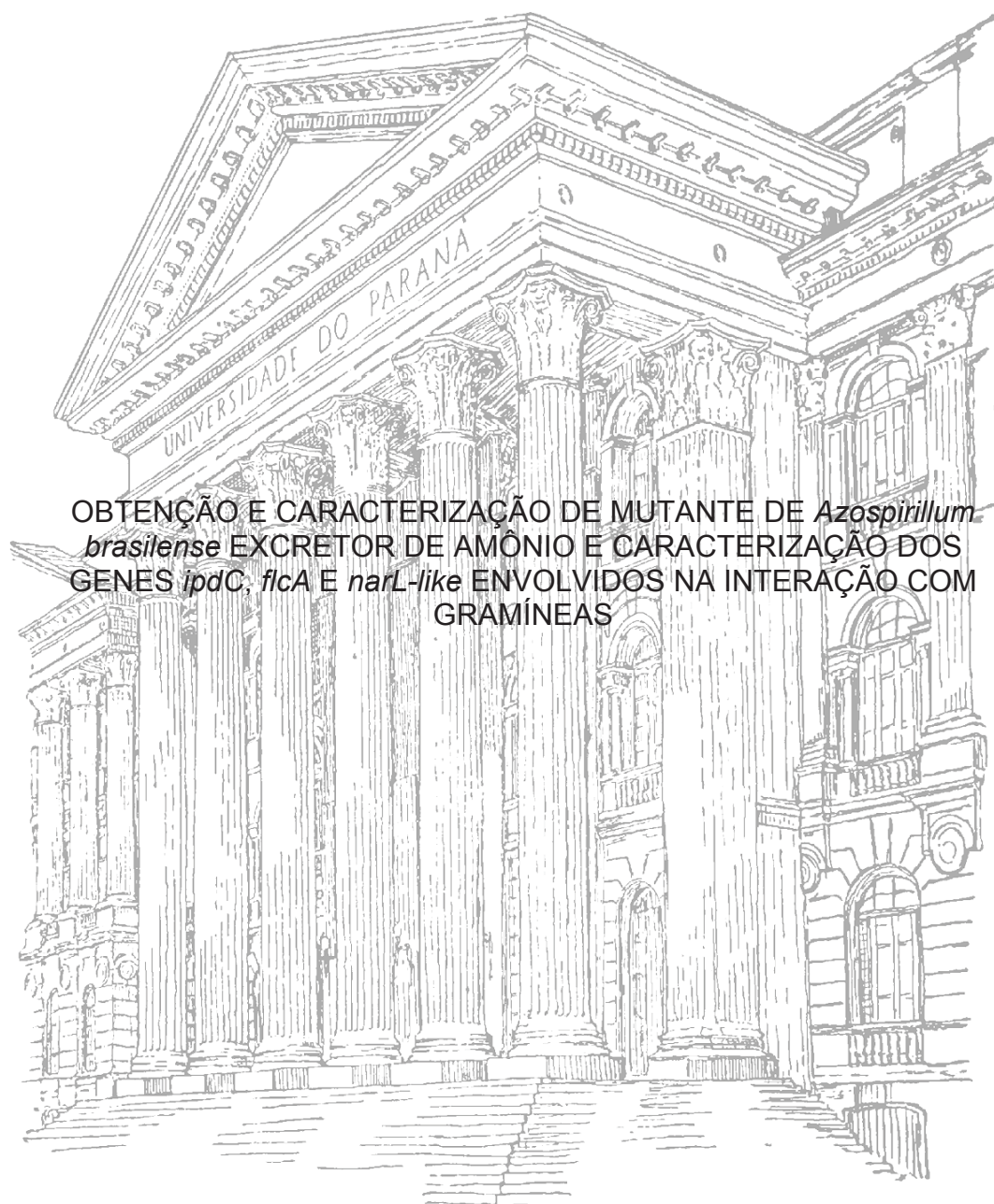


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAYARA SILVA TORRES DE SOUZA



OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTE DE *Azospirillum*
brasilense EXCRETOR DE AMÔNIO E CARACTERIZAÇÃO DOS
GENES *ipdC*, *flcA* E *narL-like* ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM
GRAMÍNEAS

CURITIBA
2018

MAYARA SILVA TORRES DE SOUZA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTE DE *Azospirillum
brasilense* EXCRETOR DE AMÔNIO E CARACTERIZAÇÃO DOS
GENES *ipdC*, *flcA* E *narL-like* ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO COM
GRAMÍNEAS

Tese de doutorado a ser apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
Setor de Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientador: Dr. Eduardo Balsanelli

**CURITIBA
2018**

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Souza, Mayara Silva Torres de.

Obtenção e caracterização de mutante de *Azospirillum brasiliense* excretor de amônio e caracterização dos genes *ipdC*, *flcA* e *narL-like* envolvidos na interação com gramíneas. / Mayara Silva Torres de Souza. – Curitiba, 2018.

120 f. : il.

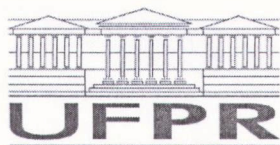
Orientador: Emanuel Maltempi de Souza.

Coorientador: Eduardo Balsanelli.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Bactérias. 2. Plantas. 3. Gramínea. 4. *Azospirillum*. I. Título. II. Souza, Emanuel Maltempi de. III. Balsanelli, Eduardo. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (22. ed.) 584.9



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MAYARA SILVA TORRES DE SOUZA** intitulada: **Obtenção e caracterização de mutante de *Azospirillum brasilense* excretor de amônio e caracterização dos genes *ipdC*, *fliA* e *narL-like* envolvidos na interação com gramíneas**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

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

CURITIBA, 27 de Abril de 2018.

EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA
Presidente da Banca Examinadora

MARIVAINÉ DA SILVA BRASIL
Avaliador Externo

LEDA SATIE CHUBATSU
Avaliador Interno

FABIO BUENO DOS REIS JUNIOR
Avaliador Externo

MARIA BERENICE REYNAUD STEFFENS
Avaliador Interno

AGRADECIMENTOS

À Deus por me presentear com o Dom da Vida.

Aos meus pais Antônio e Ester, pelo amor incondicional, pela dedicação, compreensão, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos pelo amor incondicional e por sempre me apoiarem na busca pelos meus sonhos.

Ao meu orientador Emanuel Maltempi de Souza pela confiança, pelo incentivo, compreensão e ensinamentos.

Ao meu coorientador Eduardo Balsanelli pela confiança, pelo incentivo, ensinamentos e ajuda em alguns experimentos.

À Rose Adele Monteiro e Leda Satie Chubatsu pelas sugestões e correção dos relatórios.

À Banca examinadora interna Maria Berenice R. Steffens e Leda Satie Chubatsu pelas sugestões e importantes considerações.

À Banca examinadora externa Marivaine da Silva Brasil e Fabio Bueno dos Reis Junior pelas sugestões e importantes considerações.

À Anelis Marin pelos ensinamentos e pela ajuda em alguns experimentos.

Ao Rodrigo Cardoso e Daniel Lammel pela ajuda nas análises de Bioinformática.

Ao Estevan Tomazini e Adriano Stefanello por me ajudarem quando precisei deles.

À Roseli Prado, Valter Baura e ao Thiago Vello, por sempre estarem disponíveis nos momentos que precisei da ajuda deles.

Aos colegas de laboratório (275) e demais colegas da pós-graduação de Ciências - Bioquímica.

Ao Programa de pós-graduação de Ciências – Bioquímica pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa concebida.

Ao grupo INCT-FBN pela infraestrutura e apoio financeiro.

RESUMO

Bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de colonizar e promover o crescimento de diversas gramíneas de interesse agrícola devido, principalmente, a produção de fitohormônios e a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Buscando aumentar a promoção de crescimento vegetal pela FBN, mutantes excretores de amônio têm sido isolados por resistência a etilenodiamina. Utilizando-se dessa ferramenta visa-se isolar mutantes capazes de fixar nitrogênio constitutivamente (fenótipo Nif^C) e excretar o amônio (produto da fixação) e, dessa forma, aumentar o fornecimento do nitrogênio fixado para a planta associada. Neste trabalho mutantes de *Azospirillum* resistentes a etilenodiamina foram isolados e selecionados quanto à sua capacidade de fixar nitrogênio e liberar o NH₄⁺ no meio. Um dos mutantes Nif^C, 38 SF0, foi capaz de excretar NH₄⁺ e apresentou uma mutação no gene *glnA* que resultou na substituição do aminoácido Q (glutamina) por R (arginina) na posição 35 da glutamina sintetase. Esta mutação pode ter alterado a estrutura tridimensional da glutamina sintetase, ocasionando a diminuição da atividade da enzima, o que poderia explicar o fenótipo excretor de amônio no mutante. Sob condições de crescimento axênico, o mutante 38 SF0 foi capaz de colonizar as raízes e promover o crescimento de plantas de trigo e milho, quando comparadas com plantas inoculadas com a estirpe selvagem. Diante disto, a utilização da estirpe mutante excretora de amônio 38 SF0 como biofertilizante agrícola, representa uma alternativa promissora para potencializar a indução do crescimento vegetal por *A. brasilense*. Por ter sido selecionada por mutações espontâneas, esta estirpe pode ser utilizada no campo de acordo com as normas do Ministério da Agricultura. Para que *Azospirillum* promova o crescimento vegetal é necessário que haja uma interação bem-sucedida com a planta hospedeira. No entanto, os fatores envolvidos na interação *Azospirillum*-planta não são completamente conhecidos. Assim, outro objetivo deste trabalho foi construir estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 nos genes *flcA*, *narL-like* e *ipdC* e caracterizar seu envolvimento na interação com gramíneas. Os fenótipos das estirpes mutantes, $\Delta flcA$, $\Delta narL-like$ e $\Delta ipdC$, foram avaliados quanto a atividade da nitrogenase, produção de ácido indol acético, floculação, ligação ao vermelho congo, formação de biofilme em fibra de vidro e a capacidade de colonização de raízes de trigo. A capacidade de fixar nitrogênio não foi afetada nos mutantes nocauteados e interessantemente o mutante $\Delta narL-like$ apresentou um nível de atividade nitrogenase *in vitro* maior que a estirpe selvagem. Os níveis de produção de ácido indol acético no mutante $\Delta ipdC$ foi significativamente menor que o da estirpe selvagem. O mutante incapaz de flocular, $\Delta flcA$, e o mutante $\Delta narL-like$ apresentaram menor capacidade de se ligar ao vermelho congo que a estirpe selvagem, sugerindo uma mudança na composição de polissacarídeos de superfície nestes mutantes. A formação de biofilme nos mutantes $\Delta flcA$ e $\Delta narL-like$ foi 40 % e 50% menor que a da estirpe selvagem, respectivamente. No entanto, o fenótipo de colonização do mutante $\Delta flcA$ não diferiu da estirpe selvagem. Curiosamente, o mutante $\Delta narL-like$ apresentou uma população epifítica maior que a da estirpe selvagem no ensaio de colonização de raízes de trigo, sugerindo que, possivelmente, este mutante seja mais eficiente na colonização de raízes.

Palavras-chave: interação bactéria-planta, mutantes excretores de amônio e biofertilizante;

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Azospirillum* are able to colonize and promote the growth of several grasses of agricultural interest mainly due to the production of phytohormones and biological nitrogen fixation (BNF). Seeking to increase plant growth promotion by BNF, ammonia excretory mutants have been isolated for resistance to ethylenediamine. Using this tool aims to isolate mutants capable of fix nitrogen constitutively (Nif^C phenotype) and excreting the ammonia (product of the fixation) and, thus, increase the nitrogen supply fixed in the associated plant. In this work, mutants of *Azospirillum* resistant to ethylenediamine were isolated and selected for their capacity to fix nitrogen and release NH₄⁺ in the medium. One of the Nif^C mutants, 38 SF0, was able to excrete NH₄⁺ and presented a mutation in the *glnA* gene that resulted in the substitution of amino acid Q (glutamine) for R (arginine) at position 35 of glutamine synthetase. This mutation may have altered the three-dimensional structure of glutamine synthetase, causing a decrease in enzyme activity, which could explain the ammonium excretory phenotype in the mutant. Under conditions of axenic growth, the 38 SF0 mutant was able to colonize the roots and promote the growth of wheat and maize plants when compared to the plants inoculated with the wild strain. In view of this, the use of the 38 SF0 ammonium excretory mutant strain as an agricultural biofertilizer represents a promising alternative to potentiate the induction of plant growth by *A. brasilense*. Because it was selected by spontaneous mutations, this strain can be used in the field according to the norms of the Ministry of Agriculture. So that *Azospirillum* promote plant growth, it is necessary that there is a successful interaction with a host plant. However, the factors involved in the *Azospirillum*-plant interaction are not completely known. Thus, another objective of this work is to construct mutant strains of *Azospirillum brasilense* strain FP2 in the *flcA*, *narL-like* and *ipdC* genes and characterize their involvement in the interaction with grasses. The phenotypes of the mutant strains, $\Delta flcA$, $\Delta narL-like$ and $\Delta ipdC$, were evaluated: nitrogenase activity, indole acetic acid production, flocculation, red congo binding, glass fiber biofilm formation and the ability of colonization of wheat roots. The capacity to fix nitrogen was not affected in mutant knockouts and interestingly the $\Delta narL-like$ mutant showed a higher *in vitro* nitrogenase activity level than the wild-type strain. The levels of indol acetic acid production in the $\Delta ipdC$ mutant was significantly lower than that of the wild-type strain. The mutant unable to flocculate, $\Delta flcA$, and the $\Delta narL-like$ mutant presented lower capacity to connect with the congo red than the wild strain, suggesting a change in the composition of surface polysaccharides in these mutants. The biofilm formation in $\Delta flcA$ and $\Delta narL-like$ mutants was 40% and 50% lower than that of the wild strain, respectively. However, the colonization phenotype of the $\Delta flcA$ mutant did not differ from the wild strain. Interestingly, the $\Delta narL-like$ mutant presented an epiphytic population larger than that of the wild strain in the wheat root colonization assay, suggesting that possibly this mutant is more efficient in root colonization.

Keywords: bacteria-plant interaction, ammonium excretory mutants and biofertilizer;

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - BENEFÍCIOS PARA A PLANTA HOSPEDEIRA PROVENIENTES DA INTERAÇÃO PGPR-PLANTA.	21
FIGURA 2 - ETAPAS DE COLONIZAÇÃO POR <i>A. brasilense</i> .	32
FIGURA 3 - ANÁLISE DE ANI DAS ESTIRPES DE <i>Azospirillum</i>	53
FIGURA 4 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO PONTUAL (SUBSTITUIÇÃO DE T POR C) LOCALIZADA NO GENE <i>glnA</i> DA ESTIRPE MUTANTE 38 SF0 DE <i>A. brasilense</i> .	54
FIGURA 5 - ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQUÊNCIAS DA GLUTAMINA SINTETASE DE DIFERENTES BACTÉRIAS.	55
FIGURA 6 - ESTRUTURA DA GLUTAMINA SINTETASE DA ESTIRPE SF0 DE <i>Azospirillum brasilense</i> COM DESTAQUE AO AMINOÁCIDO GLUTAMINA NA POSIÇÃO 35.	56
FIGURA 7 - ESTRUTURA DA GLUTAMINA SINTETASE E INTERAÇÃO DO AMINOÁCIDO GLUTAMINA 35 COM OS AMINOÁCIDOS TREONINA 33 E VALINA 19 POR PONTES DE HIDROGÊNIO.	56
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS “PRIMERS” DESENHADOS A MONTANTE (<i>Upstream</i>) E A JUSANTE (<i>Downstream</i>) DO GENE A SER DELETADO.	70
FIGURA 9 - CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO DOS GENES <i>ipdC</i> E <i>flcA</i> DE <i>Azospirillum brasilense</i> ESTIRPE FP2.	74
FIGURA 10 - CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO DO GENE <i>narL-like</i> DE <i>Azospirillum brasilense</i> ESTIRPE FP2.	75
FIGURA 11 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÃO DO GENE <i>flcA</i> E <i>narL-like</i> NO GENOMA DE <i>A. brasilense</i> FP2.	77
FIGURA 12 – CONSERVAÇÃO DE VIZINHANÇA GÊNICA DO GENE <i>narL-like</i> EM ALGUMAS ALFA-PROTEOBACTÉRIAS E BETA-PROTEOBACTÉRIAS	79
FIGURA 13 - CONSERVAÇÃO DE VIZINHANÇA GÊNICA DO GENE <i>flcA</i> EM ALGUMAS ALFA-PROTEOBACTÉRIAS E BETA-PROTEOBACTÉRIAS.	80
FIGURA 14 - ANÁLISE DE CO-OCORRÊNCIA DO GENE <i>narL-like</i> .	81
FIGURA 15 - ANÁLISE DE CO-OCORRÊNCIA DO GENE <i>flcA</i> .	82
FIGURA 16 - DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS <i>narL-like</i> E <i>flcA</i> .	83
FIGURA 17 - MICROSCOPIA ÓTICA DAS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i>	89
FIGURA 18 - ENSAIO DE LIGAÇÃO AO VERMELHO-CONGO.	90

