato / sulfonato / bicarbonato do tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_4261
298	D8J1H6	3	Sistema de transporte de espermidina / putrescina tipo ABC, proteína periplasmática de proteína	potD
605	D8IVI6	3	Sistema de transporte de açúcar do tipo ABC, proteína componente ATPase	Hsero_2426
188	D8IVI4	3	Sistema de transporte de açúcar tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_2424
970	D8IWX9	2	Sistema de transporte de açúcar tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_4550
750	D8IZC6	2	Sistema de transporte de açúcar tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_0727
516	D8J0T4	3	Sistema de transporte de açúcar tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_0972
331	D8J0Z9	3	Sistema de transporte de açúcar tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_1037
440	D8J113	3	Sistema de transporte de açúcar tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_1051
135	D8IUK4	3	Sistema de transporte tipo ABC, componente periplasmático / lipoproteína de superfície	Hsero_4267
385	D8ITK9	3	Sistema de transporte não caracterizado do tipo ABC, proteína componente periplasmática	Hsero_4169
43	D8IY57	3	Sistema de transporte de ureia tipo ABC, proteína componente periplasmática	urtA
335	D8J0D0	3	Proteína acetoacetil-CoA redutase	phbB
738	D8IQY7	2	Acetolactato sintase	ilvI
157	D8IVI8	3	Proteína acetolactato sintase	iolD
185	D8IV46	3	Proteína acetil-CoA acetiltransferase (tiolase acetoacetil-CoA)	phbA2
328	D8IVY4	3	Proteína Acetil-CoA aciltransferase	phbA
746	D8IQ13	2	Sintetase de acetil-coenzima A	acs
960	D8IUN8	3	Acetilglutamato quinase	argB
379	D8J225	3	Acetilornitina aminotransferase	argM

616	D8IPF0	2	Componente acetiltransferase do complexo piruvato desidrogenase	aceF
32	D8IZX7	3	Aconitate hidratase	acnA
708	D8IXY2	2	Acil CoA: acetato / 3-cetoácido CoA transferase, proteína de subunidade alfa	atoD
966	D8ITS8	3	Proteína transferase de acil-CoA	Hsero_0039
959	D8IUJ1	3	Adenina desaminase	add
477	D8IUM6	3	Adenosil-homocisteinase	ahcY
594	D8J1R7	3	Adenilato quinase	adk
589	D8IZ85	2	Adenilossuccinato liase	purB
23	D8J0S6	3	Proteína álcool desidrogenase	adhA
155	D8IUP7	3	Alquil hidroperóxido redutase C	ahpC
515	D8IUV1	3	Alquil hidroperóxido redutase C	Hsero_0144
603	D8J170	3	Aminotransferase	tyrB
378	D8ITX4	3	Transportador de amônio	amtB
593	D8IPN4	3	Proteína de arginina / lisina / ornitina descarboxilase	adiA
329	D8J1Z4	3	Aspartato-semialdeído desidrogenase	asd
520	D8IVM3	3	Cadeia gama de ATP sintase	atpG
78	D8IVM4	3	ATP sintase subunidade alfa	atpA
48	D8IVM2	3	ATP sintase subunidade beta	atpD
950	D8IT23	3	ATPase, proteína induzida pela privação de fosfato, proteína	phoH
447	D8ITP1	3	Grampo deslizante beta	dnaN
333	D8INU2	3	Proteína beta-hidroxibutirato desidrogenase	Hsero_1246
971	D8IXA6	3	Proteína carboximetilenobutenolidase (Dienelactona hidrolase)	Hsero_0456
450	D8IUX2	2	Proteína transmembrana de protease de processamento do terminal carboxi	prc
296	D8INT8	3	Catalase-peroxidase	katG
618	D8J1B4	2	Subunidade de oxidase de citocromo c tipo Cbb3	fixP
758	D8J201	2	Domínio CBS contendo proteína	Hsero_3303
80	D8IT51	3	Proteína chaperona ClpB	clpB
389	D8IYH4	3	Proteína Chaperona DnaK	dnaK
720	D8ISB7	2	Proteína de transdução de sinal de quimiotaxia	Hsero_1957
990	D8IZX9	2	Proteína de quimiotaxia CheW, regulador positivo da atividade da proteína CheA	cheW
179	D8IZW8	3	Citrato sintase	gltA
759	D8IZE6	2	Proteína chaperona do tipo ClpA / B	clpB
956	D8J0G0	3	Proteína reguladora de transcrição semelhante a choque frio	cspD
599	D8ISV2	3	Citocromo b	petB
602	D8J0I9	3	Citocromo bd-tipo quinol oxidase, subunidade 1, proteína	cydA
734	D8ISV1	2	Citocromo c1	petC
613	D8IPE3	2	D-aminoácido desidrogenase, subunidade pequena, proteína	dadA
601	D8ITN8	3	Proteína da família de aminotransferase DegT / DnrJ / EryC1 / StrS	Hsero_4199
718	D8IUV8	3	Ácido delta-aminolevulínico desidratase	hemB
620	D8IPF1	2	Diidrolipoil desidrogenase	lpdA
156	D8IZW5	3	Diidrolipoil desidrogenase	lpdA

206	D8IZW6	3	Diidrolipoilisina-resíduo succiniltransferase componente do complexo 2-oxoglutarato desidrogenase	sucB
336	D8IUU7	3	Subunidade alfa de RNA polimerase dirigida por DNA	rpoA
513	D8ITZ0	3	Subunidade beta de RNA polimerase dirigida por DNA	rpoB
382	D8ITZ1	3	Subunidade beta 'da RNA polimerase dirigida por DNA	rpoC
952	D8IYZ5	3	Flavoproteína de transferência de elétrons, subunidade alfa, proteína	fixB
640	D8ITZ6	3	Fator de alongamento G	fusA
297	D8IUR9	3	Fator de alongamento G	fusA
723	D8IU16	2	Fator de alongamento Ts	tsf
118	D8ITY3	3	Fator de alongamento Tu	tufB
241	D8IYT0	3	Enolase	eno
514	D8IVG6	3	Enoil- [acil-proteína transportadora] redutase	
123	D8IT11	3	Flagelina	fliC
951	D8IZ71	3	Frutose-1,6-bisfosfato aldolase	fbaA
525	D8IQ11	2	Fumarato hidratase classe I	fumA
529	D8IS53	2	Glutamato sintase (subunidade grande) proteína oxidorreductase	gltB
955	D8IRX9	3	Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase	hemL
137	D8J142	3	Glutamina Sintetase	glnA
977	D8ITX6	3	Glutaciona sintetase	gshB
444	D8IPB3	3	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	gapA
1001	D8IP73	2	Proteína de utilização de glicolato / propanodiol	glcG
442	D8IY16	3	Proteína hemolisina	Hsero_4672
747	D8J0M4	2	Histidina quinase	cheA
614	D8IW54	2	Proteína de ligação ao DNA da família das histonas HU	Hsero_0326
617	D8IU42	2	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase	guaB
725	D8J0K2	3	Protease intracelular / proteína amidase	Hsero_3070
1024	D8IZK0	2	Proteína de processamento de cofator ferro-molibdênio	nifX
180	D8IT55	3	Isocitrase	aceA
178	D8IWJ4	3	Isocitrato desidrogenase	
235	D8ISI8	3	L-asparaginase / proteína D da subunidade D da subunidade da archaeal Glu-tRNAGln amidotransferase	ansB
511	D8IS15	3	Lípido A desacilase	Hsero_3880
729	D8IXD3	3	L-isoaspartil proteína carboxil metiltransferase	pcm
962	D8IXI8	3	Proteína L-lactato desidrogenase	lldD
961	D8IXH5	3	Protease Lon	lon
124	D8IZX4	3	Malato desidrogenase	mdh
264	D8J0G1	3	Malato sintase	aceB
184	D8ITX2	3	Proteína de membrana	Hsero_0083
769	D8J163	3	Proteína transmembrana do transdutor de quimiotaxia que aceita metila	Hsero_3148
1018	D8IXZ2	2	Proteína Metilmalonato-Semialdeído Desidrogenase	Hsero_4648
526	D8IZ55	2	Proteína Metilmalonato-Semialdeído Desidrogenase	Hsero_4798
295	D8IVF2	3	Chaperona molecular, pequena proteína de choque térmico	Hsero_2392
712	D8IZM6	3	Proteína de transporte de molibdênio	modE1
236	D8IV11	3	Proteína mio-inositol 2-desidrogenase	Hsero_2421
612	D8IVJ0	2	Proteína de catabolismo de mio-inositol	iolB
187	D8ITN7	3	Proteína epimerase / desidratase dependente de NAD	Hsero_4198

71	D8IS61	3	Proteína acetaldeído desidrogenase dependente de NAD +	exaC
724	D8IPD6	3	Proteína aldeído desidrogenase dependente de NAD	Hsero_1440
262	D8J0N9	3	NADH: proteína da família da flavina oxidoreductase / NADH oxidase	Hsero_3111
445	D8IRG1	3	NADH-quinona oxidoreductase	nuoG
733	D8IRG0	2	NADH-quinona oxidoreductase subunidade F	nuoF
446	D8J1P1	3	Proteína oxidorreductase da enzima málica dependente de NADP	maeB
116	D8IPT1	3	NADPH: proteína quinona oxidoreductase	qor
596	D8IQC0	2	NADPH: proteína quinona oxidoreductase	qor
745	D8ITN2	2	Proteína NDP-N-acetil-D-manosaminuronato desidrogenase	wecC
819	D8IS60	2	Proteína P-II reguladora de nitrogênio	glnB
299	D8ITX3	3	Proteína semelhante a PII reguladora de nitrogênio	glnK
181	D8IZK5	3	Proteína de ferro nitrogenase	nifH
114	D8IZK3	3	Cadeia beta da proteína nitrogenase molibdênio-ferro	nifK
205	D8IZK4	3	Cadeia alfa da proteína nitrogenase	nifD
609	D8IZV4	3	Nucleosídeo difosfato quinase	ndk
976	D8IXZ1	2	Proteína ômega-aminoácido / piruvato aminotransferase	Hsero_4647
512	D8IVP7	3	Proteína da família OmpA	Hsero_4388
18	D8IUN2	3	Proteína de membrana externa (Porin)	Hsero_4295
136	D8J105	3	Proteína de membrana externa (Porin)	Hsero_1043
134	D8IU79	3	Proteína porina da membrana externa	ompC
978	D8IP40	2	Proteína de membrana externa (Porin) proteína de peptídeo sinal	ompC
141	D8IUZ2	3	Proteína de membrana externa (Porin) proteína de peptídeo sinal	Hsero_0185
177	D8IU23	3	Fator de montagem de proteína de membrana externa BamA	bamA
521	D8J0P0	3	Proteína V da membrana externa (proteína Scaffolding para holoenzima sintetizadora de mureína) proteína	Hsero_3112
518	D8IZ76	3	Proteína W da membrana externa	ompW2
138	D8J1A7	3	Proteína W da membrana externa	ompW1
60	D8IZW7	3	Oxoglutarato desidrogenase (transferência de succinil)	sucA
727	D8IQN5	3	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	fkpA
330	D8IVF9	3	Lipoproteína periplasmática ou secretada	Hsero_2399
607	D8J1U4	3	Lipoproteína periplasmática ou secretada	Hsero_1198
608	D8IS96	3	Serina endoprotease periplasmática semelhante a DegP	degQ
665	D8IU65	3	Permease da proteína da superfamília facilitadora principal	Hsero_2228
261	D8IQP1	3	Proteína da família da Fasina	Hsero_1639
338	D8IVG7	2	Proteína fosfato acetil / butiril transferase	Hsero_2407
1010	D8J0D1	2	Proteína de poli (3-hidroxiacanoato) sintetase	phbC
234	D8IRE4	3	Polirribonucleotídeo nucleotíldiltransferase	pnp
183	D8IUJ7	3	Proteína transmembrana de porina	Hsero_4260
377	D8J0N7	3	Provável citosol aminopeptidase	pepA
381	D8IYL4	3	Proteína RecA	recA
451	D8IPE9	2	Componente E1 de piruvato desidrogenase	aceE
606	D8IVK0	3	Proteína ser proteína quinase	Hsero_4340
972	D8IRI2	3	Proteína desidrogenase de cadeia curta	fabG

265	D8IR48	3	Proteína de peptídeo sinal	Hsero_3696
604	D8IZ82	3	Proteína de peptídeo sinal	Hsero_0683
1006	D8IZ83	2	Proteína de peptídeo sinal	Hsero_0684
1005	D8IS50	2	Proteína contendo domínio SPFH	Hsero_3921
186	D8IZX1	3	Subunidade de flavoproteína succinato desidrogenase	sdhA
263	D8IYL6	3	Succinato - CoA ligase	
334	D8IYL7	3	Succinato - CoA ligase	
441	D8J1R1	3	Superoxido dismutação	sodB
973	D8ITB6	2	Proteína transmembrana de lipoproteína de superfície (VacJ)	vacJ
76	D8IVI7	3	Proteína transferase quinase	iolC
448	D8J1X3	3	Lipoproteína transmembrana	Hsero_3275
713	D8IXH8	3	Fator de gatilho	tig
730	D8IUF6	3	UDP-galactose 4-epimerase	galT
294	D8IUF7	3	Proteína UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerase	wecB
742	D8IUH8	2	Proteína não caracterizada	Hsero_4241
714	D8IVF8	2	Proteína não caracterizada	Hsero_2398
522	D8IVG2	3	Proteína não caracterizada	Hsero_2402
749	D8IXR1	2	Proteína não caracterizada	Hsero_2667
722	D8IZK8	3	Proteína não caracterizada	Hsero_2856
964	D8J1F3	3	Proteína não caracterizada	Hsero_3241
600	D8IS17	3	Proteína universal do estresse	uspA
715	D8IVG0	3	Proteína universal do estresse	Hsero_2400
158	D8IWG7	3	Proteína universal do estresse	uspA

FONTE: O Autor (2021) - dados obtidos por análise proteômica a partir da busca no banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), expressos no diagrama de Venn pelo software patternlab v.

TABELA SUPLEMENTAR 8 - LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAÍZES DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO SN

Locus	Fold Change	Descrição (origem)	Nome da sequência Blast-p e anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
A0A3B5Y3I8	8.2	Sulfotransferase	A0A3B5Y3I8 WHEAT	Sulfotransferase		350	20	0	71.97
D8L9B3	4.6	Proteína dissulfeto-isomerase GN = pdil4-1	D8L9B3 WHEAT	Proteína dissulfeto- isomerase	pdil4-1	367	20	0	90.07
A0A3B6H3P5	3.8	Peroxidase	A0A3B6H3P5 WHEAT	Peroxidase		358	20	0	82.59
A0A3B6QE56	3.7	Proteína não caracterizada	Q8LL15 WHEAT	Glutathiona-S-transferase 28e45		230	20	2.08E- 165	87.01
W5DZS4	3.1	Proteína contendo domínio NAD (P) -bd dom	W5DZS4 WHEAT	UDP-glucuronato descarboxilase		348	20	0	96.26
W5FFT4	3.1	Proteína não caracterizada	B6SNQ7 MAIZE	Proteína ribossomal S16 40S	10019426 5	149	20	3.65E- 104	92.06
A0A3B6NR18	2.9	Fenilalanina amônia-liase	A0A3B6NR18 WHEAT	Fenilalanina amônia-liase		704	20	0	95.5
A0A3B6LFQ7	2.8	Glutathiona transferase	A0A3B6LFQ7 WHEAT	Glutathiona transferase		222	20	5.11E- 164	89.17
W5C851	2.7	Histona H4	W5C851 WHEAT	Histona H4	CAMPLR 22A2D_L OCUS195 6	103	20	2.31E- 67	94.87
A0A3B6GVH3	2.6	Peroxirredoxina dependente de glutaredoxina	A0A3B6GVH3 WHEAT	Peroxirredoxina dependente de glutaredoxina		162	20	7.13E- 117	90.21
W5FX66	2.4	Metilenotetrahidrofolato redutase	W5FX66 WHEAT	Metilenotetrahidrofolato redutase		594	20	0	93.49
A0A1D6BQY9	2.3	Cadeia beta da tubulina	A0A1D6BQY9 WHEAT	Cadeia beta da tubulina		446	20	0	97.94

Q517K4	2.2	Proteína ribossomal L17	Q517K4 WHEAT	Proteína ribossomal L17	140	20	2.07E-98	98.53
D8LAL9	2.2	Hidroquinona glucosiltransferase, putativa, expressa	D8LAL9 WHEAT	Hidroquinona glucosiltransferase, putativa, expressa	HGT_1 493	20	0	87.49
A0A3B6SPN2	2.2	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	Proteína da família da O-metiltransferase, expressa	LOC_Os11g20090 369	20	0	88.93
A0A3B6TT17	2.2	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	Proteína da família da O-metiltransferase, expressa	LOC_Os11g20090 369	20	0	89.1
A0A3B6PUV8	2.1	Proteína não caracterizada	B4ERX7 WHEAT	O-metiltransferase	1g20090 367	20	0	89.44
A0A3B6NXM6	2.1	Proteína não caracterizada	B4ERX7 WHEAT	O-metiltransferase	367	20	0	89.27
A0A3B6EN53	2.1	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B6EN53 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1	501	20	0	81.16
A0A3B6SJM6	2.0	Peroxidase	A0A3B6SJM6 WHEAT	Peroxidase	322	20	0	88.68
A0A1D5ZLT8	1.9	Proteína contendo domínio ADF-H	A0A1D5ZLT8 WHEAT	Proteína contendo domínio ADF-H	138	20	2.77E-101	85.13
A0A3B6FU02	1.9	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B6FU02 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1	416	20	0	81.43
A0A3B6JNU8	1.9	Proteína ribossômica 40S S3a	A0A3B6JNU8 WHEAT	Proteína ribossômica 40S S3a	263	20	0	95.27
A0A3B6RCI1	1.8	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	Proteína da família da O-metiltransferase, expressa	LOC_Os11g20090 369	20	0	87.12
W5C5U5	1.8	Proteína ribossomal S4 30S, cloroplástica	W5C5U5 WHEAT	Proteína ribossomal S4 30S, cloroplástica	195	20	9.47E-142	94.68
A0A3B5ZWC2	1.8	Proteína não caracterizada	B4FBC9 MAIZE	Patelina-1	100192106 610	20	0	83.68
A0A3B6PT40	1.7	Proteína não caracterizada	U3LW54 WHEAT	Protease de subtilisina associada à senescência	SSP1 780	20	0	82.23
W5AFW9	1.7	Proteína não caracterizada	B9FJ68 ORYSJ	Proteína Os05g0438800	Os05g0438800 376	20	0	98.42
A0A3B6RP55	1.6	Peroxidase	A0A3B6RP55 WHEAT	Peroxidase	347	20	0	84.04

A0A3B6LM09	1.5	Proteína contendo PKS_ER	A0A3B6LM09 WHEAT	Proteína contendo domínio PKS_ER	356	20	0	90.84
A0A3B6MSU8	1.5	Proteína contendo domínio PKS_ER	A0A3B6MSU8 WHEAT	Proteína contendo domínio PKS_ER	356	20	0	91.17
A0A3B6SHP8	1.4	Peroxidase	A0A3B6SHP8 WHEAT	Peroxidase	344	20	0	84.18
A0A0C4BIW4	1.3	Proteína não caracterizada	A0A0C4BIW4 WHEAT	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPLR 22A2D_L OCUS294 7	151	20	4.26E- 107

FONTE: O autor (2021). As identificações satisfizeram tanto a dobra automática quanto os critérios estatísticos, $p < 0,05$. Dados obtido da análise dos dados de espectrometria de massas a partir da busca no banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), analisados na aplicação T-Fold do software PatternLab V e anotadas pelo software Blast2Go usando o banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, sub japonicus, 3994), *Arabidopsis thaliana*, 3702 e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

TABELA SUPLEMENTAR 9 - LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAÍZES DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS SNXSNI E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO SNI.