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS MUTANTES DE <i>Azospirillum brasilense</i> ESTIRPE SF0 RESISTENTES À ETILENODIAMINA.	43
GRÁFICO 2 - ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS MUTANTES DE <i>Azospirillum sp.</i> isolado HAI3 RESISTENTES À ETILENODIAMINA.	44
GRÁFICO 3 - POPULAÇÃO DE <i>Azospirillum spp.</i> ADERIDA À SUPERFÍCIE DE RAÍZES DE MILHO.	46
GRÁFICO 4 - POPULAÇÃO EPIFÍTICA E ENDOFÍTICA DE RAÍZES DE MILHO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE <i>Azospirillum spp.</i>	47
GRÁFICO 5 - PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DE RAÍZES DE MILHO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i>	48
GRÁFICO 6 - PESO SECO DE RAÍZES DOS CULTIVARES DE MILHO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i>	49
GRÁFICO 7 - POPULAÇÃO EPIFÍTICA DE RAÍZES DE MILHO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i>	49
GRÁFICO 8 - PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DE RAÍZES DE TRIGO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i>	51
GRÁFICO 9 – EFEITO DA INOCULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> ESTIRPES SF0, 38SF0 E 39 SF0 EM PLANTAS DE TRIGO.	52
GRÁFICO 10 - ATIVIDADE DA NITROGENASE DAS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> – FP2 E SEUS MUTANTES.	86
GRÁFICO 11 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO PELA ESTIRPE SELVAGEM DE <i>Azospirillum brasilense</i> (FP2) E PELO MUTANTE $\Delta ipdC$ -FP2	87
GRÁFICO 12 - FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO POR <i>A. brasilense</i>	92
GRÁFICO 13 - POPULAÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> ADERIDA À SUPERFÍCIE DE RAÍZES DE TRIGO.	94
GRÁFICO 14 - POPULAÇÃO PLANCTÔNICA E EPIFÍTICA DE RAÍZES DE TRIGO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE <i>A. brasilense</i>	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES DE <i>Azospirillum</i> UTILIZADAS	37
TABELA 2 - EXCREÇÃO DE AMÔNIO DAS ESTIRPES DE <i>Azospirillum brasilense</i> RESISTENTES À ETILENODIAMINA.	45
TABELA 3 - ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS	63
TABELA 4 - PLASMÍDEOS UTILIZADOS	63
TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS	64
TABELA 6 - LOCALIZAÇÃO NO GENOMA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GENES <i>ipdC</i> , <i>flcA</i> E <i>narL-like</i> DA ESTIRPE FP2 DE <i>Azospirillum brasilense</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	- ácido indol acético
Amp	- ampicilina
Cm	- cloranfenicol
D.A.I	- dias após a inoculação
EDA	- etilenodiamina
EPS	- exopolissacarídeos
FBN	- fixação biológica de nitrogênio
GS	- glutamina sintetase
IAM	- via indol-3-acetamida
IpyA	- via indol-3-piruvato
Km	- kanamicina
LPS	- lipossacarídeos
Nal	- ácido nalidíxico
Nif ^C	- fenótipo Nif constitutivo
PGPR	- “plant growth promoting rhizobacteria”
Sm	- estreptomicina
TAM	- via indol-3-acetonitrila
Trp	- triptofano
UFC	- unidade formadora de colônia
PHB	- poli-β-hidroxibutirato intracelular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Fertilizantes nitrogenados e biofertilizantes	16
2.2 <i>Azospirillum</i> características gerais	19
2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	20
2.4 Produção de ácido indol acético (AIA) em <i>Azospirillum</i> sp.	23
2.5 Fixação biológica de Nitrogênio e Assimilação de íons amônio em <i>Azospirillum</i> sp.	25
2.6 Mutantes excretoras de amônio de <i>Azospirillum brasilense</i>	27
2.7 Interação planta-bactéria	29
2.7.1 Nichos de colonização de PGPRs diazotróficas associativas	29
2.7.2 Fatores moleculares envolvidos na colonização de plantas por PGPRs	30
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral:	35
3.1.1 Capítulo 1	35
3.1.2 Capítulo 2	35
3.2 Objetivos específicos	35
3.2.1 Capítulo 1	35
3.2.2 Capítulo 2	35
4.0 Capítulo 1: Isolamento de mutantes de <i>Azospirillum</i> excretoras de amônio e avaliação do efeito de sua inoculação na promoção de crescimento em milho e trigo	36
4.1 Materiais e Métodos	37
4.1.1 Bactérias e meios de cultura	37
4.1.2 Isolamento de mutantes <i>Azospirillum</i> excretoras de amônio por resistência à etilenodiamina	38
4.1.3 Determinação da atividade nitrogenase constitutiva	38
4.1.4 Avaliação da capacidade de excretar amônio dos mutantes Nif constitutivos pelo método de indofenol	39
4.1.5 Ensaio <i>in planta</i>	39
4.1.5.1 Ensaio de colonização	39
4.1.5.2 Ensaio de promoção de crescimento em milho cultivado em sistema hidropônico	39

4.1.5.3 Ensaio de promoção de crescimento em trigo	40
4.1.6 Análise genômica	41
4.1.6.1 Sequenciamento, montagem e anotação dos genomas de <i>Azospirillum</i> spp.	41
4.1.6.2 <i>Average Nucleotide Identity</i> – ANI	41
4.1.6.3 Comparação 38 SF0 vs SF0	42
4.1.7 Análise bioinformática da sequência da enzima Glutamina sintetase	42
4.2 Resultados	42
4.2.1 Isolamento de mutantes de <i>Azospirillum</i> spp. resistentes à etilenodiamina e avaliação da fixação biológica de nitrogênio dos isolados pela atividade de redução de acetileno	42
4.2.2 Excreção de NH ⁴⁺ (amônio)	44
4.2.3 Colonização de raízes de milho por <i>Azospirillum</i> spp.	45
4.2.4 Promoção de crescimento em milho inoculadas com <i>Azospirillum</i> sp.	47
4.2.5 Promoção de crescimento em trigo inoculadas com <i>Azospirillum</i> sp.	50
4.2.6 Análise da média de indentidade de nucleotídeos (<i>Average nucleotide identity</i> - ANI) do isolado HAI3 e da estirpe SF0	52
4.2.7 Análises genômicas das estirpes SF0 e 38 SF0	53
4.3 Discussão	57
4.4 Conclusões	61
5. Capítulo 2: Construção de estirpes mutantes de <i>Azospirillum brasilense</i> estirpe FP2 nos genes <i>flcA</i> , <i>ipdC</i> e <i>narL-like</i> e caracterização de seu envolvimento na interação com o trigo.	62
5.1 Materiais e Métodos	62
5.1.1 Estudo <i>in silico</i> dos genes <i>flcA</i> , <i>narL-like</i> e <i>ipdC</i> da estirpe FP2 de <i>A. brasilense</i>	62
5.1.2 Bactérias e plasmídeos	63
5.1.3 Condições e meios de cultivo	64
5.1.4 Antibióticos	64
5.1.5 Manutenção das estirpes bacterianas	64
5.1.6 Técnicas de manipulação de DNA	65
5.1.6.1 Purificação do DNA plasmidial	65
5.1.6.2 Purificação do DNA genômico	65
5.1.6.3 Extração de DNA a partir do gel de agarose	65
5.1.6.4 Digestão do DNA por enzimas de restrição	66

5.1.6.5 Ligação do fragmento de DNA aos vetores	66
5.1.6.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose	66
5.1.6.7 Amplificação de DNA	66
5.1.6.8 Sequenciamento do DNA	67
5.1.7 Preparo de células competentes utilizando solução TSS “Transformation and storage solution”	67
5.1.8 Transformação bacteriana por choque térmico	67
5.1.9 Transferência de plasmídeos por conjugação tripla	68
5.1.10 Obtenção das estirpes mutantes da estirpe FP2 de <i>A. brasilense</i>	68
5.1.11 Ensaio de Floculação e de Ligação ao vermelho congo	70
5.1.12 Determinação da atividade da nitrogenase	71
5.1.13 Produção de ácido indol acético (AIA)	71
5.1.14 Ensaio de formação de Biofilme em fibra de vidro	72
5.1.15 Ensaios <i>in planta</i>	72
5.1.15.1 Ensaios de colonização	72
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
6.1 Obtenção dos mutantes $\Delta ipdC$, $\Delta flcA$ e $\Delta narL$ -like de <i>A. brasilense</i> estirpe FP2	73
6.2 Organização estrutural da região dos genes <i>ipdC</i> , <i>flcA</i> e <i>narL</i> -like no genoma da estirpe FP2 de <i>Azospirillum brasilense</i> e análise <i>in silico</i> das proteínas	75
6.3 Determinação da atividade da nitrogenase	84
6.4 Produção de ácido indol acético (AIA)	86
6.5 Ensaio de Floculação e de Ligação ao vermelho congo	88
6.6 Ensaio de formação de biofilme em fibra de vidro	91
6.7 Ensaio de colonização	93
7 CONCLUSÕES	97
8 REFERÊNCIAS	98
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é essencial para todos os organismos, pois é componente de biomoléculas, como ácidos nucleicos e proteínas. Embora o nitrogênio molecular (N_2) seja um recurso abundante na atmosfera (representando 78% dos gases atmosféricos) esta não é uma forma acessível para a maioria dos organismos. Por isso, o N é um recurso escasso e frequentemente limitante para a produtividade primária de diversos ecossistemas. Quando o N_2 é reduzido a amônia (NH_3) ele se torna disponível para produtores primários, com plantas (BERNHARD, 2010).

O processo de conversão de N_2 em nitrogênio biologicamente disponível é chamado de fixação de nitrogênio. A fixação de nitrogênio pode ser realizada biologicamente por bactérias chamadas de diazotróficas (fixação biológica de nitrogênio - FBN), e também abioticamente por raios ou por processos industriais, como o processo oneroso conhecido por Haber-Bosch (BERNHARD, 2010).

A produção de fertilizantes nitrogenados via processo Haber-Bosch revolucionou a agricultura, elevando a produtividade das plantas. No entanto, o uso de fertilizantes químicos tem elevado custo ambiental e econômico (OLIVARES *et al.*, 2013; ROBERTSON e VITOUSEK, 2009). Uma alternativa para o uso de fertilizantes químicos é a exploração da FBN por bactérias diazotróficas que se associam a plantas de interesse agrícola.

A associação *Bradyrhizobium* spp. soja é um bom exemplo da eficiência de FBN, pois estas bactérias formam associação simbiótica com a soja fornecendo todo o nitrogênio que a cultura necessita para alcançar uma alta produtividade (HUNGRIA *et al.*, 2007). Para gramíneas ainda não existe tecnologia de igual eficiência, embora sua associação com bactérias diazotróficas possa reduzir o uso de fertilizante nitrogenados (CURATTI e RUBIO, 2014). O gênero *Azospirillum* é um dos mais promissores do grupo de bactérias diazotróficas que se associam a gramíneas. Existem diversos bioprodutos contendo *Azospirillum* sendo comercializados para aplicação para em milho, trigo e forrageiras no mundo inteiro, e a obtenção de respostas no aumento de produtividade das plantas após o uso destes produtos são de até 15% (DÍAZ-ZORITA *et al.*, 2015). No Brasil existem várias formulações de

inoculantes contendo as cepas AbV5 e AbV6 da espécie *A. brasilense* indicadas para diversas espécies de *Poaceae*. A inoculação destas estirpes em experimentos de campo possibilitou um aumento médio de 26%, 31% e de 5 a 22% na produtividade do milho, do trigo e de braquiária, respectivamente (HUNGRIA *et al.*, 2010, 2016).

Diante dos percentuais de aumento de produtividade usando inoculante com *Azospirillum*, pode se observar que o uso desse biofertilizante ainda não atingiu um percentual de rendimento acima de 30% e assim o uso dessa tecnologia pode ser aprimorado através de estudos como a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação *Azospirillum*/planta e também como melhorar o fornecimento de nitrogênio fixado por essa bactéria para as plantas.

O processo da FBN é fortemente regulado em *Azospirillum* spp. e ocorre somente em condições microaeróbicas e níveis baixos de nitrogênio fixado (amônio) (HARTMANN e BURRIS, 1987; ZHANG *et al.*, 1993; 1997). Os íons amônio obtidos da FBN ou do meio ambiente são assimilados, principalmente, em *Azospirillum* spp. via ação das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase, para a síntese de glutamina e glutamato, que servem como doadores de nitrogênio nas reações biossintéticas (ELMERICH e AUBERT, 1971; MEERS *et al.*, 1970; WESTBY *et al.*, 1987). Portanto a glutamina sintetase é essencial para a assimilação da amônia e biossíntese de glutamina durante a fixação biológica de nitrogênio.

Os estudos sobre a regulação da FBN em *A. brasilense* estirpe FP2 levaram Machado *et al.* (1991) ao isolamento de mutantes espontâneos, resistentes à etilenodiamina, HM014, HM026, HM210 e HM053, que são capazes de excretar NH_4^+ e fixar N_2 constitutivamente na presença de altas concentrações de NH_4^+ . Os autores sugeriram que a capacidade de excretar amônio destes mutantes está relacionada a deficiência na atividade da glutamina sintetase, o que ocasionaria deficiência de assimilação de NH_4^+ por esses mutantes e explica a habilidade em excretar o excesso de amônio derivado da FBN para o meio extracelular. Assim, a possibilidade da utilização de mutantes excretores de amônia com o intuito de otimizar a transferência do N fixado por esses microrganismos para a planta associada, justifica o interesse de se obter e caracterizar estes mutantes, bem como interesse de investigar a contribuição destes mutantes no desenvolvimento vegetal.

A capacidade de *Azospirillum* promover o crescimento vegetal depende da interação com a planta hospedeira. Desta forma, outra abordagem a ser estudada para aprimorar a tecnologia de inoculantes a base de *Azospirillum* seria a caracterização de genes envolvidos nas etapas de colonização da planta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fertilizantes nitrogenados e biofertilizantes

O nitrogênio (N) é essencial para a síntese de biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas sendo, portanto, fundamental para a sobrevivência de todos os organismos. Embora o nitrogênio seja muito abundante na atmosfera como gás dinitrogênio (N_2), esta forma é praticamente inacessível para a maioria dos organismos, tornando o nitrogênio um recurso escasso e frequentemente limitante para a produtividade primária em muitos ecossistemas. Quando o nitrogênio é reduzido a amônia (NH_3) ele se torna disponível para produtores primários, como plantas (BERNHARD, 2010).

O processo de conversão de N_2 em nitrogênio biologicamente disponível é chamado de fixação de nitrogênio. O gás N_2 é um composto muito estável devido à força da tripla ligação entre os átomos de nitrogênio, e requer uma grande quantidade de energia para quebrar essa ligação, por isso apenas um grupo seleto de procariotos é capaz de realizar este processo. Embora a maior parte da fixação de nitrogênio seja realizada biologicamente por procariotos (fixação biológica de nitrogênio - FBN), o nitrogênio pode ser fixado abioticamente por raios ou por certos processos industriais, como o oneroso Haber-Bosch (BERNHARD, 2010).

A produção de fertilizantes nitrogenados via processo Haber-Bosch revolucionou a agricultura, elevando a produtividade das plantas (OLIVARES *et al.*, 2013). Este processo, no entanto, tem alto custo ambiental, pois envolve a produção de grandes quantidades de CO_2 com o uso de combustíveis fósseis como gás natural e carvão. Além disso, a eficiência do uso de fertilizantes químicos pelas plantas é muito baixa e a maior parte do adubo aplicado é desperdiçada (ROBERTSON e VITOUSEK, 2009).

Como o nitrogênio é muito móvel, quando fertilizantes nitrogenados são aplicados em alta quantidade poluem rios e lagos e causam eutrofização dos sistemas terrestres e aquáticos, também contribuem para o aumento da acidificação global do solo bem como, para o aumento do efeito estufa pela emissão de óxido nitroso obtido na desnitrificação (BOBBINK *et al.*, 2010).

A FBN, ao contrário do processo industrial, tem menores custos econômicos e ambientais e perde apenas para a fotossíntese em importância para manutenção da biosfera (OLIVARES *et al.*, 2013). O nitrogênio fixado biologicamente é menos propenso à lixiviação e volatilização, pois é disponibilizado para ser rapidamente absorvido pelas plantas e microrganismos (DIXON e KAHN, 2004).