Locus	Fold Change	Descrição (origem)	Nome da sequência	Organismo (após anotação)	Descrição (após anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
A0A3B6JN37	11.4	Proteína não caracterizada	TIWRJ1 WHEAT		Aleno óxido sintase (fragmento)	AOS	482	20	0	96.51
Q5TMB2	6.1	Inibidor de xilanase GN = Taxi-IV	Q5TMB2 WHEAT		Inibidor de xilanase TAXI-IV	Taxi-IV	408	20	0	87.6
A0A3B6SHQ4	4.2	Alanina - glicoxilato aminotransferase	A0A3B6SHQ4 WHEAT		Alanina - glicoxilato aminotransferase		401	16	0	87.35
A0A341ZKV6	4.0	Proteína contendo domínio Pept_C1	A0A341ZKV6 WHEAT		Proteína contendo domínio Pept_C1		199	20	1.33E-147	90.62
A0A3B5ZNE8	3.0	Proteína não caracterizada	A0A3L6DAW0 MAIZE		Glutelina tipo A 2	GLUA2	358	20	0	93.06
A0A3B5XTY5	2.8	Proteína não caracterizada	A0A3L6DAW0 MAIZE		Glutelina tipo A 2	GLUA2	358	20	0	93.15
Q9XPS4	2.8	Proteína GN do centro de reação CP43 do fotossistema II = psbC	PSBC WHEAT		Proteína do centro de reação do fotossistema II CP43	psbC	473	20	0	97.16
A0A3B6RIZ5	2.7	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	A0A3B6RIZ5 WHEAT		Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		260	20	0	93.26
A0A3B6TJG2	2.7	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	A0A3B6TJG2 WHEAT		Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		261	20	0	92.98
A0A1D5TTT2	2.6	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	A0A1D5TTT2 WHEAT		Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase		401	20	0	93.66
W5F8Z5	2.5	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	W5F8Z5 WHEAT		Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		263	20	0	93.18
A0A3B6H5R7	2.4	Proteína não caracterizada	D8L9Q2 WHEAT		Glucano endo-1,3-beta-glucosidase GII, putativo, expreso	TAA_ctg0 661b.0007 0.1	331	20	0	87.05
A0A3B6EBI2	2.3	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B6EBI2 WHEAT		Proteína contendo domínio da peptidase A1		349	20	0	70.98

A0A3B6GKE8	2.2	Proteína contendo domínio da peptidase A1	A0A3B6GKE8 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1	349	20	0	71.17
A0A3B6A203	2.2	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	A0A3B6A203 WHEAT	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	540	20	0	85.38
Q8L5C6	2.2	Proteína inibidora de xilanase 1 GN = XIPI	R9UNY9 WHEAT	Proteína inibidora de xilanase	304	20	0	84.75
A0A3B5Y7F7	2.2	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	A0A3B5Y7F7 WHEAT	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	510	20	0	80.6
A0A077S3V2	2.1	Aspartato aminotransferase GN = TRAES_3BF023000050CFD_c1	A0A077S3V2 WHEAT	Aspartato aminotransferase	454	20	0	93.59
A0A3B6GPC8	2.1	Proteína não caracterizada	A0A3B6FJ19 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1	357	20	0	71.93
A0A3B6MII9	2.0	Fosfopiruvato hidratase	A0A3B6MII9 WHEAT	Fosfopiruvato hidratase	446	20	0	98.45
A0A3B6CDE3	2.0	Metilmalonato-semialdeído desidrogenase (acilação CoA)	A0A3B6CDE3 WHEAT	Metilmalonato-semialdeído desidrogenase (acilação CoA)	534	20	0	92.89
A0A3B5ZPT1	1.9	Proteína contendo domínio aminotran_1_2	A0A3B5ZPT1 WHEAT	Proteína contendo domínio aminotran_1_2	402	20	0	93.35
A0A3B6FG58	1.9	Proteína não caracterizada	A0A3B6FJ19 WHEAT	Proteína contendo domínio da peptidase A1	355	20	0	69.9
Q93XQ7	1.9	Proteína dissulfeto-isomerase GN = PDI3	Q93XQ7 WHEAT	Proteína dissulfeto-isomerase	515	20	0	97.44
D8L9Q2	1.9	Glucano endo-1,3-beta-glucosidase GII, putativo, GN expresso = TAA_ctg0661b.00070.1	D8L9Q2 WHEAT	Glucano endo-1,3-beta-glucosidase GII, putativo, expresso	331	20	0	87.64
A0A3B6NQQ5	1.9	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	A0A3B6NQQ5 WHEAT	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	337	20	0	97.03
A0A3B6ELG3	1.9	Aspartato aminotransferase	A0A3B6ELG3 WHEAT	Aspartato aminotransferase	387	20	0	95.55
A0A3B5ZQU4	1.8	Proteína contendo domínio Lipase 3	A0A3B5ZQU4 WHEAT	Proteína contendo domínio Lipase 3	519	20	0	72.22

A0A3B5Z6I7	1.7	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	A0A3B5Z6I7 WHEAT	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	498	20	0	79.62
Q0WXXG7	1.7	Triticain beta	Q0WXXG7 WHEAT	Triticain beta	472	20	0	85.56
A0A3B6GQ57	1.6	Fosfolipase D	A0A3B6GQ57 WHEAT	Fosfolipase D	812	20	0	94.54
A0A3B6B5J2	1.6	Proteína não caracterizada	A0A6G7MCI4 WHEAT	Nucleoredoxina	524	20	0	82.83
A0A3B6EEL3	1.6	Fosfolipase D	A0A3B6EEL3 WHEAT	Fosfolipase D	812	20	0	94.5
A5HE90	1.5	Proteína de resposta hipersensível GN=hir1	A5HE90 WHEAT	Proteína de resposta hipersensível	284	20	0	95.93
A0A3B6SFH1	1.5	Peroxidase	A0A3B6SFH1 WHEAT	Peroxidase	355	20	0	82.19
Q41577	1.5	Peroxidase GN=pox1	Q41577 WHEAT	Peroxidase	316	20	0	86.94
C6ETA8	1.5	Peroxidase GN = Prx111-L	C6ETA8 WHEAT	Peroxidase	316	20	0	86.8
C6ES53	1.5	Peroxidase GN = Prx111-A	C6ES53 WHEAT	Peroxidase	316	20	0	87.24
A0A3B6RQL1	1.4	Fosfoglicerato quinase	A0A3B6RQL1 WHEAT	Fosfoglicerato quinase	425	20	0	93.54

FONTE: O autor (2021). As identificações satisfizeram tanto a dobra automática quanto os critérios estatísticos, $p < 0,05$. Dados obtido da análise dos dados de espectrometria de massas a partir da busca no banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), analisados na aplicação T-Fold do software PatternLab V e anotadas pelo software Blast2Go usando o banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, sub japonicus, 3994), *Arabidopsis thaliana*, 3702 e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

TABELA SUPLEMENTAR 10 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO CN NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSNI.

Índice Proteína	Locus	Nº réplicas	Descrição (origem)	Nome da sequência e anotação	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	<i>e-Value</i>	Similaridade média
40	A0A3B5XX22	3	Enzima málica	A0A3B5XX22	Enzima málica		570	20	0.0	94.62
50	A0A1D6B308	3	S-adenosilmetionina sintase	WHEAT A0A1D6B308	S-adenosilmetionina sintase		394	20	0.0	97.6
54	A0A3B6H2R9	3	Proteína contendo domínio PfkB	WHEAT A0A3B6H2R9	Proteína contendo domínio PfkB		323	20	0.0	92.21
74	Q8W0Q1	3	Aldeído desidrogenase putativo WIS1 GN = wis1	WHEAT Q8W0Q1	Aldeído desidrogenase putativo WIS1	wis1	551	20	0.0	92.93
88	A0A1D5UV66	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A1D5UV66	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPLR22 A2D_LOCUS410	578	20	0.0	94.31
98	A0A3B5ZMV6	2	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	WHEAT A0A3B5ZMV6	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN		362	20	0.0	93.58
109	Q1XH04	3	4-hidroxi-7-metoxi-3-oxo-3,4-di-hidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il glucosídeo beta-D-glucosidase 1c, GN cloroplástico = GLU1C	WHEAT HGL1C WHEAT	4-hidroxi-7-metoxi-3-oxo-3,4-di-hidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il glucosídeo beta-D-glucosidase 1c, cloroplástico	GLU1C	570	20	0.0	88.14
127	A0A3B6KN33	2	Proteína não caracterizada	A0A0N7KR63	Os09g0535000 proteína OS cloroplástico	P0569E11.2-1	301	20	0.0	91.98

193	A0A3B6EJU5	3	Glutathiona transferase	ORYSJ A0A3B6EJU5	Glutathiona transferase	212	20	1.88E-152	88.7
274	A0A3B6KPZ2	3	Proteína contendo o domínio DUF3700	WHEAT A0A3B6KPZ2	Proteína contendo o domínio DUF3700	251	20	0.0	87.6
305	A0A3B6B891	3	Peroxidase	WHEAT A0A3B6B891	Peroxidase	346	20	0.0	77.5
322	A0A3B6B996	3	Peroxidase	WHEAT A0A3B6B996	Peroxidase	352	20	0.0	73.92
344	A0A1D5UL37	2	Peroxidase	WHEAT A0A1D5UL37	Peroxidase	344	20	0.0	81.34
348	A0A3B6TMY1	2	Frutose-bisfosfato aldolase	WHEAT A0A3B6TMY1	Frutose-bisfosfato aldolase	360	20	0.0	90.16
356	A0A3B6IXG9	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A3L6EDY7	Glicoproteína-tronco	276	20	0.0	88.83
399	A0A3B6TDB6	3	Proteína não caracterizada	MAIZE Q2R6G9	Proteína da família O-metiltransferase, OS	368	20	0.0	87.46
424	A0A3B6QK15	2	Proteína não caracterizada	ORYSJ B6TBW2	Cadeia delta da sintase ATP	232	20	7.38E-165	84.37
431	W5ET99	2	Proteína não caracterizada	MAIZE B4FF26	Proteína associada à classificação de proteína vacuolar 26A	304	20	0.0	93.55
432	A0A3B6LPH1	2	Proteína contendo domínio DOMON	MAIZE A0A3B6LPH1	Proteína contendo domínio DOMON	264	20	0.0	78.37
474	A0A3B6B937	3	Peroxidase	WHEAT A0A3B6B937	Peroxidase	337	20	0.0	74.09