O processo de FBN é realizado por microrganismos conhecidos como diazotróficos, particularmente bactérias e Arqueias, que são capazes de reduzir o nitrogênio gasoso a amônio através da ação da enzima nitrogenase. Essa enzima é amplamente distribuída entre os mais diversos filos bacterianos incluindo bactérias verdes sulfurosas, Firmicutes, Actinomicetos, cianobactérias e todas as subdivisões das Proteobactérias (DIXON e KAHN, 2004).

A enzima nitrogenase é sensível a altas concentrações de oxigênio levando essas bactérias a desenvolver estratégias para executar a FBN fora de um ambiente de alta tensão de oxigênio (BOYD e PETERS, 2013). Por exemplo, na simbiose entre leguminosas e bactérias diazotróficas do gênero *Rhizobium*, as bactérias induzem a formação de estruturas especializadas nas raízes das plantas, chamadas de nódulos. A formação de nódulos estabelece um nicho micro-aeróbico onde as tensões de oxigênio são mantidas em níveis baixos, por uma proteína de alta afinidade de ligação ao oxigênio conhecida como leghemoglobina, que é produzida pela planta hospedeira (OTT *et al.*, 2005).

As espécies de bactérias da família Rhizobiaceae são extensivamente estudadas devido a sua interação simbiótica com leguminosas e sua utilização agrônômica como inoculantes no cultivo de culturas de interesse econômico (ALVES *et al.*, 2003; TORRES *et al.*, 2012). A associação *Bradyrhizobium* spp/soja é um bom exemplo da eficiência de FBN, pois estas bactérias podem fornecer todo o nitrogênio que a soja necessita para alcançar uma produtividade média de aproximadamente 3.600 kg/ha e proporcionar valores entre 20 e 30 kg/ha de nitrogênio para a cultura subsequente. Somente com a cultura de soja, o Brasil economiza aproximadamente US\$ 15 bilhões por ano com a utilização de inoculante contendo *B. diazoefficiens*, *B. elkanii* e *B. japonicum* (HUNGRIA *et al.*, 2013; HUNGRIA *et al.*, 2007; HUNGRIA e MENDES, 2015).

Outros sistemas de associações de fixação de N com não leguminosas foram descritos (REINHOLD-HUREK e HUREK, 2011), no entanto, eles diferem

dos rizóbios, uma vez que a colonização do hospedeiro pelas bactérias não induz a formação de nódulos (BALDANI e BALDANI, 2005). A redução da alta concentração de oxigênio nestes diazotrofos pode ser feita através do aumento da respiração e consumo de oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons na membrana celular, diminuindo a concentração intracelular de O₂, e dessa maneira favorecendo a FBN. Muitos diazotrofos procuram nichos onde a concentração de oxigênio é menor (STEENHOUDT e VANDEREYDEN, 2000).

Entre os gêneros mais bem descritos de diazotróficos não-simbióticos estão as espécies de *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Paraburkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (CARVALHO *et al.*, 2016). Essas bactérias diazotróficas não-simbióticas transferem apenas parte do nitrogênio fixado para a planta associada, por mecanismos ainda não conhecidos completamente, de modo que a FBN por essas bactérias supre apenas em parte as necessidades das plantas (GLICK, 2012; HUNGRIA, 2011), não sendo tão eficientes quanto a simbiose rizóbio com leguminosas.

Entre as bactérias diazotróficas não-simbióticas associadas às plantas, o gênero *Azospirillum* é o mais estudado (RADWAN *et al.*, 2005). Na literatura existem vários trabalhos confirmando que *Azospirillum* pode promover o crescimento e/ou a produtividade de diferentes espécies de gramíneas e de cereais, como no arroz (GARCÍA DE SALAMONE *et al.*, 2012), no trigo e milho, (HUNGRIA *et al.*, 2010; HUNGRIA, 2011) e em pastagens (HUNGRIA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017).

Díaz-Zorita *et al.* (2015) em sua revisão realizaram um levantamento de trabalhos de experimento de campo utilizando *Azospirillum* como inoculante em culturas de grão e observaram que o aumento médio de ganho de produtividade em resposta a inoculação foi de 10%. Na América do Sul existem 104 produtos comerciais contendo *Azospirillum* que são produzidos por mais de 50 empresas, sendo que a maioria delas estão localizadas na Argentina. No Brasil 16 empresas produzem biofertilizante contendo *Azospirillum*. As principais estirpes usadas nos inoculantes comerciais são a Az39 contida em 68 produtos e as estirpes Abv5 e Abv6 contidas em 11 produtos (CASSÁN e DÍAZ-ZORITA, 2016).

No Brasil existem várias formulações de inoculantes contendo as cepas AbV5 e AbV6 da espécie *A. brasilense* para diversas plantas da *Poaceae*. A

inoculação destas estirpes em experimentos de campo possibilitou um aumento médio de 26%, 31% e de 5 a 22% na produtividade do milho, do trigo e de braquiária, respectivamente (HUNGRIA *et al.*, 2010; 2016).

A tecnologia de inoculação com bactérias associativas simbióticas ou não é uma ferramenta importante para alcançar a sustentabilidade na agricultura por não proporcionar danos ambientais e possuir custos de produção menores em comparação aos insumos industriais. No entanto, diferentes das relações simbióticas, onde as interações planta-bactéria foram amplamente exploradas, as interações associativas conduzidas por bactérias não simbióticas foram menos estudadas e apenas recentemente os fatores envolvidos nessas associações começaram a ser esclarecidos (CARVALHO *et al.*, 2016).

Diante do exposto, a tecnologia de inoculação com *Azospirillum* para o cultivo de gramíneas, ainda não é tão eficiente quanto à associação simbiótica *Rhizobium*-leguminosa. Para alcançar este objetivo de igual eficiência existem duas abordagens a serem estudadas:

1. Compreender os mecanismos envolvidos na interação *Azospirillum*-planta;
2. Melhorar o fornecimento de nitrogênio fixado por *Azospirillum* para a planta.

2.2 *Azospirillum* características gerais

O gênero *Azospirillum* foi definido por Tarrand *et al.* (1978) que caracterizam na época duas espécies, *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, fixadoras de nitrogênio e que se associam às raízes de plantas. Hoje o gênero está representado por 16 espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *A. irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *A. halopraeferans* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. largimobile* (DEKHILL *et al.*, 1997), *A. doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG *et al.*, 2006), *A. canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007a), *A. zae* (MEHNAZ *et al.*, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008), *A. palatum* (ZHOU *et al.*, 2009), *A. picis* (LIN *et al.*, 2009), *A. thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010), *A. formosense* (LIN *et al.*, 2012) e *A. humicireducens* (ZHOU *et al.*, 2013). Dentre essas, as mais estudadas são *A. brasilense* e *A. lipoferum*, ambas são encontradas associadas a uma

grande variedade de plantas como pastagens, milho e arroz (PEREG *et al.*, 2016).

A característica mais comum entre as espécies desse gênero é que a maioria fixa nitrogênio (diazotrófica), podendo ter o modo de vida livre ou fazer associações não simbióticas com uma variedade de plantas. São bactérias Gram-negativas, móveis, micro-aerofílicas, não fermentativas e quimio-organotróficas. Elas utilizam várias fontes de carbono, preferencialmente os ácidos orgânicos, como malato, lactato, succinato e piruvato e algumas espécies podem utilizar carboidratos como D-frutose e D-glucose (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; BALDANI *et al.*, 2014). Como fontes de nitrogênio podem ser utilizados: nitrato, nitrito, amônio, aminoácidos e nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; STEENHOUDT e VANDEREYDEN, 2000; BALDANI *et al.*, 2014). Essas bactérias possuem ampla distribuição, sendo encontradas em associação com raízes, folhas e colmos de plantas (BALDANI *et al.*, 2014).

Apesar da sua ampla distribuição nas plantas, bactérias desse gênero também foram encontradas em ambientes com condições extremas de temperatura, alta salinidade e contaminados com petróleo (ECKFORD *et al.*, 2002; NIA *et al.*, 2012; OJEDA-MORALES *et al.*, 2015). A característica cosmopolita desse gênero é consequência do seu metabolismo versátil de C e N que lhe permitem sobreviver e prosperar em diversos ambientes naturais bem como na rizosfera de plantas (STEENHOUDT e VANDEREYDEN, 2000).

2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

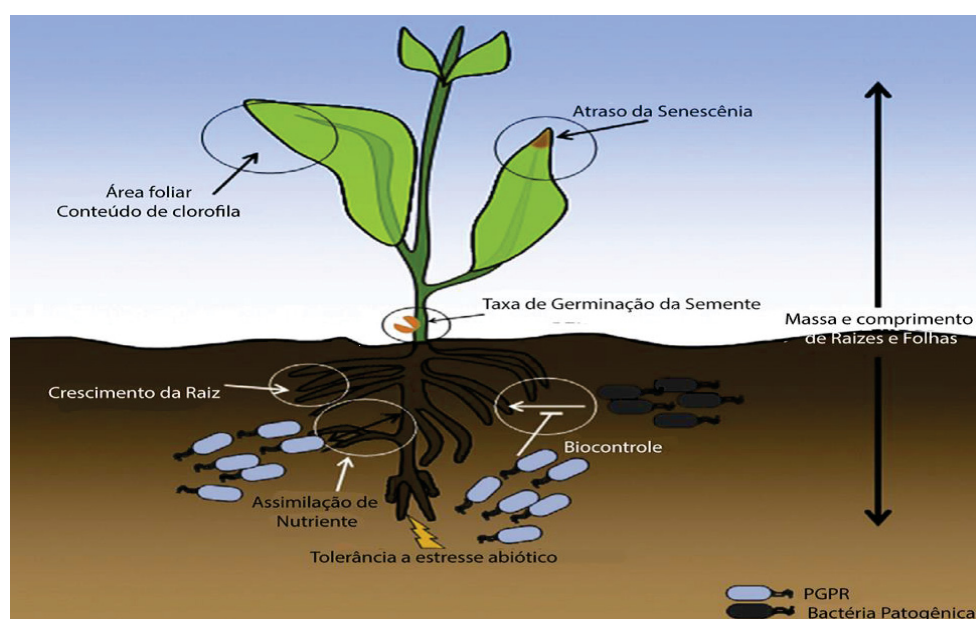
A rizosfera é definida como a região do solo onde os processos mediados pela microbiota são especificamente influenciados pela raiz. Esta área inclui o solo conectado as raízes da planta e muitas vezes pode se estender a alguns milímetros da superfície radicular, podendo ser subdividida em três zonas: região endorizosfera, rizoplane e ectorizosfera. A rizosfera é um ambiente importante para as interações micro-organismos/planta devido a liberação de diversos compostos orgânicos, os chamados exsudatos, envolvidos na atração de organismos que podem ser benéficos, neutros ou prejudiciais para as plantas

(LYNCH, 1990; GRAY e SMITH, 2005; BADRI e VIVANCO, 2009; SOUZA *et al.*, 2015; BASU *et al.*, 2017).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (do inglês *plant growth promoting rhizobacteria* – PGPR) pertencem a um grupo heterogêneo de micro-organismos benéficos (GLICK, 2012). Este termo, PGPR, foi definido por Kloepper e Schroth em 1978 e é usado para descrever bactérias do solo que colonizam a rizosfera das plantas e podem crescer dentro, fora ou ao redor dos tecidos das plantas. Desde então, pesquisas destinadas à compreensão de como essas bactérias realizam seu efeito benéfico aumentaram de forma constante (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014) e atualmente essas bactérias são utilizadas como biofertilizantes agrícolas, como uma alternativa para diminuir os custos e o impacto ambiental oriundos da utilização dos insumos agrícolas.

Os benefícios da interação planta-PGPR incluem: o aumento da taxa de germinação das sementes, do crescimento das raízes, da área foliar, do teor de clorofila, da absorção de nutrientes, do teor de proteínas, da atividade hidráulica, da tolerância ao estresse abiótico, do comprimento e da massa de raiz e folhas, do controle biológico de patógenos e atraso da senescência (Figura 1) (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014).

FIGURA 1 - BENEFÍCIOS PARA A PLANTA HOSPEDEIRA PROVENIENTES DA INTERAÇÃO PGPR-PLANTA.



FONTE: Adaptado de Pérez-Montaño *et al.* (2014).

Segundo Glick (2012) as PGPRs podem beneficiar a planta por mecanismos diretos ou indiretos, entre os diretos estão àqueles relacionados à promoção de crescimento da planta através da síntese de auxinas, ACC deaminase, citocininas e giberilinas; fixação de nitrogênio; solubilização de fósforo e produção de sideróforos. Os processos indiretos referem-se a características bacterianas que inibem um ou mais organismos patogênicos de plantas, como a produção de antibióticos, produção de enzimas que degradam a parede celular e produção de substâncias indutoras de resistência a patógenos. De maneira geral uma bactéria pode influenciar o crescimento da planta usando um ou mais desses mecanismos (BENEDUZI *et al.*, 2012).

As PGPRs podem ter uma ou mais características mencionadas acima, conferindo versatilidade a essas bactérias, podendo ter distintas atividades sob diferentes condições ambientais e do solo (OLANREWAJU *et al.*, 2017). Porém a eficiência desse grupo de bactérias em sintetizar as moléculas benéficas às plantas pode ser influenciada pela espécie bacteriana, estirpe, pela planta hospedeira, além das condições ambientais (SOUZA *et al.*, 2015). Para se verificar a eficácia das PGPRs as mesmas devem ser submetidas à experimentos em condições controladas e posteriormente em condições naturais para observação de desempenhos promissores (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014).

As PGPRs do gênero *Azospirillum* podem influenciar o crescimento vegetal, principalmente através da fixação biológica de nitrogênio e da produção de fitohormônios (STEENHOUDT e VANDEREYDEN, 2000). Em *Azospirillum*, os genes responsáveis pela fixação de nitrogênio, *nifHDK*, que codificam para a nitrogenase, são fortemente regulados ao nível transcricional. A atividade da nitrogenase, por sua vez, é regulada pós-traducionalmente. Além disso, a expressão e atividade desta enzima só ocorrem em condições de baixos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado (ver referências no item 2.5).

Em *Azospirillum*, os genes *nifHDK* codificam para a nitrogenase. A expressão e a atividade da nitrogenase são fortemente reguladas ocorrendo, somente, em condições de baixos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado (ver referências no item 2.5). A nitrogenase catalisa a conversão do nitrogênio

atmosférico a amônio, que é assimilável, podendo também, portanto, ser utilizado pela planta hospedeira (BASHAN e HOLGUIN, 1997).

Embora a FBN por *Azospirillum* spp. pareça ser importante para a promoção de crescimento vegetal, sua contribuição para a planta ainda é controversa (PANKIEVICZ *et al.*, 2015). Estudos utilizando técnicas de isótopos de ^{15}N e de abundância de natural ^{15}N sugerem fortemente a contribuição da FBN para o crescimento da planta (OKON, 1985; RODRIGUES *et al.*, 2008; FLORES *et al.*, 2010; MORAIS *et al.*, 2012), enquanto outros mostram resultados contrários (HUREK *et al.*, 1994; EGENER *et al.*, 1998; MALIK *et al.*, 2002).

Segundo Pankiewicz *et al.* (2015) a maioria dos trabalhos utilizando PGPRs reportam apenas a detecção de fixação de N por bactérias ou talvez a expressão da nitrogenase *in planta*. Além disso, somente alguns estudos forneceram dados convincentes para a fixação *in planta* e ainda menos para a incorporação de nitrogênio fixado pela planta hospedeira (PANKIEVICZ *et al.*, 2015).

Dessa maneira é necessária uma investigação mais profunda sobre a FBN por *Azospirillum*, uma vez que os resultados ainda não são conclusivos, sendo necessária busca de respostas nas vias de regulação da FBN, bem como a assimilação e excreção de amônio desse microrganismo na planta hospedeira.

2.4 Produção de ácido indol acético (AIA) em *Azospirillum* sp.

Até o momento foram propostas/descritas quatro vias de produção de AIA em *Azospirillum* sp., sendo três vias dependentes de triptofano (Trp) e uma via independente de Trp (CASSÁN *et al.*, 2014). As três vias biossintéticas que utilizam o Trp como precursor são: (I) a via indol-3-piruvato (IPyA) (SPAEPEN *et al.*, 2007), (II) a via indol-3-acetamida (IAM) e (III) a via indol-3-acetonitrila (TAM) (CARREÑO-LOPEZ *et al.*, 2000). No entanto, a existência da via independente de Trp foi questionada, uma vez que as tentativas de isolar enzimas ou genes responsáveis por esta atividade não obtiveram êxito (CASSÁN *et al.*, 2014).

A principal via de produção de AIA em *A. brasilense* é a via indol-3-piruvato (IPyA) (PRINSEN *et al.*, 1993). Nesta via o L-triptofano é desaminado para indol-3-piruvato por uma aminotransferase, em seguida, uma

descarboxilase converte indol-3-piruvato em indol-3-acetaldeído, que então é oxidado para AIA pela aldeído desidrogenase (PRINSEN *et al.*, 1993). A enzima chave dessa via é a indol-3-piruvato descarboxilase codificada pelo gene *ipdC*, uma vez que a inativação deste gene resulta em diminuição de produção de AIA indicando a importância da via IPyA na biossíntese desta auxina (PRINSEN *et al.*, 1993; COSTACURTA *et al.*, 1994).

A expressão do gene *ipdC* é regulada positivamente pelo próprio produto final AIA (*feedback* positivo) (VAN DE BROEK *et al.*, 1999), e por outras auxinas como o ácido naftaleno e o ácido fenilacético (SOMERS *et al.*, 2005). Dessa forma, além de produzir a auxina, *Azospirillum* sp. também é capaz de detectar o AIA e alterar a sua expressão gênica na presença de AIA (VAN PUYVELDE *et al.*, 2011). A expressão de *ipdC* é ainda aumentada sob limitação de carbono, redução da taxa de crescimento e pH ácido (ONA *et al.*, 2003; 2005).

Van De Broek *et al.* (2005) utilizando a gene repórter *gusA* fusionado ao promotor de *ipdC*, mostraram que a expressão do gene *ipdC* é induzida principalmente durante a fase de crescimento estacionário, o que coincide com a acumulação de AIA no meio de cultura. Os mesmos autores realizaram também uma análise *in silico* da região promotora do gene *ipdC* que revelou vários elementos regulatórios-cis: o elemento de resposta a auxina AuxRE similar aos encontrados em plantas superiores, o sítio de ligação RpoN, e uma repetição invertida responsável pela indução do gene *ipdC* por AIA, ou seja, sequências palindrômicas responsáveis pelo *feedback* positivo (VAN DE BROEK *et al.*, 2005).

O AIA é uma auxina, um fitohormônio que está envolvido na coordenação do crescimento e desenvolvimento da planta. Essa substância afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares, sendo conhecida por estimular tanto respostas rápidas (aumento da alongação celular) como respostas lentas (divisão e diferenciação celular) nas plantas (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

O efeito estimulador do AIA produzido por *Azospirillum* sp. foi demonstrado por comparação das respostas fisiológicas de plantas de trigo de inverno (*Triticum aestivum* cv. Soissons) inoculadas com estirpes selvagens, mutantes de *Azospirillum* com produção de AIA drasticamente reduzida (*ipdC-knockout*) e cepas alteradas na produção de auxina. A inoculação com a estirpe

selvagem resultou na diminuição no comprimento da raiz, mas no aumento no comprimento e densidade dos pelos radiculares, enquanto que a inoculação com o mutante não causou essas alterações morfológicas em ensaios de placas, fornecendo evidências diretas do papel da produção de AIA (DOBBELAERE *et al.*, 1999; SPAEPEN *et al.*, 2008).

2.5 Fixação biológica de Nitrogênio e Assimilação de íons amônio em *Azospirillum* sp.

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do dinitrogênio gasoso a amônio, catalisado pelo complexo enzimático denominado nitrogenase, conforme esquematizado na reação a seguir:

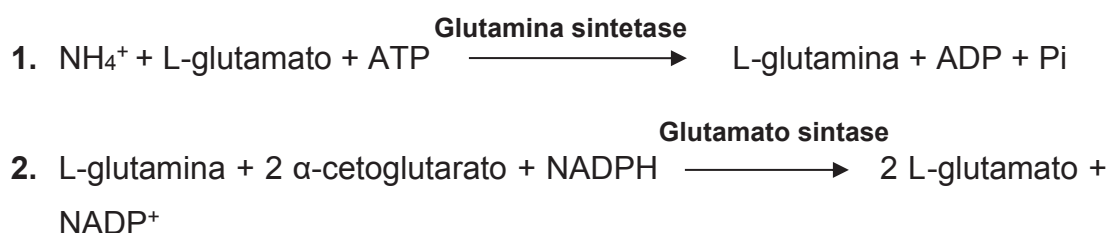


O complexo da nitrogenase é composto de duas metaloproteínas: a proteína dinitrogenase (proteína *MoFe*, *NifDK*), que contém um cofator de ferro-molibdênio que é o local de redução de N_2 ; e a proteína da dinitrogenase redutase (proteína *Fe*, *NifH*) que transfere os elétrons de um doador de elétrons para a proteína *NifDK* (BURRIS e ROBERTS, 1993). Como a redução do N_2 catalisada por estas enzimas, *NifH* e *NifDK*, requer grandes quantidades de energia metabólica, esse processo é altamente regulado tanto ao nível pós-traducional quanto na expressão de seus genes (POSTGATE, 1982). Os níveis de oxigênio celular e nitrogênio são os dois principais sinais ambientais que regulam a nitrogenase em proteobactérias (DIXON e KAHN, 2004). Essa regulação é necessária, porque os grupos metálicos da nitrogenase são sensíveis ao oxigênio e a regulação pelo nitrogênio garante que o processo da FBN ocorra somente quando necessário para alimentar as reações biossintéticas com o nitrogênio fixado (HUERGO *et al.*, 2013).

A transcrição dos genes de fixação de nitrogênio (*nif*) em proteobactérias diazotróficas geralmente é ativada pela proteína *NifA* (DIXON e KAHN, 2004). Em *A. brasilense*, a regulação transcricional envolve o controle da síntese e atividade de *NifA* por oxigênio e amônia (ARSENE *et al.*, 1996; FADEL-PICHETH *et al.*, 1999; ARAUJO *et al.*, 2004). A regulação pós-traducional, por sua vez,

envolve inativação da nitrogenase pela ADPribosilação reversível da proteína Fe, NifH. Essa reação é catalisada pela dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT, produto do gene *draT*) em condições de altos níveis de amônio ou depleção de energia (FU *et al.*, 1989). Quando o amônio é consumido ou os níveis de energia são recompostos, ocorre a reativação da nitrogenase, por meio da remoção dos grupos de ADP-ribosil pela glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase (DraG, produto do gene *draG*) (MOURE *et al.*, 2013). Esse mecanismo de regulação pós-traducional da nitrogenase é denominado desligamento e religamento (*switch-off/switch-on*) da nitrogenase em resposta aos níveis de amônio (ZUMFT e CASTILLO, 1978).

Os íons amônio obtidos da fixação do nitrogênio ou do meio ambiente são assimilados por duas vias em *A. brasilense*: uma envolvendo a ação sequencial das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) e outra envolvendo a glutamato desidrogenase (GDH) (OKON *et al.*, 1976; GAUTHIER e ELMERICH, 1977; PELANDA *et al.*, 1993). A via GS - GOGAT é a principal rota para a assimilação de amônio em células de *A. brasilense* que independe da fonte de nitrogênio utilizada para crescimento (WESTBY *et al.*, 1987). Nesta via, glutamato e amônio são convertidos em glutamina pela glutamina sintetase (GS). A glutamina então doa o grupamento amino para 2-oxoglutarato produzindo duas moléculas de glutamato em uma reação catalisada pela glutamato sintase (GOGAT) (MEERS *et al.*, 1970; ELMERICH e AUBERT, 1971), conforme mostram as reações abaixo:



Como mostrado acima, a glutamina sintetase é essencial para a assimilação do amônio e biossíntese de glutamina durante a fixação biológica de nitrogênio. Em *A. brasilense* a glutamina sintetase faz parte do grupo GSI, que compreende enzimas dodecâmeras com subunidades idênticas ($\cong 55$ kDa) (BOZOUKLIAN e ELMERICH, 1986). Esta enzima é codificada pelo gene *glnA* que no genoma de *A. brasilense* faz parte do operon bicistrônico *glnBA*. A

expressão deste operon é regulado por três promotores: dois localizados a montante do operon, *glnBp1* e *glnBp2*, e o terceiro promotor ainda não identificado na região intergênica *glnBA*, *glnAp* (ZAMAROCZY *et al.*, 1990;1993). Em condições limitantes de amônio, o operon *glnBA* é altamente co-transcrito a partir do promotor *glnBp2*, dependente do fator $\sigma 54$ e ativado pela proteína NtrC-P. Por sua vez, em condições de excesso de amônio, *glnBA* é transcrito a um nível mais baixo a partir do promotor *glnBp1* dependente do fator $\sigma 70$ (ZAMAROCZY *et al.*, 1990; 1993).

A atividade da GS em muitas bactérias, incluindo *Azospirillum brasilense*, é regulada a nível pós-traducional, em resposta ao estado de nitrogênio intracelular, por adenililação reversível de um resíduo de tirosina localizada na região terminal (MERRICK e EDWARDS, 1995). Em condições limitantes de nitrogênio, a GS é mantida na sua forma ativa (não adenililada ou ligeiramente adenililada); já em altas concentrações de nitrogênio (altas concentrações de amônia), a GS é inativada progressivamente, e o seu grau de atividade diminui conforme aumenta a quantidade de subunidades adenililadas (SEGAL e STADTMAN, 1972; PIROLA *et al.*, 1992).

2.6 Mutantes excretores de amônio de *Azospirillum brasilense*

A transferência do nitrogênio biologicamente fixado por bactérias associativas, como as do gênero *Azospirillum*, para a planta hospedeira não é tão eficiente quanto a simbiose em leguminosas. Assim, buscando aumentar o fornecimento do nitrogênio fixado para a planta associada, mutantes excretores de amônio de *Azospirillum brasilense* foram isolados por resistência a etilenodiamina (EDA) (MACHADO *et al.*, 1991; SRIVASTAVA e TRIPATHI, 2006). EDA é um composto análogo ao amônio, e que quando incorporado a glutamato pela enzima glutamina sintetase forma aminoetilglutamina, um composto aparentemente tóxico a célula (ROWELL *et al.*, 1985). Dessa maneira, a triagem para a resistência a EDA permite selecionar mutantes com atividade glutamina sintetase modificada, evitando assim o acúmulo do metabólito tóxico (SRIVASTAVA e TRIPATHI, 2006).

Machado *et al.* (1991) isolaram quatro mutantes espontâneos resistentes ao EDA (HM014, HM026, HM210 e HM053) derivados da estirpe FP2. Esses mutantes são capazes de excretar amônio e de fixar nitrogênio constitutivamente mesmo na presença de altas concentrações de amônio (fenótipo Nif^C). Os mutantes da série HM são prototróficos para glutamina e o amônio excretado é o produto do nitrogênio fixado. Isto foi confirmado, pois a excreção do NH₄⁺ pode ser transitoriamente abolida se houver a substituição do N₂ pelo gás argônio (MACHADO *et al.*, 1991). Os mutantes da série HM apresentaram atividade da glutamato sintase e glutamato desidrogenase similar à estirpe selvagem FP2. Por outro lado, apresentaram atividade baixa da glutamina sintetase o que poderia levar a uma deficiência de assimilação de NH₄⁺ e explicar sua capacidade em excretar o excesso de amônio derivado do nitrogênio fixado (MACHADO *et al.*, 1991).

O fenótipo observado nos mutantes excretores de amônio pode ser resultante de mutações em diversos genes (MACHADO *et al.*, 1991), mas frequentemente estão presentes em regiões do gene *glnA* (codifica para a GS), que são os sítios de ligação ao amônio (SRIVASTAVA e TRIPATHI, 2006). Isto, foi reforçado, com o sequenciamento do gene *glnA* dos quatro mutantes HM. Nesses mutantes foram identificadas mutações pontuais no gene *glnA*, que ocasionaram a troca de aminoácidos na enzima glutamina sintetase, o que provavelmente comprometeu a atividade biossintética da GS (HAUER, 2012).

Experimentos de promoção de crescimento vegetal foram realizados com mutantes excretores de amônio, como no trabalho Van Dommelen *et al.* (2009) e Santos *et al.* (2016), em trigo, e Pankievicz *et al.* (2015), em *Setaria viridis*. Nesses experimentos as plantas inoculadas com as estirpes mutantes apresentaram melhor desenvolvimento quando comparadas com as plantas inoculadas com a estirpe selvagem. Diante do exposto, um dos objetivos gerais desta tese foi isolar novos mutantes de *Azospirillum* spp. excretores de amônio a fim de explorar seu potencial biotecnológico como biofertilizante.

2.7 Interação planta-bactéria

2.7.1 Nichos de colonização de PGPRs diazotróficas associativas

As PGPRs diazotróficas associativas podem ser classificadas de acordo com os nichos de colonização em: 1) epifíticas quando colonizam o rizoplane (superfície da raiz), principalmente os pelos radiculares, zona de alongação e regiões de fissuras nas raízes laterais. 2) endofíticas quando são capazes também de colonizar o interior do vegetal, vivendo nos tecidos internos da planta e nos espaços intercelulares (JAMES, 2000; ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2012).

De maneira geral, as bactérias endofíticas podem penetrar as plantas através de diferentes pontos de entrada: como feridas de tecidos, rachaduras radiculares, radículas germinantes, aberturas naturais como estômatos e lenticelas, e também nos pontos de emergências de raízes laterais ou células ciliadas da raiz (SANTOYO *et al.*, 2016). Ao penetrar na raiz estas bactérias diazotróficas exploram os tecidos dentro da raiz, como o córtex e estelo, vivendo em espaços intercelulares e dentro dos vasos do xilema, como por exemplo, *Gluconacetobacter diazotrophicus* em cana de açúcar (JAMES *et al.*, 1994), *Azoarcus* sp. BH72 em arroz (HUREK *et al.*, 1994); *H. seropedicae* em cana de açúcar (JAMES e OLIVARES, 1998) e no arroz (JAMES *et al.*, 2002) e *Azospirillum* sp. em trigo (SCHLOTTER e HARTMANN, 1998).

Para *A. brasilense* foram relatadas estirpes com comportamento epifítico e endofítico. A estirpe Sp245, por exemplo, foi capaz de colonizar o interior do tecido do trigo sendo considerada endofítica. Esta estirpe foi encontrada nas raízes de trigo esterilizadas superficialmente (BALDANI *et al.*, 1986) além de ser encontrada no xilema de trigo (SCHLOTTER *et al.*, 1994). Utilizando genes repórter SCHLOTTER e HARTMANN (1998) mostraram que a estirpe Sp245 colonizou o interior dos pêlos radiculares, contudo, as estirpes Sp7 e Wa3 foram restritas a zona dos pêlos radiculares. No entanto, um trabalho mais recente de SCHENBERGER *et al.* (2017) mostrou que a estirpe FP2 e a estirpe mutante excretora de amônio HM053 – derivadas da estirpe Sp7 – conseguiram colonizar e expressar nitrogenase na superfície radicular e no interior dos pêlos radiculares de cevada, o que evidencia endofitismo nestas estirpes. PEREG GERK *et al.*

(2000) utilizando o gene repórter *lacZ* mostraram que os locais de colonização primária das estirpes Sp7 e Sp245 são os locais de emergências de raízes laterais e a zona pilífera radicular.

2.7.2 Fatores moleculares envolvidos na colonização de plantas por PGPRs

A colonização de plantas por PGPRs diazotróficas associativas ocorre de maneira coordenada, tendo como evento inicial atração química da bactéria por sinais moleculares excretados pela planta e denominados exsudatos. Posteriormente à migração bacteriana ocorre a adesão desses microrganismos na superfície da raiz através de polissacarídeos de superfície celular, como lipopolissacarídeos (LPS) e exopolissacarídeos (EPS). Neste ponto, se dá o reconhecimento apropriado que determina se a bactéria é ou não patogênica e este processo depende de sinais liberados pelas bactérias que são reconhecidos pelas plantas (CARVALHO *et al.*, 2016).

A primeira comunicação na interação PGPRs-planta inicia-se com a quimiotaxia positiva das bactérias em direção aos exsudatos radiculares. Exsudatos contêm diferentes compostos orgânicos como flavonóides, ácidos fenólicos, ácidos orgânicos e voláteis entre outros que regulam as interações raiz/microbiota e expressão de genes microbianos (VENTURI e KELL, 2016). As PGPRs exibem quimiotaxia positiva a diferentes compostos orgânicos, que varia de acordo com a capacidade metabólica de cada bactéria, uma vez que estes compostos são utilizados como fontes de carbono e energia. Por exemplo, a bactéria *Pseudomonas fluorescens* apresenta quimiotaxia positiva em resposta a flavonóides (DE WEERT *et al.*, 2002). Bactérias do gênero *Azospirillum* são atraídas por uma variedade de compostos: ácidos, açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos (REINHOLD *et al.*, 1985; BARAK *et al.*, 1983; ZHULIN e ARMITAGE, 1993; LOPEZ DE VICTORIA e LOVELL, 1993; HEINRICH e HESS, 1985).