486	A0A0C4BK11	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A3L6DVA9	Proteína ribossômica 60S L35a-3	RPL35AC_1	112	20	2.73E-74	97.23
509	A0A3B6LM04	2	Trehalose 6-fosfato fosfatase	MAIZE A0A3B6LM04	Trehalose 6-fosfato fosfatase		871	20	0.0	85.98
532	A0A3B6NUS8	3	Proteína semelhante a germin	WHEAT A0A3B6NUS8	Proteína semelhante a germin		216	20	5.89E-152	91.34
540	A0A3B6CJD6	3	Peroxidase	WHEAT A0A3B6CJD6	Peroxidase		347	20	0.0	78.52
545	A0A3B6JDX6	3	Proteína semelhante a germin	WHEAT A0A3B6JDX6	Proteína semelhante a germin		224	20	1.65E-159	96.13
555	A0A1D5THS1	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A1D5THS1	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPLR22 A2D_LOCUS3258	119	20	9.83E-76	97.78
574	A0A3B6R9L3	2	Proteína contendo o domínio Peptidase_S9	WHEAT A0A3B6R9L3	Proteína contendo o domínio Peptidase_S9		354	20	0.0	81.9
583	A0A3B6JKE9	3	Proteína contendo domínio NTP_transferase	WHEAT A0A3B6JKE9	Proteína contendo domínio NTP_transferase		415	20	0.0	92.18
584	W5CT58	2	Proteína GN não caracterizada = TRAES_3BF046100030CFD	WHEAT B9EZQ3	OS semelhante à proteína de ligação de DNA =	Os01g0754100	139	20	7.47E-94	82.5
585	A0A3B6LLB3	2	Proteína contendo domínio TPT	WHEAT A0A3B6LLB3	Proteína contendo domínio TPT		401	20	0.0	85.57
625	A0A3B5ZNP1	3	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	WHEAT A0A3B5ZNP1	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN		362	20	0.0	93.87

628	P11534	3	Proteína ribossomal L2 50S, GN cloroplástico = rpL2-A	RK2	Proteína ribossômica L2 50S, cloroplástica	rpL2-A	273	20	0.0	92.63
666	A0A3B6H679	2	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilação	WHEAT A0A3B6H679	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilação		495	20	0.0	96.93
678	W5AP46	2	Proteína não caracterizada	WHEAT W5AP46	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPLR22 A2D_LOCU S2926	113	20	9.41E-70	89.86
706	A0A3B5Z338	2	Folato gama-glutamil hidrolase	WHEAT A0A3B5Z338	Folato gama-glutamil hidrolase		337	20	0.0	82.74
771	A0A3B6RG09	3	Proteína não caracterizada	WHEAT Q7XXQ8	Os06g0232000 proteína OS =	Os06g0232000	374	20	0.0	69.06
814	A0A3B6FVD4	2	Proteína contendo o domínio DEK_C	ORYSJ A0A3B6FVD4	Proteína contendo o domínio DEK_C		492	20	0.0	70.52
818	A0A3B6D567	3	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	WHEAT A0A3B6D567	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN		330	20	0.0	82.08
824	A0A3B6MZT6	2	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica	WHEAT A0A3B6MZT6	Proteína de ligação à clorofila a-b, cloroplástica		266	20	0.0	98.12
825	A0A3B5YWZ3	3	Proteína não caracterizada	WHEAT B4FID1	Proteína ribossômica 40S S17-1	100194345	143	20	2.28E-97	92.17
920	W5HY47	2	Proteína contendo domínio KOW	MAIZE W5HY47	Proteína contendo domínio KOW		191	20	2.88E-135	76.2
921	A0A1D5URZ0	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A1D5URZ0	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPLR22 A2D_LOCU S3419	170	20	7.31E-118	87.84
926	A0A3B6U2W8	2	Proteína dirigente	WHEAT A0A3B6U2W8	Proteína dirigente		316	20	0.0	77.58

66	Q6V959	2	Proteína ribossomal L3 GN = RPL3	Q6V959	Proteína ribossomal L3	RPL3	389	20	0.0	97.7
175	W5D739	2	Proteína GN contendo domínio KOW = TRAES_3BF073700020CFD_c1	WHEAT W5D739	Proteína contendo domínio KOW	TRAES_3B F073700020 CFD_c1	157	20	6.50E -106	95.73
402	A0A341Z8D2	2	4-hidroxi-4 metil-2-oxoglutarato aldolase	A0A341Z8D2	4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato aldolase		168	20	2.53E -116	93.61
493	A0A3B6A1A1	2	Proteína não caracterizada	WHEAT B4FSX7	(+) - neomentol desidrogenase	100281076	312	20	0.0	79.24
504	A0A3B6C1U7	2	Proteína não caracterizada	MAIZE Q0D4A3	Os07g0638100 proteína OS =	OJ1340_C08 .105	654	20	0.0	75.03
510	A0A3B6SHK0	2	Transaldolase	ORYSJ A0A3B6SHK0	Transaldolase		396	20	0.0	84.28
775	A0A3B6HPC0	2	Fosfomanomutase	WHEAT A0A3B6HPC0	Fosfomanomutase		189	20	4.39E -139	95.88
821	A0A3B6GP60	2	NAD (P) H desidrogenase (quinona)	WHEAT A0A3B6GP60	NAD (P) H desidrogenase (quinona)		205	20	3.28E -146	87.67
932	A0A3B6PPU9	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A7J2I4	Proteína intrínseca Tonoplast	AQP5	249	20	1.05E -169	95.2

FONTE: O autor (2021) - dados obtido por análise proteômica a partir da busca no banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), expressos no diagrama de venn pelo software patternlab v e anotadas pelo software blast2go usando o banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, SUB japonicus, 39947), arábido (*Arabidopsis thaliana*, 3702) e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

TABELA SUPLEMENTAR 11 - LISTA DE PROTEÍNAS DE TRIGO (*Triticum aestivum*) IDENTIFICADAS EXCLUSIVAMENTE PRESENTES EM AMOSTRAS DE TRIGO CV. CD 104 NO TRATAMENTO SNI NA COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSNI.

Índice Proteína	Locus	Nº réplicas	Descrição (origem)	Nome da sequência (após Blast-p e anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
694	A0A3B61UD0	2	Proteína contendo domínio AAI	A0A3B61UD0	Proteína contendo domínio AAI		141	20	4,28E-92	84.59
485	C7AE91	2	Proteína de cobre azul	WHEAT C7AE91	Proteína de cobre azul	BCP	176	20	4,25E-118	80.48
321	A0A3B6H1N8	2	GN = BCP	WHEAT A0A3B6H1N8	Carboxipeptidase		494	20	0	83.83
634	A0A3B6ERA2	3	Carboxipeptidase	WHEAT A0A3B6ERA2	Carboxipeptidase		498	20	0	83.52
213	A0A3B6RP58	3	Carboxipeptidase	WHEAT A0A3B6RP58	Quitinase		317	20	0	90.54
429	A0A3B6LJD4	2	Proteína contendo o domínio DUF3700	WHEAT A0A3B6LJD4	Proteína contendo o domínio DUF3700		236	20	7,51E-168	88.95
774	A0A3B6DB70	2	Proteína contendo domínio EF1_GNE	WHEAT A0A3B6DB70	Proteína contendo domínio EF1_GNE		218	20	1,24E-152	86.48
53	A0A3B6A203	3	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	WHEAT A0A3B6A203	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD		540	20	0	85.38

464	A0A3B5Y7F7	3	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	A0A3B5Y7F7	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	510	20	0	80.6
907	A0A3B6RHT3	2	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	WHEAT A0A3B6RHT3	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	435	20	0	73.19
310	A0A3B5YUD2	2	Glutathione transferase	WHEAT A0A3B5YUD2	Glutathione transferase	222	20	2,15E-157	85.55
366	A0A3B6KRW7	3	Proteína contendo domínio H15	WHEAT A0A3B6KRW7	Proteína contendo domínio H15	289	20	1,29E-165	86.78
623	A0A3B6KRY8	3	Proteína contendo domínio H15	WHEAT A0A3B6KRY8	Proteína contendo domínio H15	290	20	9,43E-169	83.07
566	A0A3B6FQC2	2	Proteína contendo o domínio LRRNT_2	WHEAT A0A3B6FQC2	Proteína contendo o domínio LRRNT_2	560	20	0	78.91
1031	A0A3B6B913	2	Proteína contendo domínio NB-ARC	WHEAT A0A3B6B913	Proteína contendo domínio NB-ARC	1300	20	0	66.74
597	A0A3B6T8A9	3	Proteína contendo domínio da peptidase A1	WHEAT A0A3B6T8A9	Proteína contendo domínio da peptidase A1	509	20	0	65.45
314	C5H4Q6	2	Peroxidase	WHEAT C5H4Q6	Peroxidase	329	20	0	95.34
225	A0A3B6R8P8	3	GN = Prx109-C	WHEAT A0A3B6R8P8	Peroxidase	362	20	0	85.1
655	A0A3B6ASF0	3	Peroxidase	WHEAT A0A3B6ASF0	Peroxidase	316	20	0	86.12
89	A0A3B6TDG8	2	Peroxidase	WHEAT A0A3B6TDG8	Peroxidase	348	20	0	82.66
				WHEAT					

902	A0A3B6NKK0	2	Peroxidase	A0A3B6NKK0	Peroxidase	329	20	0	80.5
982	A0A3B6C0C3	2	Peroxidase	WHEAT A0A3B6C0C3	Peroxidase	330	20	0	79.06
664	A0A077S6B3	3	Peroxidase	WHEAT A0A077S6B3	Proteína contendo domínio PfkB	323	20	0	92.3
856	A0A3B6GQ57	3	Fosfolipase D	WHEAT A0A3B6GQ57	Fosfolipase D	812	20	0	94.54
487	A0A3B6C3H9	2	Proteína contendo domínio de fitocianina	WHEAT A0A3B6C3H9	Proteína contendo domínio de fitocianina	188	20	1,21E-127	68.38
592	A0A3B6IWB7	2	Proteína contendo domínio de fitocianina	WHEAT A0A3B6IWB7	Proteína contendo domínio de fitocianina	210	20	5,04E-146	80.15
799	A0A1D6CXF2	2	Tipo alfa da subunidade proteassoma	WHEAT A0A1D6CXF2	Tipo alfa da subunidade proteassoma	249	20	0	97.05
425	A0A3B6FQI9	3	Proteína contendo domínio de proteína quinase	WHEAT A0A3B6FQI9	Proteína contendo domínio de proteína quinase	676	20	0	82.88
165	A0A3B6LFH5	2	Pirofosfato - frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase subunidade alfa	WHEAT A0A3B6LFH5	Pirofosfato - frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase subunidade alfa	664	20	0	92.89
195	A0A3B6HIMZ7	2	GN = PFP-ALPHA	WHEAT D2KZ10	Alanina-glioxilato aminotransferase	479	20	0	89.8
266	A0A3B6EM13	3	Uncharacterized protein	WHEAT B6SMQ5	Triose fosfato isomerase 5	256	20	0	90.93
550	A0A3B6NTD5	3	Proteína não caracterizada	MAIZE U3LW54	Protease de subtilisina associada à senescência	783	20	0	82.02

786	A0A3B6PI06	3	Proteína não caracterizada	WHEAT B6TNF1	Calhexin	10028394 7	533	20	0	89.67
807	A0A3B6DDR9	3	Proteína não caracterizada	MAIZE A0A7H4LHK2	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPL R22A2D _LOCUS _2700	367	20	0	84.43
275	A0A1D5SB94	2	Proteína não caracterizada	WHEAT Q75IJ1	Os05g0516600 proteína	Os05g05 16600	206	20	1,17E- 148	96.08
829	A0A3B6GN02	3	Proteína não caracterizada	ORYSJ D8LAL9	Hidroquinona glucosiltransferase, putativa, expressa	HGT_1	491	20	0	87.37
965	A0A3B6RQH9	2	Proteína não caracterizada	WHEAT A0A7H4LPC5	Montagem do genoma, cromossomo: II	CAMPL R22A2D _LOCUS _5096	217	20	3,35E- 155	64.66
438	A0A3B5ZRA1	2	Proteína não caracterizada	GRDH	Homólogo de glicose e ribitol desidrogenase	Os05g01 40800	347	20	0	84.16
798	A0A3B6B6I4	2	WD REPEATS REGION proteína contendo domínio	ORYSJ A0A3B6B6I4	WD REPEATS_REGION proteína contendo domínio		317	20	0	87.21
				WHEAT						

FONTE: O autor (2021) - dados obtido por análise proteômica a partir da busca no banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), expressos no diagrama de venn pelo software pattemlab v e anotadas pelo software blast2go usando o banco de dados do trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, sub japonicus, 39947), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, 3702) e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

TABELA SUPLEMENTAR 12 - LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAÍZES DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSNI E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO CN.

Locus	Fold Change	Descrição (origem)	Nome da sequência	Blast-p e anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
A0A3B6FKL0	8.5	PNP_UDP_1 proteína contendo domínio	A0A3B6FKL0 WHEAT	PNP_UDP_1 proteína contendo domínio	PNP_UDP_1 proteína contendo domínio		361	20	0	78.51
A0A3B6KDM2	4.4	Proteína não caracterizada	C7JA73 ORYSJ	Os12g0569100 proteína	Os12g0569100 proteína	Os12g0569100	164	20	1.36E-121	77.5
A0A3B6MMF1	3.9	Proteína não caracterizada	C7JA73 ORYSJ	Os12g0569100 proteína	Os12g0569100 proteína	Os12g0569100	164	20	1.52E-121	79.12
A0A3B6H1E6	3.0	Proteína não caracterizada	Q5CAL1 WHEAT	Glucano putativo endo-1,3-beta-D-glucosidase (Fragmento)	Glucano putativo endo-1,3-beta-D-glucosidase (Fragmento)	wgluc5	310	20	0	92.43
D8L9B3	2.9	Proteína dissulfeto-isomerase GN = pdil4-1	D8L9B3 WHEAT	Proteína dissulfeto-isomerase	Proteína dissulfeto-isomerase	pdil4-1	367	20	0	90.07
A7BJ77	2.7	Inibidor de xilanase GN = Xip-R1	A7BJ77 WHEAT	Inibidor de xilanase	Inibidor de xilanase	Xip-R1	297	20	0	77.18
W5FPA7	2.4	Proteína ribossomal S4 30S, cloroplástica	W5FPA7 WHEAT	Proteína ribossomal S4 30S, cloroplástica	Proteína ribossomal S4 30S, cloroplástica		195	20	8.47E-143	95.01
A0A3B6LRK8	2.4	Lipoxigenase	A0A3B6LRK8 WHEAT	Lipoxigenase	Lipoxigenase		864	20	0	90.19
W5C5U5	2.4	Proteína ribossomal S4 30S, cloroplástica	W5C5U5 WHEAT	Proteína ribossomal S4 30S, cloroplástica	Proteína ribossomal S4 30S, cloroplástica		195	20	9.47E-142	94.68
A0A3B5ZIL6	2.3	Sulfito redutase assimilatório (ferredoxina)	A0A3B5ZIL6 WHEAT	Sulfito redutase assimilatório (ferredoxina)	Sulfito redutase assimilatório (ferredoxina)		636	20	0	82.01
A0A3B5ZQU4	2.2	Proteína contendo domínio Lipase_3	A0A3B5ZQU4 WHEAT	Proteína contendo domínio Lipase_3	Proteína contendo domínio Lipase_3		519	20	0	72.22
A0A1D6BQY9	2.2	Cadeia beta da tubulina	A0A1D6BQY9 WHEAT	Cadeia beta da tubulina	Cadeia beta da tubulina		446	20	0	97.94

A0A3B6JDN5	2.1	Proteína não caracterizada	Y1103 ORYSJ	Proteína semelhante a flavonóide O-metiltransferase Os11g0303600	Os11g0303600	363	20	0	83.77
A0A3B5Z298	2.0	Fosfoglicerato quinase	A0A3B5Z298 WHEAT			568	20	0	94.45
A0A3B6LFQ7	2.0	Glutaciona transferase	A0A3B6LFQ7 WHEAT			222	20	5.11E-164	89.17
A0A3B6JNU8	2.0	Proteína ribossômica 40S S3a	A0A3B6JNU8 WHEAT			263	20	0	95.27
A0A3B6JGE7	1.9	Proteína não caracterizada	Y1103 ORYSJ	Proteína semelhante a flavonóide O-metiltransferase Os11g0303600	Os11g0303600	363	20	0	83.61
A0A3B6IMV7	1.9	Proteína não caracterizada	A0A3L6EM29 MAIZE	NADH desidrogenase		741	20	0	93.87
A0A3B6TTID0	1.9	Transcetolase	A0A3B6TTID0 WHEAT			745	20	0	92.19
D5MTE2	1.9	Glicosiltransferase GN = TaGTd	D5MTE2 WHEAT		TaGTd	456	20	0	82.13
A0A3B6CJE6	1.9	Peroxidase	A0A3B6CJE6 WHEAT			339	20	0	82.41
A0A3B6U9K3	1.9	Glicosiltransferase	A0A3B6U9K3 WHEAT			451	20	0	75.35
A0A3B6RCI1	1.9	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	Proteína da família da O-metiltransferase, expressa	LOC_Os11g20090	369	20	0	87.12
A0A3B6QE56	1.9	Proteína não caracterizada	Q8LL15 WHEAT	Glutaciona-S-transferase		230	20	2.08E-165	87.01
A0A0C4BJE5	1.8	Serina hidroximetiltransferase	A0A0C4BJE5 WHEAT			510	20	0	93.37
W5DZS4	1.8	Proteína contendo domínio NAD (P) -bd_dom	W5DZS4 WHEAT	UDP-glicuronato descarboxilase		348	20	0	96.26
W5G0E6	1.8	Tipo alfa da subunidade proteassoma	W5G0E6 WHEAT			249	20	0	97.95
A0A3B6KJA2	1.8	Formiltetrahydrofolato sintetase	A0A3B6KJA2 WHEAT	Formiltetrahydrofolato sintetase		710	20	0	95.62
A0A3B6DFG8	1.8	Proteína contendo domínio Aldo ket red	A0A3B6DFG8 WHEAT	Proteína contendo domínio Aldo ket red		326	20	0	87.82

A0A3B6LM09	1.8	Proteína contendo domínio PKS_ER	A0A3B6LM09 WHEAT	Proteína contendo domínio PKS_ER	356	20	0	90.84
A0A3B6MSU8	1.7	Proteína contendo domínio PKS_ER	A0A3B6MSU8 WHEAT	Proteína contendo domínio PKS_ER	356	20	0	91.17
A0A3B6KSW8	1.7	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	A0A3B6KSW8 WHEAT	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	444	20	0	90.39
A0A0C4BIT2	1.7	Proteína contendo domínio de epimerase	A0A0C4BIT2 WHEAT	Proteína contendo domínio de epimerase	378	20	0	89.95
A0A3B6C702	1.7	Peroxirredoxina dependente de tiorredoxina	A0A3B6C702 WHEAT	Peroxirredoxina dependente de tiorredoxina	262	20	0	93.31
W5AH12	1.7	Proteína não caracterizada	B6SH11 MAIZE	Actin-2 OS = Zea mays OX = 100280540	377	20	0	99.4
A0A3B6H6A6	1.7	Orotato fosforibosiltransferase	A0A3B6H6A6 WHEAT	Orotato fosforibosiltransferase	479	20	0	84.59
A0A3B6SRR2	1.6	Subunidade V-ATPase 69 kDa	A0A3B6SRR2 WHEAT	Subunidade V-ATPase 69 kDa	678	20	0	96.44
A0A3B6AQN0	1.6	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	A0A3B6AQN0 WHEAT	Proteína contendo domínio Oxidored_FMN	369	20	0	89.72
A0A3B6ASQ9	1.6	Isomerase xilose	A0A3B6ASQ9 WHEAT	Isomerase xilose	480	20	0	94.48
A0A3B6AYT7	1.6	Proteína ribossomal S8 40S	A0A3B6AYT7 WHEAT	Proteína ribossomal S8 40S	225	20	6.78E-166	91.4
A0A3B6PUV8	1.6	Proteína não caracterizada	B4ERX7 WHEAT	O-metiltransferase	367	20	0	89.44
A0A3B6NXM6	1.6	Proteína não caracterizada	B4ERX7 WHEAT	O-metiltransferase	367	20	0	89.27
A0A3B6HRG5	1.6	Proteína ribossômica 40S S3a	A0A3B6HRG5 WHEAT	Proteína ribossômica 40S S3a	263	20	0	94.95
A0A3B6TT17	1.6	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	Proteína da família da O-metiltransferase, expressa	369	20	0	89.1
A0A0C4BIW4	1.6	Proteína não caracterizada	A0A0C4BIW4 WHEAT	Montagem do genoma, cromossomo: II	151	20	4.26E-107	97.85
A0A3B6SPN2	1.5	Proteína não caracterizada	Q2R6G9 ORYSJ	Proteína da família da O-metiltransferase, expressa	369	20	0	88.93