Além da quimiotaxia, a motilidade também é importante para a colonização de raízes. As PGPRs diazotróficas associativas podem apresentar flagelos polares únicos, usados principalmente para a natação, e/ou múltiplos flagelos laterais, que permitem que a bactéria se prolifere sobre uma superfície sólida (CARVALHO *et al.*, 2016). Um mutante de *Azoarcus* sp. que não possui

flagelina, principal componente do flagelo bacteriano, mostrou colonização endofítica da raiz significativamente reduzida (BUSCHART *et al.*, 2012). Croes *et al.*, (1993) mostraram que a perda dos flagelos polares por calor ou tratamento ácido aboliu a capacidade de células de *A. brasilense* de adsorver às raízes de trigo. Além disso, estes mesmos autores mostraram que os flagelos polares purificados se ligam à raiz de trigo, enquanto que os flagelos laterais não possuem esta capacidade (CROES *et al.*, 1993). A deleção dos genes *flmA* (epimerase-desidratase) e *flmB* (aminotransferase) – envolvidos na biossíntese da flagelina do flagelo polar - na estirpe Cd de *A. brasilense* resultou em células não-móveis e perderam a capacidade de células de *A. brasilense* de se adsorverem às raízes de milho (ROSSI *et al.*, 2016).

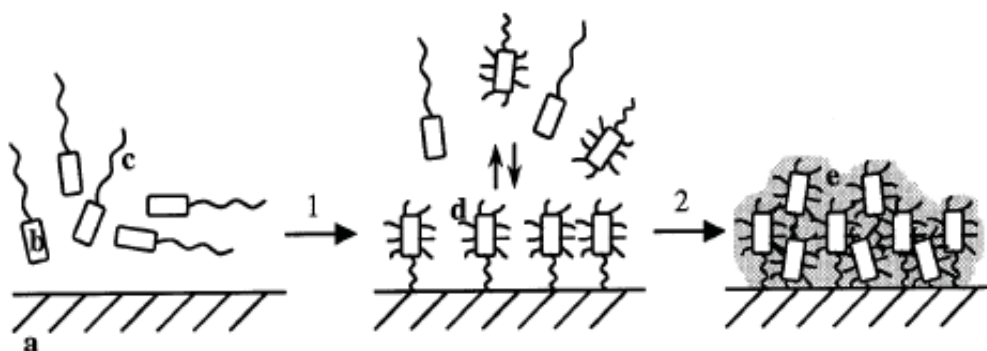
O LPS também mostrou ser necessário para o processo de colonização bacteriana. Balsanelli *et al.*, (2010) realizaram a deleção de dois genes que estão envolvidos na biossíntese de um dos componentes de LPS, a ramnose: *rfbB* (dTDP-D-glucose 3,5-epimerase) e *rfbC* (dTDP-4ceto-L-ramnose redutase) na estirpe SmR1 de *H. seropedicae*. A deleção dos genes *rfb* alterou de maneira drástica a estrutura do LPS das estirpes e, como consequência, reduziu em 100 vezes a capacidade desses mutantes aderirem a superfície das raízes e colonizarem endofiticamente raízes de milho quando comparadas à estirpe selvagem. Um mutante de *A. brasilense* com deficiência na biossíntese de dTDP-ramnose também teve a estrutura de núcleo do LPS modificada reduzindo também a sua capacidade de colonização da raiz de milho (JOFRE *et al.*, 2004).

A produção de EPS é necessária para colonização por PGPRs e também para a formação de biofilme (CARVALHO *et al.*, 2016). Um mutante de *G. diazotrophicus*, deficiente na produção de EPS, foi incapaz de formar biofilme, e também de aderir a superfície de raízes de arroz e realizar colonização endofítica (MENEZES *et al.*, 2011). O gene *noeL* (GDP-manose 4,6-desidratase) de *A. brasilense* Sp7 foi relacionado à biossíntese de EPS. A interrupção de *noeL* afetou a capacidade da estirpe Sp7 de formar biofilme em vidro (LERNER *et al.*, 2009).

Um modelo da colonização das raízes das plantas por *Azospirillum*, foi proposto por STEENHOUDT e VANDERLEYDEN (2000): a primeira etapa na colonização da raiz por *A. brasilense* é denominada de adsorção, onde as células de *A. brasilense* adsorvem nas raízes como células individuais de forma rápida,

fraca e reversível. Nessa etapa a bactéria utiliza o flagelo polar para se ligar a raiz da planta. Em seguida, ocorre a segunda fase de adesão denominada ancoragem, caracterizada pela formação de agregados bacterianos e aderência firme e irreversível à superfície radicular, a qual foi associada a produção de EPS por *A. brasilense* (figura 2).

FIGURA 2 - ETAPAS DE COLONIZAÇÃO POR *A. brasilense*.



Os números representam: 1) etapa de adsorção; 2) etapa de ancoragem. As letras representam: a) superfície da raiz da planta; b) *A. brasilense*; c) flagelo polar; d) flagelo lateral; e) exopolissacarídeos (EPS)

FONTE: Steenhoudt e Vanderleyden (2000)

Assim, essas propriedades da superfície de *Azospirillum* são importantes no processo de colonização das raízes (PEREG *et al.*, 2016). As células *A. brasilense* possuem ainda capacidade de agregação e floculação, e estes fenômenos têm sido correlacionados com a produção de EPS (BIBLE *et al.*, 2008). A agregação e floculação de células de *Azospirillum* spp. ocorre sob condições nutricionalmente estressantes, como alta relação C:N e crescimento em alta aeração (BIBLE *et al.*, 2008). Durante a floculação as células vegetativas produzem uma camada externa de polissacarídeos, diferenciando-se para formas encapsuladas não móveis, denominadas “cisto-like” e acumulam grânulos de poli- β -hidroxibutirato intracelular (PHB) (SADASIVAN e NEYRA, 1987). Esses grânulos de PHB são fonte de carbono que favorece a sobrevivência e competitividade das células de *Azospirillum* spp. em condições de desbalanço de nutrientes e energia (SADASIVAN e NEYRA, 1987; BAHAT-SAMET *et al.*, 2004). Por isso, os fenômenos de agregação e floculação são de grande interesse na produção inoculantes bacterianos para as plantas.

A floculação das células de *A. brasilense* é controlada pelo gene regulador de resposta, *flcA*, tanto em cultura como em associação com plantas (PEREG GERK *et al.*, 1998). Mutantes *flcA* de *A. brasilense* não floculam, não se diferenciam de células vegetativas móveis para formas “cisto-like” e carecem de material exopolissacarídico na superfície celular (PEREG GERK *et al.*, 1998; HOU *et al.*, 2014). Além disso, mutantes de *A. brasilense* deficientes em floculação mostram um padrão de colonização de raízes diferente da estirpe selvagem. Enquanto a estirpe selvagem Sp7 coloniza intensamente a superfície de raízes de trigo, mutantes *flcA* foram observados colonizando somente as fendas em volta dos locais de emergência da raiz lateral e a zona pilífera densa perto da ponta da raiz (PEREG GERK *et al.*, 1998; HOU *et al.*, 2014).

Utilizando a abordagem proteômica Hou *et al.* (2014) investigaram proteínas diferencialmente expressas sob condições de floculação em *A. brasilense* Sp7 e seu mutante *knock-out flcA*. As características funcionais dessas proteínas incluíram metabolismo de carboidratos, transformação morfológica, fixação de nitrogênio e tolerância ao estresse, indicando o envolvimento de *flcA* nestes processos.

Em relação ao metabolismo de nitrogênio, a glutamina sintetase (GlnA) foi *up*-regulada no mutante $\Delta flcA$ -Sp7 sugerindo que FlcA possa controlar a assimilação de nitrogênio através da regulação negativa da glutamina sintetase na estirpe selvagem, afetando a concentração de amônio nas células de *Azospirillum* (HOU *et al.*, 2014). *narL* foi *down*-regulado na presença de FlcA em meio com alta relação C:N e quando o nitrato era a única fonte de nitrogênio, sugerindo que FlcA está envolvida na assimilação de nitrato de maneira dependente de NarX-NarL (HOU *et al.*, 2014). NarX-NarL e NarQ-NarP são pares de sistemas reguladores de dois componentes que controlam a expressão do gene de *Escherichia coli* em resposta a nitrato e nitrito. Nitrato estimula a autofosforilação das proteínas sensoras NarX e NarQ, que em seguida fosforilam os reguladores de resposta NarL e NarP, que por sua vez se ligam a locais específicos do DNA para ativar e reprimir a transcrição do operon alvo (RABIN e STEWART, 1992; 1993; LEE *et al.*, 1999).

Um gene homólogo a NarL, NarL1 (também chamado de *narL-like*) também foi “*up*” regulado por FlcA em condições de floculação (HOU *et al.*, 2014). Curiosamente, análise de RNA-Seq, realizada três dias após a

inoculação, mostrou que o gene *narL-like* foi altamente expresso em células de *A. brasilense* FP2 quando associada ao trigo (*Triticum aestivum*) (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014). Nesta análise, além do gene *narL-like*, outros genes foram diferencialmente expressos, mostrando que a interação com trigo causou a expressão elevada de genes de *A. brasilense* que codificam proteínas relacionadas às etapas iniciais da interação planta/bactéria (quimiotaxia, adesão e formação de biofilme), aos processos de adaptação e fixação de nitrogênio (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014), evidenciando os genes candidatos de *A. brasilense* envolvidos na interação desta bactéria com trigo.

Um dos objetivos gerais deste trabalho foi mutagenizar e caracterizar os genes *fliA*, *ipdC* e *narL-like* na estirpe FP2 de *A. brasilense*. A escolha do gene alvo de mutação *narL-like* foi baseada na análise de *RNA-Seq* realizada por Camilios-Neto *et al.* (2014) que mostrou alta expressão desse gene durante a associação *Azospirillum*-trigo. Os genes, *fliA* e *ipdC*, foram escolhidos por serem genes já descritos na literatura como importantes para a interação bactéria-planta. Uma vez que os fatores envolvidos na interação de *Azospirillum*-gramíneas ainda não foram completamente esclarecidos, sua caracterização pode permitir o melhor entendimento do processo interação planta-bactéria.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Este trabalho tem dois objetivos gerais e os resultados estão apresentados em 2 capítulos:

3.1.1 Capítulo 1. Isolamento de mutantes de *Azospirillum* excretores de amônio e efeito da sua inoculação na promoção de crescimento em trigo e milho.

3.1.2 Capítulo 2. Construção de estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 nos genes *flcA*, *ipdC* e *narL-like* e caracterização de seu envolvimento na interação com o trigo.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Capítulo 1:

- Isolar mutantes de *Azospirillum* excretores de amônio através da seleção por resistência à etilenodiamina (EDA);
- Determinar a atividade da nitrogenase dos mutantes isolados;
- Quantificar *in vitro* a capacidade de excretar amônio desses mutantes;
- Identificar as mutações nas estirpes mutantes por sequenciamento genômico;
- Utilizar os mutantes selecionados em ensaios de inoculação em planta para avaliar a promoção de crescimento.

3.2.2 Capítulo 2:

- Caracterizar *in silico* os genes *flcA*, *ipdC* e *narL-like* de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2;
- Mutagenizar os genes *flcA*, *ipdC* e *narL-like* de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2;
- Caracterizar o fenótipo das estirpes mutantes através de ensaios: floculação, ligação ao vermelho congo, atividade nitrogenase, produção de ácido indolacético, adesão e colonização vegetal.

4.0 Capítulo 1: Isolamento de mutantes de *Azospirillum* excretores de amônio e efeito de sua inoculação na promoção de crescimento em milho e trigo.

A contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) por PGPRs diazotróficas associativas na promoção de crescimento de plantas é controverso (PANKIEVICZ *et al.*, 2015), existindo poucos trabalhos que sugerem fortemente a contribuição da FBN para a promoção de crescimento da planta (OKON, 1985; RODRIGUES *et al.*, 2008; FLORES *et al.*, 2010; MORAIS *et al.*, 2012). No entanto, recentemente em plantas de trigo e *Setaria viridis* inoculadas com um mutante excretor de amônio de *A. brasilense* (estirpe HM053) houve maior expressão do gene *nifH* e também promoção de crescimento vegetal quando comparadas à plantas inoculadas com a estirpe selvagem FP2 e plantas não inoculadas (SANTOS *et al.*, 2016; PANKIEVICZ *et al.*, 2015). No caso da gramínea modelo *Setaria viridis*, a inoculação do mutante HM053 na planta modelo levou a uma assimilação de 16 vezes mais N derivado da FBN do que a mistura de estirpes selvagens *A. brasilense* (FP2) e *H. seropedicae* (SmR1). A planta inoculada com a estirpe mutante HM053 fixou 12.312 partes por trilhão de N² com base na massa seca de raiz, o que é suficiente para suprir a demanda diária de nitrogênio da planta (PANKIEVICZ *et al.*, 2015).

Assim, visando aumentar a promoção de crescimento vegetal pela FBN, isolamos mutantes de *Azospirillum* spp. resistentes a etilenodiamina, capazes de fixar nitrogênio na presença de altas concentrações de amônio, os quais foram avaliados quanto à capacidade de excretar amônio. Com os mutantes selecionados foram realizados ensaios *in planta*, para verificar o fenótipo de colonização e promoção de crescimento vegetal. Também, foi realizado, o sequenciamento do genoma do mutante excretor de amônia 38 SF0 e da estirpe selvagem SF0, a fim de investigar possíveis mutações, que poderiam explicar o fenótipo excretor de amônio.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Bactérias e meios de cultura

As estirpes de *Azospirillum* spp. utilizadas estão listadas na tabela 1. As estirpes *Azospirillum brasilense* SF0 e *Azospirillum* sp. HAI3 foram escolhidas por apresentarem características importantes na associação bactéria-planta. A estirpe SF0 possui boa capacidade de colonização com habilidade de colonizar não somente à superfície das raízes como também o seu interior (SCHLOTER *et al.*, 1994; SCHLOTER e HARTMANN, 1998). HAI3, isolado da gramínea nativa do Pantanal sul-mato-grossense, produz grandes quantidades do fitohormônio ácido indolacético (AIA) *in vitro* (SOUZA *et al.*, 2017) e é capaz de colonizar o interior das raízes de milho (este estudo).

TABELA 1 - ESTIRPES DE *Azospirillum* UTILIZADAS.

BACTÉRIAS	CARACTERÍSTICAS	FONTE/REFERÊNCIA
<i>Azospirillum brasilense</i> SF0	Variante da estirpe Sp245 isolada de trigo que apresenta resistência a Nal e Sm (BALDANI, BALDANI e DÖBEREINER, 1983)	FUNAYAMA <i>et al.</i> , (1985)
<i>Azospirillum</i> sp. HAI3	Isolada de <i>Hymenachene amplexicaulis</i> (Corumbá-MS)	SOUZA <i>et al.</i> , (2017)

FONTE: O autor (2018)

O meio de cultura utilizado para o crescimento das estirpes de *Azospirillum* spp. foi o meio NFbHP-lactato (MACHADO *et al.*, 1991) que apresenta a composição mostrada no anexo 1.

Como fonte de nitrogênio foram utilizados usualmente 5 mM de glutamato de sódio e 10 mM de NH₄Cl, passando o meio a ser denominado meio NFbHPG ou NFbHPN, respectivamente. Para experimentos onde foram utilizadas diferentes quantidades de NH₄Cl ou glutamato de sódio, as concentrações estão indicadas quando apropriado. O meio apresentou o pH final 6,8.

Para a obtenção dos meios sólido e semi-sólido de NFbHP-lactato, os meios líquidos foram acrescidos de ágar nas concentrações de 15 g/L e 1,75 g/L, respectivamente.

4.1.2 Isolamento de mutantes de *Azospirillum* excretores de amônio por resistência a etilenodiamina

Os mutantes foram isolados a partir da estirpe parental SF0 e do isolado HAI3. Culturas de *Azospirillum* spp. cultivadas em meio NFbHPN-lactato líquido foram plaqueadas em meio sólido NFbHPG-lactato (MACHADO *et al.*, 1991) contendo diferentes concentrações de EDA (0,01% a 0,5%) e incubadas a 30 °C por 4 - 7 dias. Como controle foi utilizado uma placa contendo meio de cultura sem EDA.

Colônias resistentes foram purificadas e testadas quanto a capacidade de fixar nitrogênio por redução de acetileno em meio semi-sólido NFbHP-lactato contendo altas concentrações de NH₄Cl (10 mM).

4.1.3 Determinação da atividade nitrogenase constitutiva

A avaliação da capacidade de fixação biológica de nitrogênio constitutiva das colônias mutantes resistentes à etilenodiamina (EDA) foi realizada através de ensaios de redução de acetileno. As bactérias foram cultivadas em meio líquido NFbHPN-lactato (MACHADO *et al.*, 1991) e então incubadas a 30°C num agitador orbital por 24 - 48h (pré-inóculo e inóculo definitivo). Em seguida 20 µL das culturas crescidas foram testadas quanto a redução de acetileno em meio semi-sólido NFbHP-lactato (MACHADO *et al.*, 1991) suplementado com 10 mM de NH₄Cl. Como controle as culturas crescidas de cada colônia também foram inoculadas em meio semi-sólido mínimo NFbHP-lactato acrescido de 0,5 mM de glutamato de sódio. Juntamente com o teste de redução de acetileno dos isolados a estirpe selvagem e o mutante Nif^c HM053 foram utilizadas como controle.

O ensaio de redução de acetileno foi realizado através da medição da produção de etileno expressa em nmol de etileno/min, utilizando um cromatógrafo Varian Star 3400 CX equipado com um detector de ionização de chama e coluna Porapak N.

4.1.4 Avaliação da capacidade de excretar amônia dos mutantes Nif constitutivos pelo método de indofenol

Culturas frescas em meio NFbHPN-lactato dos mutantes Nif-constitutivos originados da estirpe SF0 (27 mutantes) e do isolado HAI3 (13 mutantes) foram inoculadas, em triplicata, em meio semi-sólido NFbHPN-lactato, a partir de uma cultura com DO_{600nm} de 1. Após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de incubação a 30°C, 200 microlitros do meio (2 a 5 mm abaixo da superfície da película) foi coletado e centrifugado em uma mini-centrifuga do tipo *minispin* da Eppendorf® a 10.000 rpm por 5 min. O amônio na solução sobrenadante foi determinado pelo método de indofenol (CHANEY e MARBACH, 1962).

4.1.5 Ensaios *in planta*

4.1.5.1 Ensaio de colonização

A capacidade das estirpes de *Azospirillum* spp. (SF0, 38SF0, 39SF0 e HAI3) colonizar as raízes de milho foi determinada pela contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama fresca de raiz como descrito por Balsanelli *et al.*, (2014). Aproximadamente 30 min após a inoculação foi determinado o número de células aderidas. O número de células epifíticas e endofíticas foi determinado em 1, 3 e 7 dias após a inoculação.

4.1.5.2 Ensaio de promoção de crescimento em milho cultivado em sistema hidropônico

Para os ensaios de promoção de crescimento foram utilizados os cultivares de milho 2B512 e 30A37 responsivo e não responsivo à inoculação de sementes com *Azospirillum* em experimentos de campo, respectivamente. As sementes de milho dos cultivares 30A37 e 2B512 foram esterilizadas superficialmente e germinadas em placas agar-água (0,8%) por dois dias a 28 °C como descrito por Balsanelli *et al.*, (2014). As plântulas foram transferidas para tubos estéreis (v = 100mL) contendo 25 mL de meio para gramíneas (EGENER *et al.*, 1999) sem fonte de carbono e 10g de pérolas de polipropileno (sistema hidropônico). As plântulas foram então inoculadas com 0,1 mL de suspensão de bactérias contendo 10⁷ células/mL das estirpes SF0 e 38 SF0 de *A. brasilense* e cultivadas a 28°C com período de luz de 12h e 1250 lux.

Sete dias após a inoculação foram avaliados o peso seco e a morfometria das raízes. Para a análise da morfometria, as raízes foram submetidas a um scanner de leitura ótica, e tiveram suas imagens digitalizadas e analisadas pelo programa WinRhizo versão 3.8. Os parâmetros morfométricos avaliados foram: superfície da raiz (cm²), comprimento total da raiz (cm), volume de raiz (cm³) e comprimento da raiz lateral com diâmetro ≥ 0 e $\leq 0,5$ (cm). O número de células epifíticas por grama de raiz foi avaliado sete dias após a inoculação por citometria de fluxo (VALDAMERI *et al.*, 2015). Na análise estatística utilizou-se o teste t de Student de acordo com a distribuição das amostras. Foram utilizadas 20 plantas por condição (N = 20).

4.1.5.3 Ensaio de promoção de crescimento em trigo

As sementes de *T. aestivum* (CD-104 cv.) foram esterilizadas superficialmente e germinadas em placas agar-água (0,8%) durante dois dias no escuro a 30 °C como descrito por Camilios Neto *et al.*, (2014). As plântulas foram plantadas em vasos (vol. = 8L) contendo uma mistura estéril de areia de quartzo e vermiculita (3:1). Para a inoculação as culturas de *A. brasilense* (SF0, 38SF0 e 39SF0) foram cultivadas em meio NFbHPN-lactato até atingir uma DO=1 ($\sim 10^8$ células/mL). As células foram então lavadas com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND, 1950) e diluídas 100 vezes na mesma solução. Cada plântula foi então inoculada com 1 mL da suspensão diluída (contendo 10^6 UFC mL⁻¹). As plântulas foram regadas com solução Hoangland contendo baixo teor de nitrogênio (0,5 mM de KNO₃), e no tempo subsequente foram regadas duas vezes por semana com a mesma solução nutritiva sem adição de nitrogênio. O ensaio da planta foi conduzido em uma câmara de crescimento a 28°C com período de luz de 16h durante 32 dias após a inoculação (D.A.I). Após esse período, as plantas foram colhidas e os parâmetros de morfometria da raiz, altura da planta, peso seco das raízes e da parte aérea foram medidos. Os seguintes parâmetros de morfometria da raiz foram analisados por meio de um Scanner de leitura ótica utilizando o software da WinRhizo versão 3.8: superfície da raiz (cm²), comprimento total da raiz (cm), volume de raiz (cm³) e comprimento da raiz lateral com diâmetro ≥ 0 e $\leq 0,5$ (cm). As análises estatísticas foram

avaliadas pelo teste t de Student de acordo com a distribuição das amostras. Foram utilizadas 15 plantas por condição (N = 15).

4.1.6 Análise genômica

4.1.6.1 Sequenciamento, montagem e anotação dos genomas de *Azospirillum* spp

Azospirillum spp. foram cultivados em meio líquido NFbHPN- lactato (MACHADO *et al.*, 1991). O DNA foi purificado de 10^9 células utilizando o protocolo de extração fenol-clorofórmio (PEDROSA *et. al.*, 2011). Um ng de DNA total foi utilizado na construção da biblioteca de DNA usando o Kit Nextera XT para o sequenciamento na plataforma Illumina®. *Pair-end reads* (2 x 250 bases) foram sequenciados com o Kit *MiSeq Reagent 500v2* (Illumina®) na plataforma Miseq (Illumina®).

Os genomas das estirpes de *Azospirillum* (38SF0, SF0 e HAI3) foram montados utilizando a plataforma CLC Genomics Workbench 6.0. Os arquivos fastq foram submetidos à ferramenta ‘*De novo Assembly*’ presentes na plataforma, onde o parâmetro ‘*word size*’ (que equivale a ‘K-mers’ utilizado nos grafos de Bruijn) foi marcado como 25, enquanto que os demais parâmetros foram utilizados com valores padrão do programa (CARDOSO, 2015). A anotação dos genomas foi realizada com a plataforma RAST 2.0 (AZIZ *et al.*, 2008).

4.1.6.2 Average Nucleotide Identity - ANI

O genoma da estirpe SF0 de *Azospirillum brasilense* e do isolado HAI3 foram comparados frente a todas as espécies de *Azospirillum* depositadas no NCBI (*National Center of Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com genoma completo utilizando a calculadora ANI (*Average Nucleotide Identity*).

4.1.6.3 Comparação 38SF0 vs SF0

Os *reads* da estirpe excretora de amônia 38SF0 foram mapeados contra os *reads* da estirpe selvagem SF0 utilizando a plataforma CLC Genomics Workbench 6.0. O arquivo do sequenciamento em formato fastq da estirpe mutante foi mapeado contra os contigs em formato fasta da estirpe selvagem. Os parâmetros para o mapeamento foram 0,8 de similaridade do *read* em relação à referência e 0,5 de tamanho de *read* alinhado em relação à referência (CARDOSO, 2015).

4.1.7 Análise bioinformática da sequência da enzima Glutamina sintetase

As sequências da enzima glutamina sintetase foram alinhadas utilizando o programa Clustal Ômega versão 1.2.4 (SIEVERS *et al.*, 2011). O modelo estrutural da glutamina sintetase foi obtido no programa SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) e possíveis alterações estruturais decorrentes das mutações foram analisadas utilizando o programa PyMOL (www.pymol.org).

4.2 Resultados

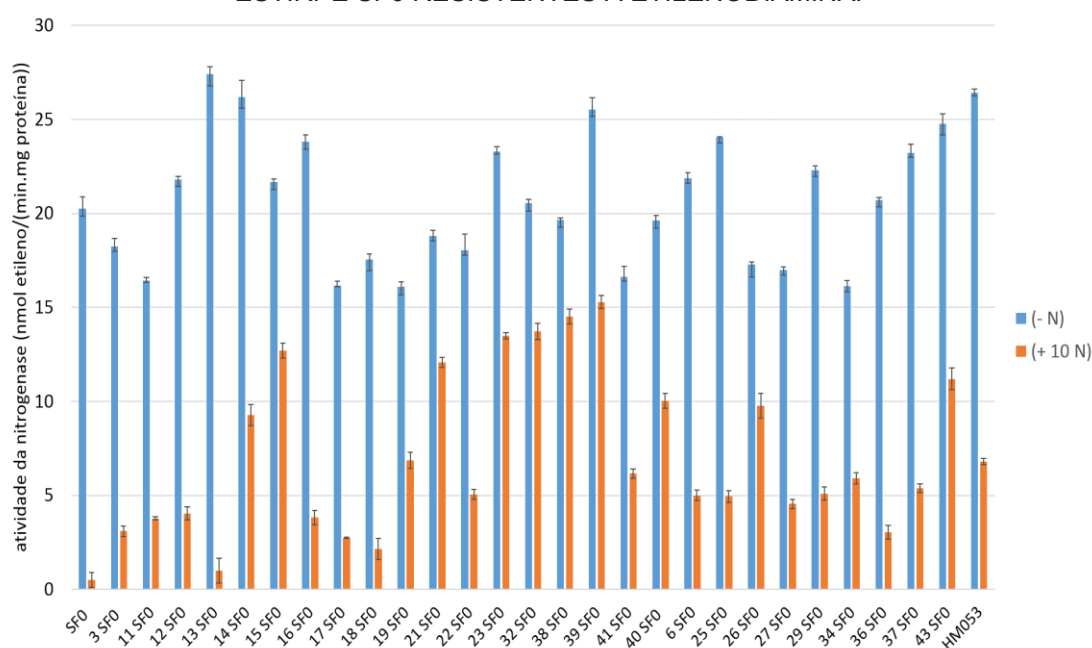
4.2.1 Isolamento de mutantes de *Azospirillum* spp. resistentes à etilenodiamina e avaliação da fixação biológica de nitrogênio dos isolados pela Redução de Acetileno

Culturas crescidas até uma DO=1 (10^8 células/mL) foram plaqueadas em meio de NFbHPG-lactato contendo diferentes concentrações de etilenodiamina (EDA) (0,01% a 0,5%). Foi possível obter colônias resistentes à EDA da estirpe SF0 e do isolado HAI3 nas placas contendo 0,02, 0,03 e 0,04 % de EDA e 0,02 e 0,03 % de EDA, respectivamente. Noventa colônias de SF0 e cinquenta colônias do isolado HAI3 foram escolhidas ao acaso, purificadas em meio NFbHPG sólido contendo 0,02% de EDA.

Para determinar se os mutantes de *Azospirillum* spp. isolados eram capazes de fixar nitrogênio constitutivamente foi utilizado o método de redução de acetileno. Das 90 colônias mutantes de SF0 obtidas foram selecionadas 27 que tiveram no mínimo o dobro da produção de etileno (expressa em nmol etileno/min) da estirpe selvagem sob condições de alta concentração de NH_4Cl (10 mM). Estas estirpes foram consideradas Nif constitutivas (Nif^c). As estirpes

que apresentaram os maiores níveis de atividade da nitrogenase na presença de 10 mM de NH_4Cl foram: 39SF0, 38SF0 e 32SF0. Já para o isolado MAY1, de 50 colônias mutantes foram selecionadas 13 Nif^c . As estirpes com maiores níveis de atividade da nitrogenase foram: 26HAI3, 38HAI3 e 37HAI3. A atividade nitrogenase expressa em nanomoles de etileno/(min.mg de proteína) das estirpes de SF0 e de HAI3 selecionadas estão mostradas nos gráficos 1 e 2, respectivamente. Como esperado, na presença de altas concentrações de amônio (NH_4^+) as estirpes, SF0 e HAI3, não fixam nitrogênio (gráficos 1 e 2).

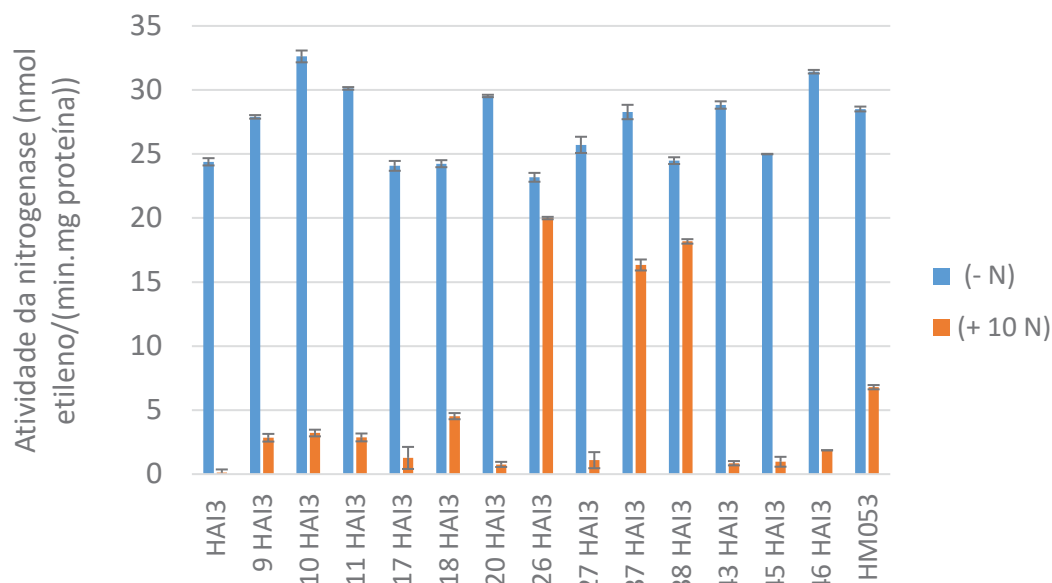
GRÁFICO 1 - ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS MUTANTES DE *Azospirillum brasilense* ESTIRPE SF0 RESISTENTES À ETILENODIAMINA.



Células de *Azospirillum* sp. foram cultivadas a 30° C em meio semi-sólido NFb-HP lactato contendo 0,5 mM de glutamato (- N) e 10 mM de NH_4Cl (+10 N).

FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 2 - ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS MUTANTES DE *Azospirillum* sp. isolado HAI3 RESISTENTES À ETILENODIAMINA.



Células de *Azospirillum* sp. foram cultivadas a 30° C em meio semi-sólido NFb-HP lactato contendo 0,5 mM de glutamato (- N) e 10 mM de NH₄Cl (+10 N).

FONTE: O autor (2018)

4.2.2 Excreção de íons NH₄⁺ (amônio)

Os mutantes Nif constitutivos selecionados foram avaliados quanto à capacidade de excretar íons de amônio pelo método indofenol (CHANEY e MARBACH, 1962). A quantificação foi determinada em 24h, 48h, 72h e 96h após a inoculação. Dos 27 mutantes Nif^C originados da estirpe SF0, somente a 38SF0 apresentou a capacidade de excretar amônio. No entanto, nenhum dos mutantes originados do isolado HAI3 foi capaz de excretar NH₄⁺. O mutante 38SF0 apresentou um pico de excreção de amônio no tempo de 48h, após a inoculação, que foi de aproximadamente 0,5 mM. Já o mutante HM053 (utilizado como controle positivo) obteve um pico de excreção de amônio no tempo de 96h que foi de aproximadamente 2,5 mM (tabela 2).