W5GVR2	1.5	Proteína não caracterizada	A0A3B6QGW3 WHEAT	Proteína ribossomal L6 60S	219	20	5.31E- 160	92.91
W5ECL2	1.5	Proteína contendo domínio ribossomal_L2_C	W5ECL2 WHEAT	Proteína contendo domínio ribossomal_L2_C	261	20	0	96.63
A0A1D6AM47	1.5	Aquaporina GN = PIP1	A0A1D6AM47 WHEAT	Aquaporina	292	20	0	95.04
A0A1D5SLI4	1.5	Proteína ribossômica S4 40S	A0A1D5SLI4 WHEAT	Proteína ribossômica S4 40S	265	20	0	97.03
A0A3B5Y2X5	1.4	Proteína contendo domínio Glyco_hydro_18	A0A3B5Y2X5 WHEAT	Proteína contendo domínio Glyco_hydro_18	289	20	0	78.87
A0A0C4BIR6	1.3	Proteína contendo domínio ribossomal_L16	A0A0C4BIR6 WHEAT	Proteína contendo domínio ribossomal_L16	219	20	5.39E- 164	94.99

FONTE: O autor (2021). As identificações satisfizeram tanto a dobra automática quanto os critérios estatísticos, $p < 0,05$. Dados obtido da análise dos dados de espectrometria de massas a partir da busca no banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), analisados na aplicação T-Fold do software PatternLab V e anotadas pelo software Blast2Go usando o banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, sub japonicus, 3994), *Arabidopsis thaliana*, 3702 e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

TABELA SUPLEMENTAR 13 - LISTA DE PROTEÍNAS PRESENTES EM AMOSTRAS DE RAIZES DE TRIGO (*Triticum aestivum* VAR LINI) CV. CD 104 EM COMUM ENTRE OS TRATAMENTOS CNXSNI E COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NO TRATAMENTO SNI.


Locus	Fold Change	Descrição (origem)	Nome da sequência (após Blast-p e anotação)	Descrição (após Blast-p e anotação)	Gene	Comprimento	Nº de Hits	e-Value	Similaridade média
Q0WXG7	2.5	Triticain beta	Q0WXG7 WHEAT	Triticain beta		472	20	0	85.56
Q41577	2.5	Peroxidase GN = pox1	Q41577 WHEAT	Peroxidase	pox1	316	20	0	86.94
C6ES53	2.5	Peroxidase GN = Prx111-A	C6ES53 WHEAT	Peroxidase	Prx111-A	316	20	0	87.24
C6ETA8	2.2	Peroxidase GN = Prx111-L	C6ETA8 WHEAT	Peroxidase	Prx111-L	316	20	0	86.8
A0A077S3V2	2.0	Aspartato aminotransferase GN = TRAES_3BF02300050CFD_c1	A0A077S3V2 WHEAT	Aspartato aminotransferase	TRAES_3BF02300050CFD_c1	454	20	0	93.59
A0A3B6ELG3	1.9	Aspartato aminotransferase	A0A3B6ELG3 WHEAT	Aspartato aminotransferase	D_c1	387	20	0	95.55
A0A3B5Z6I7	1.9	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD	A0A3B5Z6I7 WHEAT	Proteína contendo domínio de tipo PCMH de ligação a FAD		498	20	0	79.62
A0A341ZKV6	1.9	Proteína contendo domínio Pept_C1	A0A341ZKV6 WHEAT	Proteína contendo domínio Pept_C1		199	20	1.33E-147	90.62
A0A3B6B5J2	1.9	Proteína não caracterizada	A0A6G7MCI4 WHEAT	Nucleoredoxina	NRX1-2AL	524	20	0	82.83
A0A3B6NQQ5	1.8	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	A0A3B6NQQ5 WHEAT	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase		337	20	0	97.03
Q8L5C6	1.7	Proteína inibidora de xilanase I GN = XIPI	R9UNY9 WHEAT	Proteína inibidora de xilanase	xip	304	20	0	84.75
A0A3B6JN37	1.7	Proteína não caracterizada	T1WRJ1 WHEAT	Aleno óxido sintase (fragmento)	AOS	482	20	0	96.51
A0A3B6SHP8	1.7	Peroxidase	A0A3B6SHP8	Peroxidase		344	20	0	84.18

A0A3B6QMZ5	1.6	Proteína contendo domínio CYTOSOL_AP	WHEAT	Proteína contendo domínio CYTOSOL_AP	633	20	0	89.87	
A0A3B5XVVF6	1.5	Proteína contendo domínio aminotran_1_2	WHEAT	Proteína contendo domínio aminotran_1_2	482	20	0	93.56	
C6ETA5	1.5	Peroxidase GN = Prx112-A	C6ETA5 WHEAT	Peroxidase	314	20	0	97.28	
A0A3B5XTY5	1.5	Proteína não caracterizada	A0A3L6DAW0 MAIZE	Glutelina tipo A 2	358	20	0	93.15	
A0A3B5ZNE8	1.5	Proteína não caracterizada	A0A3L6DAW0 MAIZE	Glutelina tipo A 2	358	20	0	93.06	
A0A3B6C061	1.4	Peroxidase	A0A3B6C061 WHEAT	Peroxidase	312	20	0	97.13	
A0A3B6CIR4	1.4	Piruvato quinase	A0A3B6CIR4 WHEAT	Piruvato quinase	514	20	0	94.51	

FONTE: O Autor (2021). As identificações satisfizeram tanto a dobra automática quanto os critérios estatísticos, $p < 0,05$. Dados obtido da análise dos dados de espectrometria de massas a partir da busca no banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565) e da bactéria *H. seropedicae* (*H. seropedicae* SmR1, 757424), analisados na aplicação T-Fold do software PatternLab V e anotadas pelo software Blast2Go usando o banco de dados do Trigo (*Triticum aestivum*, 4565), milho (*Zea mays*, 4577), arroz (*Oryza sativa*, sub japonicus, 3994), *Arabidopsis thaliana*, 3702 e da bactéria *H. seropedicae* (*Herbaspirillum seropedicae* SmR1, 757424).

ANEXOS

ANEXO 1 - ICC-POP.116 – DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL

 Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão	
	Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	
		Código: ICC-POP.116
		Revisão: 02
		Classificação SIGDA: 013.1

Elaborado:	Verificado:	Aprovado:	Data:
Kelly C. Machado	Michel Batista	Michel Batista	24/11/2017

SUMÁRIO

1. OBJETIVO
2. CAMPO DE APLICAÇÃO
3. RESPONSABILIDADES
4. DEFINIÇÕES
6. REFERÊNCIAS
8. SIGLAS
7. PROCEDIMENTOS
 - 7.1. Equipamentos
 - 7.2. Manipulação e corte do gel
 - 7.3. Descoloração do Gel
 - 7.4. Redução, Alquilação e Digestão Enzimática de Proteínas
 - 7.5. Extração dos Peptídeos
8. TREINAMENTO
9. ALTERAÇÕES EM RELAÇÃO A REVISÃO ANTERIOR
10. ANEXOS
11. REGISTRO DE TREINAMENTO

1. OBJETIVO

Descrever o preparo de amostras proteicas por meio de digestão em gel utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para análise por LC-MS/MS.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO


Aplica-se aos colaboradores da plataforma de espectrometria de massas RPT02H e aos usuários que necessitem preparar amostras proteicas por digestão em gel.

3. RESPONSABILIDADES

Os procedimentos descritos são executados pelos colaboradores e usuários da plataforma de espectrometria de massas e por usuários que necessitem preparar amostras proteicas por digestão em gel.

4. DEFINIÇÕES

SDS-PAGE: técnica utilizada em bioquímica que emprega a eletroforese para a separação de proteínas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), onde o detergente SDS é utilizado como agente desnaturante e fonte de carga negativa às proteínas.

 Ministério de Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão
Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	Código: ICC-POP.116 Revisão: 02 Classificação SIGDA: 013.1

5. REFERÊNCIAS

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2856-60.

6. SIGLAS

SDS: Dodecil sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)

PAGE: Eletroforese em gel de poli(acrilamida) (do inglês *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

7. PROCEDIMENTOS


As etapas descritas a seguir abrangem a manipulação, corte e descoloração do gel. Na sequência estão descritas as etapas de redução, alquilação e digestão enzimática das proteínas em gel, seguida da extração dos peptídeos do gel. O SDS-PAGE pode ser usado não só para reduzir a complexidade da amostra (fracionamento), mas também para remoção de contaminantes como detergentes, sais, DNA e outros compostos não-proteicos. O enovelamento de proteínas pode proteger a cadeia de aminoácidos da clivagem enzimática, por isso a desnaturação é necessária para que a clivagem seja eficiente. Em SDS-PAGE, a desnaturação de proteínas ocorre pelo uso do detergente SDS (possui carga negativa), que é removido antes da digestão em gel e, portanto, não afeta a atividade da enzima.

7.1 Equipamentos

- 7.1.1 Centrífuga;
- 7.1.2 Centrífuga com vácuo (*speed vac*);
- 7.1.3 Estufa;
- 7.1.4 Vortex;
- 7.1.5 Thermomixer;

7.2 Manipulação e corte do gel

- 7.2.1 Sempre usar luvas e nunca tocar no gel com as mãos;
- 7.2.2 Tomar cuidado para não contaminar o gel com queratina quando o gel é digitalizado. Proteger o gel com plástico antes de colocá-lo no scanner;


 Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão
Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	Código: ICC-POP.116
	Revisão: 02
	Classificação SIGDA: 013.1

- 7.2.3 Preferencialmente, executar o corte de um gel em uma capela de fluxo laminar ou de exaustão e usar bisturi para isto;
- 7.2.4 Colocar o gel em uma placa de vidro limpa (lavada com etran 5% e enxaguada com água desmineralizada ou ultrapura);
- 7.2.5 Cortar a(s) banda(s) de interesse com um bisturi novo. O bisturi deve ser enxaguado com água ultrapura entre o corte de uma banda e outra e pode ser reutilizado desde que não esteja oxidado;
- 7.2.6 Se for utilizar uma banda específica, corte-a orientando-se pelo marcador de peso molecular tomando cuidado para retirar a banda inteira. Para evitar que o gel se quebre, mantê-lo molhado com água desmineralizada ou ultrapura;
- 7.2.7 Se for utilizar a lane inteira, primeiramente fazer um corte horizontal na parte inferior do gel (perpendicular a(s) banda(s)), orientando-se pelo marcador para padronizar a altura do corte. Retirar também a parte superior do gel (stacking), desde que não esteja corado o que indica presença de proteína. Depois cortar o mais perto possível da borda da Lane, tomando o cuidado para não cortar partes que estejam coradas e também para não deixar muito gel nas laterais da lane. Para evitar que o gel se quebre, mantê-lo molhado com água desmineralizada ou ultrapura;
- 7.2.8 Cortar cada uma das bandas ou lanes em pedaços de cerca de 1 × 1 mm (não cortar pedaços muito pequenos para não entupir a ponta dos tips). Caso o stacking contenha proteína, cortá-lo em pedaços maiores, por exemplo 3 × 3 mm. Transferir os pedaços de gel para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL limpo (marca: Eppendorf).

NOTA 1: evitar que o volume de gel ultrapasse a metade do tubo. Se isso ocorrer utilizar dois tubos ou mais para cada amostra).

7.3 Descoloração do Gel

- 7.3.1 Gel corado com Coomassie: Adicionar Solução de Descoloração para Coomassie (Solução de bicarbonato de amônio 25 mmol L⁻¹ em etanol 50%) aos tubos de microcentrífuga em quantidade suficiente para cobrir o gel. Agitar no thermomixer por, no mínimo, 10 min a 25 °C (800 rpm) ou até que a solução fique saturada. Retirar o sobrenadante e descartar. Repetir esse procedimento mais vezes se o gel estiver muito corado. Caso o gel não

	Ministério de Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão	
Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL		Código: ICC-POP.116	
		Revisão: 02	
		Classificação SIGDA: 013.1	


esteja muito corado na segunda vez, adicionar o tampão de descoloração e deixar agitando no thermomixer (25 °C, 800 rpm) até que o gel descore totalmente. Normalmente é necessário deixar overnight. Quando estiver totalmente descorado retirar o sobrenadante e descartar.

- 7.3.2 Gel corado com prata: Adicionar Solução de Descoloração para prata (Solução de Tiosulfato de Sódio 100 mmol L⁻¹ e Ferricianeto de Potássio 30 mmol L⁻¹) na **proporção 1:1** aos tubos de microcentrifuga em quantidade suficiente para cobrir o gel. Agitar no thermomixer por, no mínimo, 10 min a 25 °C (800 rpm) ou até que a coloração da prata desapareça e seja observado uma coloração amarela homogênea dentro do tubo. Retirar o sobrenadante e descartar. Adicionar aos pedaços de gel solução ABC 50 mmol L⁻¹ e agitar no thermomixer por no mínimo 10 min a 25 °C (800 rpm). Em seguida descartar o sobrenadante. Repetir essa última etapa de lavagem do gel com ABC até que eles fiquem completamente transparentes.

7.4 Redução, Alquilação e Digestão Enzimática de Proteínas

NOTA 2: No anexo A constam volumes sugeridos para cada reagente de acordo com a quantidade de gel no tubo.

- 7.4.1 Desidratar o gel adicionando etanol absoluto (marca: Merck) em volume suficiente para cobrir bem os pedaços de gel. Agitar no thermomixer por 10 min a 25 °C (800 rpm). Caso parte do gel no fundo do tubo permaneça desidratado agitar em vortex por uns 10 segundos para homogeneizar e terminar de desidratar. Retirar o sobrenadante e descartar (OBS: Para isso utilizar uma micropipeta P1000 e ponteiros da marca: Eppendorf). Repetir o procedimento de desidratação 1 vez mais, totalizando 2 vezes ou até que os pedaços de gel fiquem endurecidos e brancos;
- 7.4.2 Secar em speed-vac por 7 min (vacuum pressure = 0,1). Após esse tempo verificar se os pedaços de gel estão bem secos e "soltos" dentro do tubo. Se ainda estiver um pouco úmido colocar novamente no speed-vac e secar por mais 3 a 5 min;
- 7.4.3 Adicionar tampão de redução (solução de DTT 10 mmol L⁻¹ em ABC 50 mmol L⁻¹) em quantidade suficiente para cobrir os pedaços de gel e incubar no


 <p>Ministério de Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas</p>	<h2>Procedimento Operacional Padrão</h2>
<h3>Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL</h3>	<p>Código: ICC-POP.116 Revisão: 02 Classificação SIGDA: 013.1</p>

thermomixer por 60 minutos a 56 °C (800 rpm). Retirar todo sobrenadante e descartar (Esta etapa irá promover a quebra das pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína);

- 7.4.4 Adicionar tampão de alquilação (solução de Iodoacetamida 55 mmol L⁻¹ em ABC 50 mmol L⁻¹) até cobrir os pedaços de gel e incubar no thermomixer por 45 min a 25 °C (800 rpm) protegido da luz. Retirar o líquido posteriormente e descartar.

NOTA 3: para manter os tubos protegidos da luz, tampar o thermomixer com tampa recoberta com papel alumínio;

- 7.4.5 Adicionar tampão de digestão (Solução aquosa de ABC 50 mmol L⁻¹) até cobrir os pedaços de gel e incubar no thermomixer por 20 min a 25 °C (800 rpm). Em seguida descartar o sobrenadante;
- 7.4.6 Desidratar os pedaços de gel adicionando etanol absoluto (marca: Merck) em volume suficiente para cobrir bem o gel. Agitar no thermomixer por 10 min a 25 °C (800 rpm). Caso parte do gel no fundo do tubo permaneça desidratado agitar em vortex por uns 10 segundos para homogeneizar e terminar de desidratar. Descartar o líquido em seguida;
- 7.4.7 Adicionar novamente o tampão de digestão até cobrir os pedaços de gel e incubar no thermomixer por 20 min a 25 °C (800 rpm). Em seguida descartar o sobrenadante;
- 7.4.8 Desidratar novamente os pedaços de gel adicionando etanol absoluto (marca: Merck) em volume suficiente para cobrir bem o gel. Agitar no thermomixer por 10 min a 25 °C (800 rpm) e caso necessário, em seguida, agitar em vortex por 10 segundos para homogeneizar e desidratar melhor. Descartar o líquido. Repetir o procedimento de desidratação 1 vez mais totalizando 2 vezes ou até que os pedaços de gel fiquem endurecidos e brancos;
- 7.4.9 Secar em speed-vac por 7 min (vacuum pressure = 0,1). Após esse tempo verificar se os pedaços de gel estão bem secos e "solto" dentro do tubo. Se ainda estiver um pouco úmido colocar novamente no speed-vac e secar por mais 3 a 5 min;

 <p>Ministério de Saúde FIDCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas</p>	Procedimento Operacional Padrão
Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	Código: ICC-POP.116
	Revisão: 02
	Classificação SIGDA: 013.1

7.4.10 Adicionar aos pedaços secos de gel solução de tripsina $12,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ diluída com solução ABC 50 mmol L^{-1} no momento do uso de acordo com o ICC-POP.115 Preparo de Soluções (Item 7.3.6) levando em consideração a sugestão a seguir: O tubo original de tripsina congelada (marca: Promega) vem na concentração de $400 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. A solução diluída ($12,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) deve cobrir os géis a fim de hidratá-los completamente mas não deve sobrar muito líquido. Portanto, o volume deve ser menor do que o utilizado nas etapas de redução, alquilação e desidratação.

Deixar os géis com tripsina na geladeira ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) por 20 minutos.

NOTA 4: A tripsina fica estocada no freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Quando retirar do freezer deixar a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até fazer a diluição. Se sobrar tripsina concentrada guardar novamente a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para utilizar mais uma vez. Evitar vários ciclos de congelamento/descongelamento. Anotar a quantidade de tripsina retirada do freezer $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ no ICC-RQ.093 – *Controle de Retirada de Tripsina (Freezer -80°C)*.


7.4.11 Remover o excesso de solução de tripsina (se houver) e descartar. Em seguida adicionar tampão de digestão em quantidade suficiente para cobrir os pedaços de gel de acordo com sugestão da tabela do ANEXO A. Incubar a amostra em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ entre 16 e 18 horas;

7.5 Extração dos Peptídeos

NOTA 5: No anexo A constam volumes sugeridos para cada reagente de acordo com a quantidade de gel no tubo.

7.5.1 Após 16-18 horas, retirar a(s) amostra(s) da estufa e **COLETAR** todo o líquido em tubo(s) limpo(s) de 2,0 mL (marca: Eppendorf);

7.5.2 Adicionar solução de extração (Água, TFA 3%, acetonitrila 30%) em quantidade suficiente para cobrir o gel, mas sem ultrapassar 400 μL . Agitar no thermomixer por 10 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (800 rpm). Em seguida coletar novamente o sobrenadante transferindo-o também para o tubo de 2,0 mL da etapa 7.5.1. Repetir essa etapa 1 vez mais totalizando 2 vezes;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão	
	Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	Código: ICC-POP.116 Revisão: 02 Classificação SIGDA: 013.1

- 7.5.3 Adicionar acetonitrila até cobrir os pedaços de gel. Agitar no thermomixer por 10 minutos a 25°C (800 rpm). Transferir o sobrenadante para o tubo de 2,0 mL (igual às etapas 7.5.1 e 7.5.2). Repetir essa etapa 1 vez mais totalizando 2 vezes. **Dar um spin antes da última coleta a fim de recuperar todo o líquido;**
- 7.5.4 Secar a amostra (sobrenadante) em speed-vac até 10 a 20% do volume original para remover acetonitrila. Por exemplo, para reduzir 1,0 mL a 100-200 µL, deixar secando por 1h30min (T = 45 °C, vacuum pressure = 0,1);
- 7.5.5 Fazer a purificação dos peptídeos usando StageTips-C18 (ver ICC-POP.119 -**Purificação de Peptídeos em StageTip**) ou retirar os tubos do speed-vac e armazená-los a -20 °C para purificação posterior;

8. TREINAMENTO


Colaboradores da plataforma RPT02H: novos colaboradores devem fazer a leitura do documento e receber treinamento prático para que possam executar adequadamente as atividades descritas neste procedimento. Para colaboradores que já passaram por treinamento a leitura do documento permite a execução adequada das atividades.