TABELA 2 - EXCREÇÃO DE AMÔNIO DAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* RESISTENTES À ETILENODIAMINA.

	24h	48h	72h	96h
Estirpe				
SF0	ND	ND	ND	ND
38SF0	0,11 ± 0,03	0,54 ± 0,08	0,28 ± 0,15	0,04 ± 0,00
HM053	0,09 ± 0,01	0,35 ± 0,07	1,15 ± 0,1	2,39 ± 0,13

A capacidade das estirpes de excretar íons de amônio foi avaliada em meio semi-sólido NFbHP-lactato livre de nitrogênio nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h após a inoculação. Os dados são apresentados como mM de NH_4^+ presente no meio e determinado pelo método indofenol. Nota: ND= não detectado

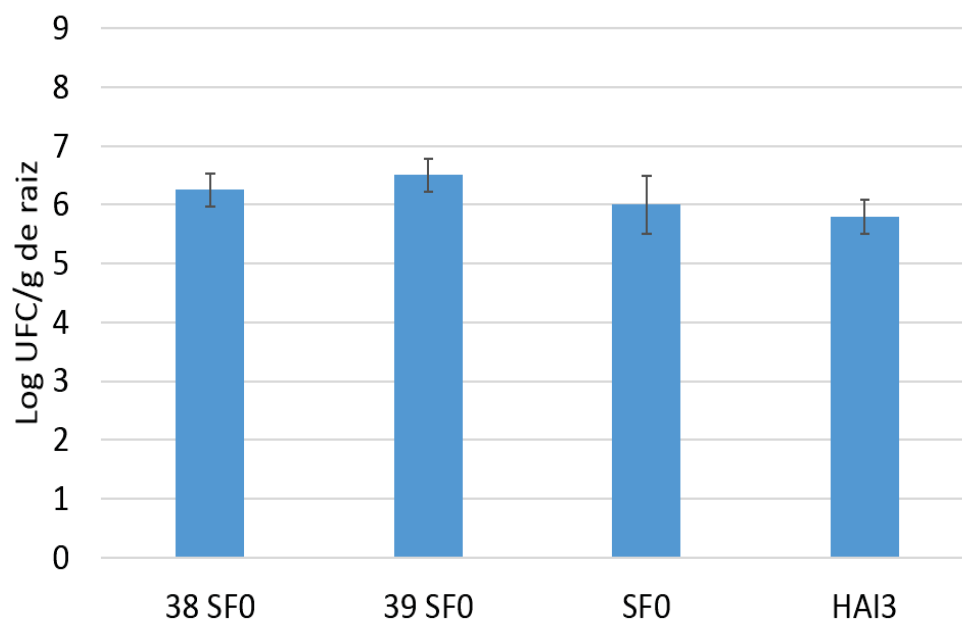
FONTE: O autor (2018)

4.2.3 Colonização de raízes de milho por *Azospirillum* spp.

Os mutantes 38SF0 (Nif^C e excretor de amônio) e 39SF0 (Nif^C) selecionados nos ensaios realizados anteriormente foram avaliados quanto à capacidade de colonização das raízes de milho. A população aderida dos mutantes 38SF0 e 39SF0 foi similar a estirpe selvagem SF0 de *Azospirillum brasilense*, com aproximadamente 10^6 UFC. g de raiz (gráfico 3). A população epifítica e endofítica dos mutantes 38SF0 e 39SF0, ao longo do tempo, também foi similar ao selvagem SF0, apresentando entre 10^6 a 10^7 UFC. g de raiz (gráfico 4). Número similar de células epifíticas, 10^6 UFC. g de raiz, foram obtidas por Bandoín *et al.* (2010) para a estirpe Sp245 inoculada nas raízes de trigo (em 7 e 30 dias após a inoculação).

O isolado HAI3 apresentou o mesmo número células aderidas à superfície das raízes que as outras estirpes testadas (10^6 UFC. g de raiz) (gráfico 3). Já a população epifítica do isolado HAI3 foi maior que a estirpe selvagem SF0 em 1 e 7 D.A.I. ($p \leq 0,05$), e a população endofítica foi similar às outras estirpes ao longo do tempo (gráfico 4). Esses resultados indicam que os mutantes originados da estirpe SF0 (*A. brasilense* Sp245 Sm^R Nal^R) apresentaram capacidade de colonização da superfície e do interior das raízes de milho similar ao da estirpe selvagem e que o isolado HAI3 é capaz de colonizar as raízes endofiticamente.

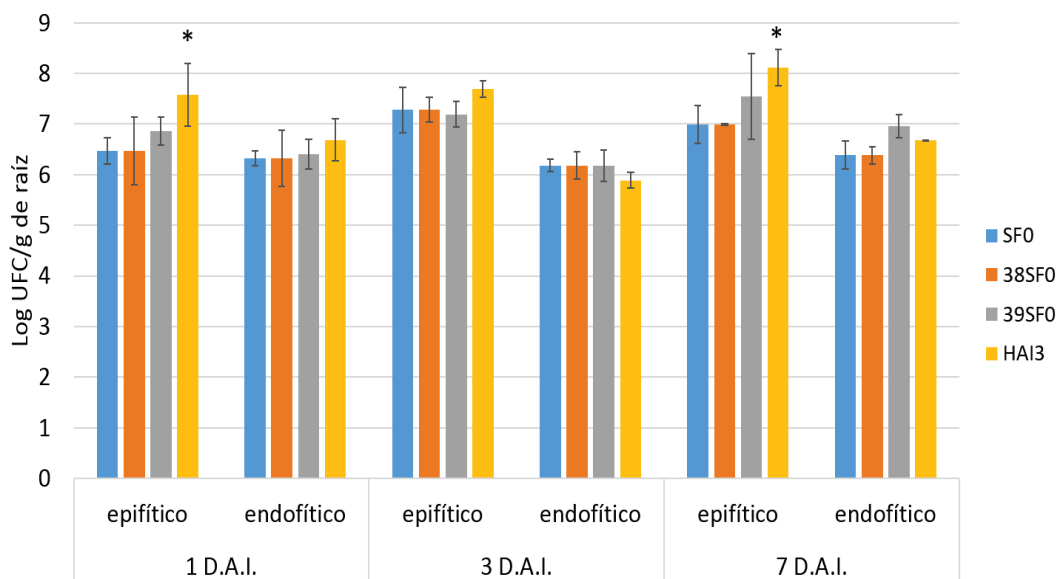
GRÁFICO 3 - POPULAÇÃO DE *Azospirillum* spp. ADERIDA À SUPERFÍCIE DE RAÍZES DE MILHO.



Plântulas de milho foram inoculadas com as estirpes de *Azospirillum* spp. (10^5 células/plântula) e o número de UFC (expresso em log) aderidos à raiz após lavagem foi determinado 30 min após a inoculação.

FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 4 - POPULAÇÃO EPIFÍTICA E ENDOFÍTICA DE RAÍZES DE MILHO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE *Azospirillum* spp.



Plântulas de milho foram inoculadas com as estirpes de *Azospirillum* spp. (10^5 células/plântula) e o número de UFC (expresso em log) epifíticas e endofíticas foi determinado 1, 3 e 7 D.A.I. Diferença significativa pelo teste t ($p \leq 0,05$) é indicado por asterisco. Nota D.A.I.: dias após a inoculação.

FONTE: O autor (2018)

4.2.4 Promoção de crescimento em milho inoculadas com *Azospirillum* sp.

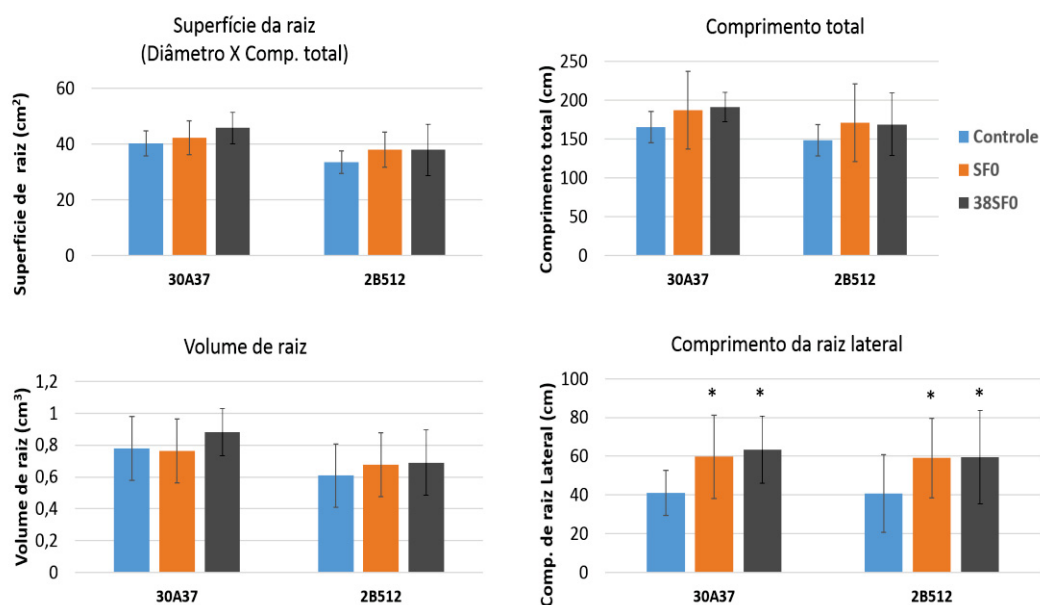
Para investigar se o mutante excretor de amônio 38SF0 poderia promover o crescimento das raízes de milho, o peso seco e a morfometria das raízes foi avaliada e comparada com a estirpe selvagem sete dias após a inoculação (DAI). No cultivar de milho 30A37 inoculado com o mutante 38SF0, foi observado uma tendência no aumento de superfície de raiz, comprimento total de raízes e volume total das raízes quando comparada ao inoculado com a estirpe selvagem (gráfico 5). Esse aumento observado nos parâmetros morfométricos das raízes refletiu significativamente ($p \leq 0,1$) no aumento do peso seco de raízes do cultivar 30A37 inoculado com o mutante 38SF0 quando comparado ao inoculado com a estirpe selvagem SF0 e o não inoculado (gráficos 5 e 6). No entanto, esse aumento significativo não foi observado nos parâmetros

morfométricos e peso seco das raízes do cultivar 2B512 inoculadas com o mutante excretor de amônio 38SF0 (gráficos 5 e 6).

Para ambos os cultivares de milho pode-se observar diferença significativa do comprimento total da raiz lateral nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas (controle) (gráfico 5), o que evidencia que um maior desenvolvimento das raízes laterais foi estimulado pela inoculação de *Azospirillum brasilense*.

Para confirmar se as estirpes colonizaram a raiz de milho foi realizada a contagem do número de células das estirpes SF0 e 38SF0 aderidas a superfície da raiz em 7 dias após a inoculação. A capacidade de colonização de ambas as estirpes foi de aproximadamente 10^6 células epifíticas por grama de raiz (gráfico 7).

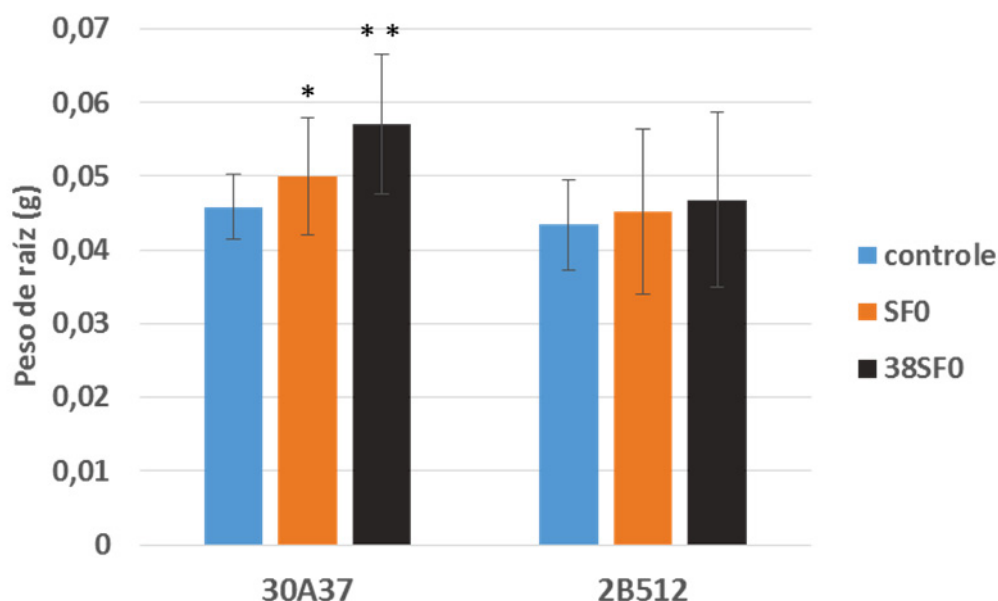
GRÁFICO 5 - PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DE RAÍZES DE MILHO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*



Plântulas dos cultivares 30A37 e 2B512 de milho foram inoculadas com as estirpes de *A. brasilense* (10^7 células/mL) e 7 dias após a inoculação foram determinados os parâmetros morfométricos das raízes. Foram utilizadas 20 replicatas para cada cultivar. Diferença significativa pelo teste t ($p \leq 0,05$) é indicado por asterisco. Nota: Condição controle= não inoculado com bactéria.

FONTE: O autor (2018)

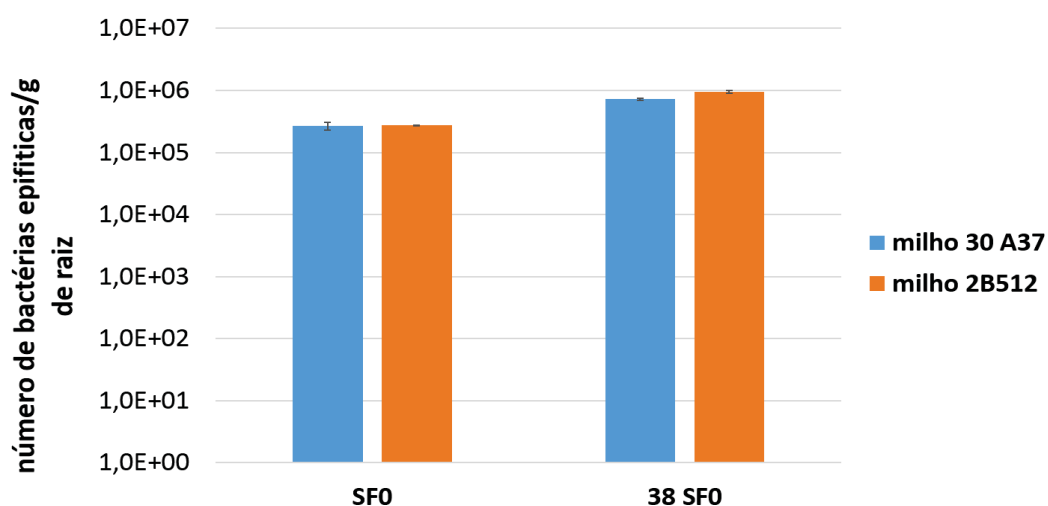
GRÁFICO 6 - PESO SECO DE RAÍZES DOS CULTIVARES DE MILHO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*



Plântulas dos cultivares 30A37 e 2B512 de milho foram inoculadas com as estirpes de *A. brasilense* (10^7 células/mL) e 7 dias após a inoculação o peso seco das raízes foi determinado. Foram utilizadas 20 replicatas para cada cultivar. Diferença significativa pelo teste t ($p \leq 0,1$) é indicado por asterisco. Nota: Condição controle= não inoculado com bactéria.

FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 7 - POPULAÇÃO EPIFÍTICA DE RAÍZES DE MILHO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*



Plântulas cultivares 30A37 e 2B512 de milho foram inoculadas com as estirpes de *A. brasilense* (10^7 células/mL) e 7 dias após a inoculação foi determinado o número de células epifíticas das raízes por citometria de fluxo. Foram utilizadas 3 replicatas de cada cultivar.