Usuários: Podem fazer a leitura do documento e realizar acompanhamento de um colaborador da plataforma para executar as atividades em conformidade com as orientações apresentadas

NOTA 6: Somente os colaboradores da plataforma RPT02H que manipulam/preparam amostras dos usuários devem assinar o registro de treinamento.

9. ALTERAÇÕES EM RELAÇÃO A REVISÃO ANTERIOR


Revisão	Data	Descrição da Alteração	Responsável
02	24/11/2017	- Reestruturação do POP de acordo modelo de documento do SGQ do Instituto Carlos Chagas. - Retirada do tópico de reagentes e soluções. - Correções gerais no texto	Kelly C. Machado

 Ministério de Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão
Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	Código: ICC-POP.116 Revisão: 02 Classificação SIGDA: 013.1

10. ANEXOS**ANEXO A – VOLUMES DE USO DOS REAGENTES DE ACORDO COM O VOLUME EQUIVALENTE A QUANTIDADE DE GEL NO TUBO**

REAGENTE	VOLUME EQUIVALENTE A QUANTIDADE DE GEL NO TUBO		
	50 – 100 µl	250 µl	500 µl
Etanol	100 – 150 µl	300 µl	500 µl
DTT	100 – 150 µl	300 µl	500 µl
IAA	100 – 150 µl	300 µl	500 µl
ABC (lavagens)	100 – 150 µl	300 µl	500 µl
Tripsina 12,5 ng µl ⁻¹	30 – 50 µl	150 µl	250 µl
ABC (pós-tripsina)	50 µl	150 µl	250 µl
SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO	100 µl	200 µl	300 µl
ACN	100 µl	200 µl	300 µl

Obs: para quantidades diferentes de gel, ajustar o volume dos reagentes.


 Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão
Título: DIGESTÃO DE PROTEÍNAS EM GEL	Código: ICC-POP.116 Revisão: 02 Classificação SIGDA: 013.1

11. REGISTRO DE TREINAMENTO

Eu li, entendi e estou ciente das condições estabelecidas neste Procedimento.

Nome	Assinatura	Data

ANEXO 2 - ICC-POP.119 – PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM STAGETIP

 Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão		
	Título: PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM STAGETIP		Código: ICC-POP.119 Revisão: 02 Classificação SIGDA: 013.1
Elaborado:	Verificado:	Aprovado:	Data:
Kelly C. Machado	Michel Batista	Michel Batista	24/11/2017

SUMÁRIO

1. OBJETIVO
2. CAMPO DE APLICAÇÃO
3. RESPONSABILIDADES
4. DEFINIÇÕES
5. REFERÊNCIAS
6. SIGLAS
7. PROCEDIMENTOS
 - 7.1. Equipamentos
 - 7.2. Fabricação de StageTip-C18
 - 7.3. Purificação dos peptídeos utilizando StageTip-C18
 - 7.4. Eluição dos peptídeos
8. TREINAMENTO
9. ALTERAÇÕES EM RELAÇÃO A REVISÃO ANTERIOR
10. ANEXOS
11. REGISTRO DE TREINAMENTO

1. OBJETIVO

Descrever as etapas para purificação dos peptídeos provenientes de digestão proteica em gel, membrana, solução ou FASP (Filter Aided Sample Preparation) utilizando StageTip (Stop And Go Extraction In Tip).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO


Aplica-se aos colaboradores da plataforma de espectrometria de massas RPT02H e aos usuários que necessitem fazer a purificação de peptídeos provenientes de digestão proteica.

3. RESPONSABILIDADES

Os procedimentos descritos são executados pelos colaboradores e usuários da plataforma de espectrometria de massas.

4. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

 Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão	
	Título: PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM STAGETIP	Código: ICC-POP.119 Revisão: 02 Classificação SIGDA: 013.1

5. REFERÊNCIAS

Rappsilber, J.; Ishihama, Y.; Mann, M. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 3, p. 663–670, 2003.

6. SIGLAS

StageTip: Stop And Go Extraction in Tip

FASP: Filter Aided Sample Preparation

ACN: acetonitrila

7. PROCEDIMENTOS

A purificação/dessalinização dos peptídeos pré LC-MS/MS é crucial, pois os sais remanescentes do preparo da amostra interferem na cromatografia e na espectrometria de massas prejudicando assim a análise.

7.1 Equipamentos

7.1.1 Centrífuga;

7.1.2 Speed vac.


7.2 Fabricação de StageTip-C18

7.2.1 Colocar um disco de membrana C18 (3M Empore™) sobre uma superfície plana e limpa, como uma placa de Petri de plástico ou vidro;

7.2.2 Perfurar a membrana C18 usando dispositivo apropriado retirando uma pequena porção. Transferir esta porção para um tip (2-200 µL). Repetir o procedimento colocando outra porção de membrana C18 sobre a anterior. Não pressionar demais a membrana dentro dos tips.

NOTA1: Opcionalmente, a membrana pode ser dobrada, sendo assim possível retirar duas porções perfurando uma única vez;

7.2.3 Os StageTips podem ser armazenados secos à temperatura ambiente;


 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas</p>	<h2>Procedimento Operacional Padrão</h2>
Título: PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM STAGETIP	Código: ICC-POP.119
	Revisão: 02
	Classificação SIGDA: 013.1

7.3 Purificação dos peptídeos utilizando StageTip-C18

- 7.3.1 Acoplar o StageTip ao adaptador (tubo de 1,5 mL com o fundo e a parte superior cortados) e ao tubo de lavagem (tubo de 2,0 mL sem tampa);
- 7.3.2 Adicionar 100 µL de metanol (grau LC-MS) ao StageTip para condicioná-lo. Centrifugar a 1.000 x g por 2 min. Descartar o metanol em descarte apropriado;
- 7.3.3 Equilibrar o StageTip duas vezes com 100 µL de solução A (água; ácido fórmico 0,1%), centrifugando a 1.000 x g por 4 min em cada vez;
- 7.3.4 Numerar os Stages Tips de acordo com a numeração da amostra na **ICC-RQ.092 Planilha de Preparo de Amostras**
- 7.3.5 Colocar a amostra no StageTip, não mais que 200 µL e centrifugar a 1.000 x g pelo tempo necessário para que todo o volume passe pelo tip (aproximadamente 5 min). Caso o volume de amostra seja maior que 200 µL, passar a amostra em mais de uma etapa de centrifugação;
- 7.3.6 Lavar o StageTip duas vezes com 200 µL de solução A centrifugando a 1.000 x g por 6 min cada vez;
- 7.3.7 Não descartar os adaptadores e os tubos de lavagem, pois podem ser reutilizados após limpeza. Os tubos devem ser lavados com etanol 5% e enxaguados com água desmineralizada;
- 7.3.8 Os StageTips contendo os peptídeos podem ser armazenados a 4 °C (em caixa de tips devidamente identificadas) até o momento da eluição. A eluição só deve ser feita no momento da análise no espectrômetro de massas;

7.4 Eluição dos peptídeos

- 7.4.1 Acoplar o StageTip ao adaptador e ao tubo de lavagem;
- 7.4.2 Lavar o StageTip duas vezes com 200 µL de solução A centrifugando a 1.000 x g por 6 min. Caso tenha ficado algum resíduo de solução A no tip após a 2ª lavagem, centrifugar por 2 min adicionais. O tubo de lavagem não precisa ser lavado e pode ser reutilizado;
- 7.4.3 Acoplar o adaptador com o StageTip em um tubo (eppendorf) limpo de 1,5 mL. Eluir os peptídeos, passando 20 µL duas vezes (40 µL final) de solução E (ácido fórmico 0,1%, ACN 40%) armazenada na geladeira. Centrifugar a 1.000 x g por 1 min para cada 20 µL;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão	
	Título: PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM STAGETIP	Código: ICC-POP.119 Revisão: 02 Classificação SIGDA: 013.1

7.4.4 Secar a amostra eluída em speed vac por 30 min sem aquecimento, (vacuum pressure = 0,1) para remover ACN.

7.4.5 Diluir a amostra em solução AD (ácido fórmico 0,1%, DMSO 5%, ACN 5%) de acordo com a massa total que se deseja injetar no espectrômetro de massas;

7.4.6 Analisar por LC-MS/MS.

8. TREINAMENTO

- Colaboradores da plataforma RPT02H: novos colaboradores devem fazer a leitura do documento e receber treinamento prático para que possam executar adequadamente as atividades descritas neste procedimento. Para colaboradores que já passaram por treinamento a leitura do documento permite a execução adequada das atividades.

- Usuários: Podem fazer a leitura do documento e acompanhar um colaborador da plataforma para executar as atividades em conformidade com as orientações apresentadas.


NOTA 2: Somente os colaboradores da plataforma RPT02H que manipulam/preparam amostras dos usuários devem assinar o registro de treinamento.

9. ALTERAÇÕES EM RELAÇÃO A REVISÃO ANTERIOR

Revisão	Data	Descrição da Alteração	Responsável
02	24/11/2017	- Reestruturação do POP de acordo modelo de documento do SGQ do Instituto Carlos Chagas. - Retirada do tópico de reagentes e soluções. - Correções gerais no texto	Kelly C. Machado

10. ANEXOS

Não se aplica.

 Ministério da Saúde FIOCRUZ - PARANÁ Instituto Carlos Chagas	Procedimento Operacional Padrão	
	Título: PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS EM STAGETIP	Código: ICC-POP.119
		Revisão: 02
		Classificação SIGDA: 013.1

11. REGISTRO DE TREINAMENTO

Eu li, entendi e estou ciente das condições estabelecidas neste Procedimento.

Nome	Assinatura	Data