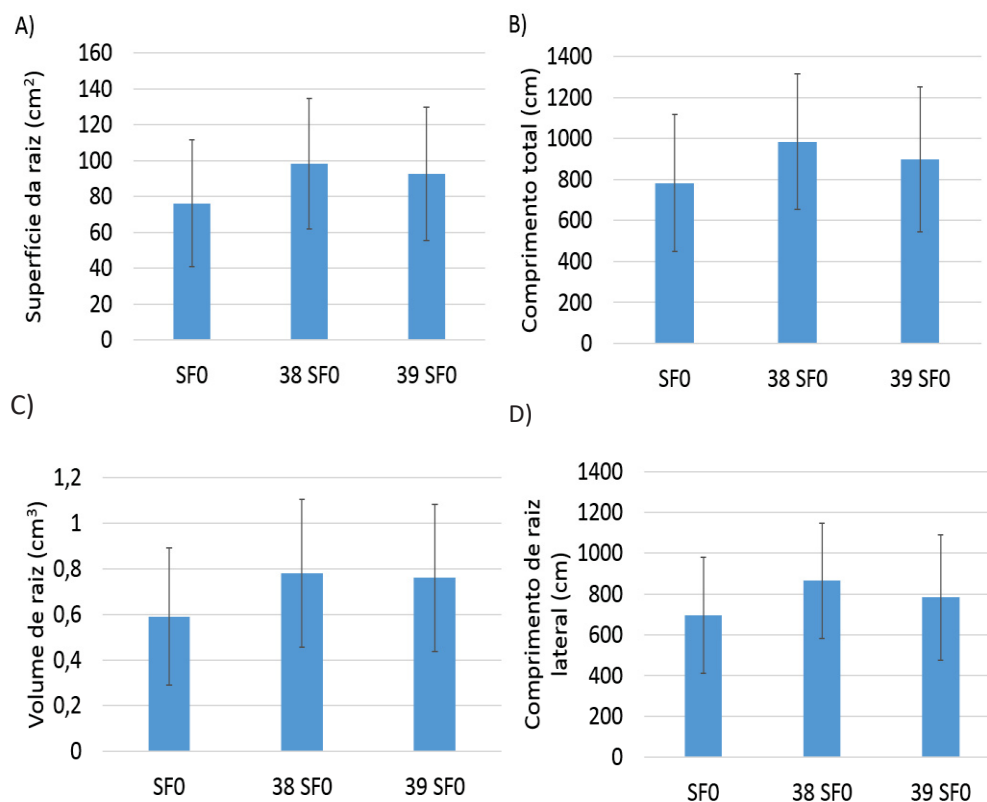
FONTE: O autor (2018)

4.2.5 Promoção de crescimento em trigo inoculadas com *Azospirillum* sp.

Para verificar se as estirpes 38SF0 e 39SF0 poderiam estimular o crescimento de trigo, o peso seco das raízes e da parte aérea, bem como a morfometria das raízes foram avaliadas na variedade CD104 e comparadas com as plantas inoculadas com a estirpe selvagem SF0 aos 32 dias após a inoculação. As plantas inoculadas com as estirpes 38SF0 e 39SF0 apresentaram uma tendência no aumento da superfície da raiz de 23% e 18%, do comprimento total de 20% e 13%, do volume de raiz de 24% e 22% e do comprimento da raiz lateral de 20% e 12%, respectivamente (gráfico 8). Essa tendência no aumento também foi observada no peso seco da parte aérea das plantas inoculadas com as estirpes 38SF0 e 39SF0, sendo 17% e 15% maior que as plantas inoculadas com a estirpe SF0, respectivamente (gráfico 9 - B).

Além disso, o peso seco das raízes de trigo inoculadas com as estirpes 38SF0 e 39SF0 foi ~ 25% e 15 % superior ao das plantas inoculadas com a estirpe SF0, respectivamente (gráfico 9 - A). No entanto, esse aumento no peso seco das raízes foi significativo estatisticamente somente para as plantas inoculadas com a estirpe 38SF0 ($p \leq 0,1$) (gráfico 9 - A). Esses resultados mostram que as estirpes 38SF0 e 39SF0 apresentaram maior potencial para promover o crescimento da planta do que a estirpe selvagem.

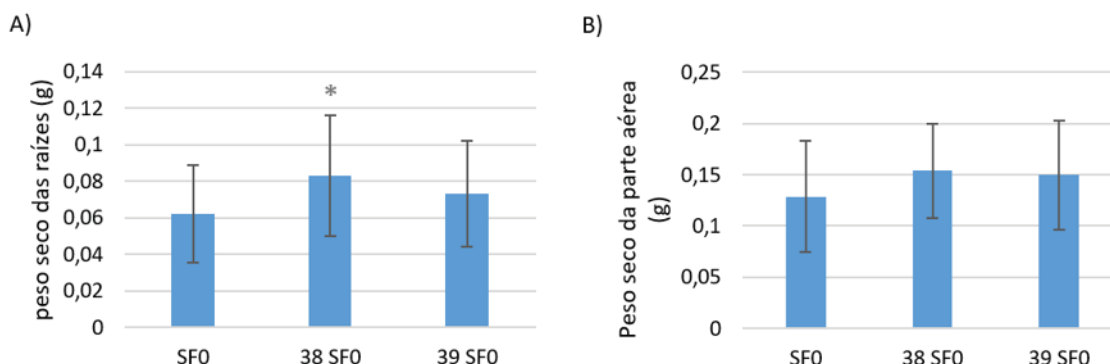
GRÁFICO 8 - PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DE RAÍZES DE TRIGO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*



Plântulas de trigo foram inoculadas com as estirpes de *A. brasilense* (10^6 células/mL) e 32 dias após a inoculação os parâmetros morfométricos das raízes foram determinados. Foram utilizadas 15 replicatas. As letras representam: A) superfície da raiz (cm²); B) comprimento total da raiz (cm); C) volume de raiz (cm³); D) comprimento da raiz lateral (cm).

FONTE: O autor (2018)

GRÁFICO 9 – EFEITO DA INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* ESTIRPES SF0, 38SF0 E 39SF0 EM PLANTAS DE TRIGO.



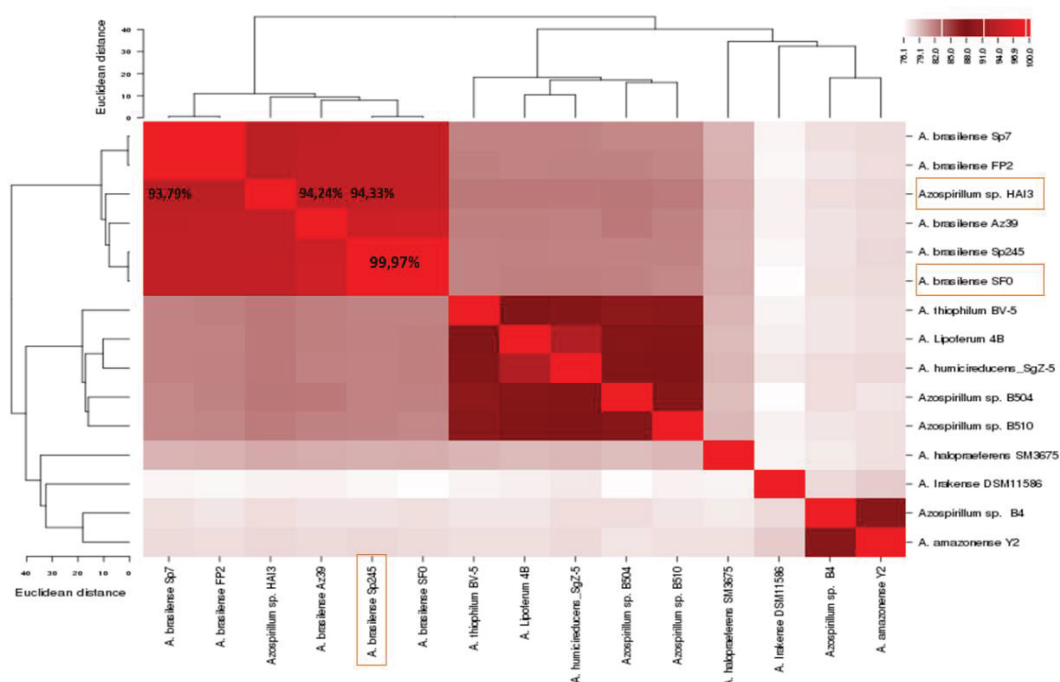
Plântulas de trigo (variedade CD104) foram inoculadas com (10^6 células/mL) as estirpes de *A. brasilense* e 32 dias após a inoculação o peso seco de raízes e da parte aérea foram determinados. Foram utilizadas 15 replicatas. As letras representam: A) peso seco das raízes (g); B) peso seco da parte aérea (g). Diferença significativa pelo teste t ($p \leq 0,1$) é indicado por asterisco.

FONTE: O autor (2018)

4.2.6 Análise da média de identidade dos nucleotídeos (Average nucleotide identity - ANI) do isolado HAI3 e da estirpe SF0

A ferramenta ANI foi utilizada para comparar o genoma do isolado de *Azospirillum sp.* HAI3 com o genoma completo de todas as espécies de *Azospirillum* depositadas no NCBI. Essa ferramenta tem por objetivo medir a identidade entre dois genomas e com isso identificar se os organismos pertencem à mesma espécie (GORIS *et al.*, 2007). O isolado HAI3 obteve maior identidade com as estirpes de *A. brasilense* Sp245, Az39 e Sp7 (figura 3). No entanto, nenhum valor acima de 95% foi obtido, que é o estabelecido para definir que dois organismos pertencem à mesma espécie. Esse resultado sugere que este isolado poderia pertencer a uma nova espécie. Porém, a cobertura do genoma foi baixa, aproximadamente 6 x, por isso decidimos produzir mais sequências do genoma a fim de aumentar a cobertura e com isso averiguar se o isolado HAI3 pertenceria a uma nova espécie.

O genoma da estirpe SF0 de *Azospirillum brasilense* também foi comparado com o genoma completo de todas as espécies de *Azospirillum* pelo calculador ANI. Como era esperado, o resultado obtido confirmou que a estirpe SF0 de *Azospirillum brasilense*, resistente a Sm¹⁰⁰ e Nal⁵, é derivada da estirpe Sp245 com 99,97% de identidade (figura 3).

FIGURA 3 - ANÁLISE DE ANI DAS ESTIRPES DE *Azospirillum*

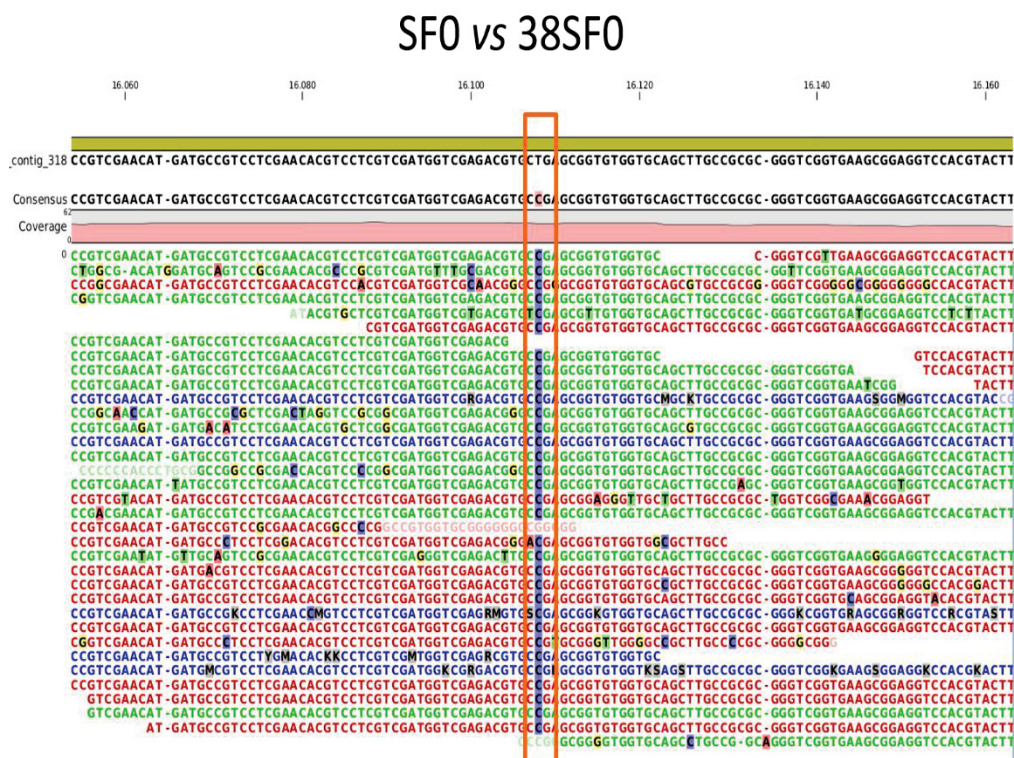
A ferramenta ANI é baseada na metodologia de Goris *et al.* (2007). Valores superiores a 95% de ANI indicam que os organismos pertencem à mesma espécie.

FONTE: O autor utilizando a ferramenta ANI (*Average Nucleotide Identity*)

4.2.7 Análises genômicas das estirpes SF0 e 38 SF0

Para investigar possíveis mutações no genoma da estirpe 38SF0 que justifiquem o fenótipo excretor de amônio, os *reads* da estirpe mutante foram mapeados contra o genoma da estirpe selvagem SF0 utilizando a plataforma CLC Genomics Workbench 6.0. O mapeamento e comparação destas sequências possibilitou a identificação de uma única mutação localizada no gene *glnA*, onde a mudança da base T por C, na posição 103 (figura 4), ocasionou a substituição do aminoácido Q (glutamina) por R (arginina) na posição 35 (figura 6).

FIGURA 4 - IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÃO PONTUAL (SUBSTITUIÇÃO DE T POR C) LOCALIZADA NO GENE *qlnA* DA ESTIRPE 38SF0 DE *A. brasilense*.



Mutação (substituição de T por C) no *glnA* na base 103

A sequência superior de bases nucleotídicas, contig_318, indica a sequência do gene *glnA* na estirpe selvagem SF0. As sequências coloridas indicam os *reads* da estirpe mutante 38 SF0 que alinha com o gene *glnA* da estirpe selvagem. A caixa laranja destaca a mutação pontual (substituição de T por C), na base 103 no gene *glnA* da estirpe 38 SF0.

FONTE: O autor utilizando a plataforma CLC Genomics Workbench 6.0.

O alinhamento múltiplo de sequências da glutamina sintetase de diferentes bactérias mostrou que o aminoácido Gln-35 é conservado no gênero *Azospirillum*, e em alguns outros gêneros da Classe Alfa-proteobactéria (figura 5). Além disso, nos outros organismos utilizados no alinhamento com Clustal-Ômega, no lugar do resíduo de glutamina encontra-se os aminoácidos isoleucina e metionina (figura 5). A substituição de um resíduo polar sem carga (Q = glutamina), ou apolar sem carga (I = isoleucina) e (M = metionina) por um polar com carga positiva (R = arginina) geralmente é considerada drástica devido à presença da carga positiva.

FIGURA 5 - ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQUÊNCIAS DA GLUTAMINA SINTETASE DE DIFERENTES BACTÉRIAS.



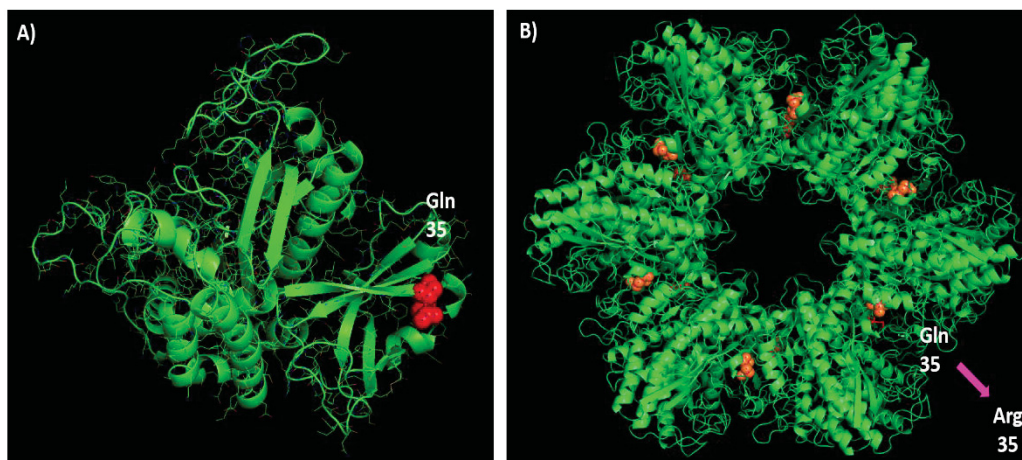
Para o alinhamento foram utilizadas as sequências da glutamina sintetase das estirpes SF0, 38SF0 e outras estirpes de *Azospirillum*, e também outras estirpes de bactérias da classe alfa-proteobactéria, além das bactérias (*Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*). O alinhamento foi realizado pelo programa Clustal Ômega versão 1.2.4. Destacado em caixa preta estão os aminoácidos na posição 35 na glutamina sintetase de diferentes bactérias. Nota: R= Arginina; Q=glutamina; M=metionina; I=isoleucina

FONTE: O autor utilizando Clustal ômega versão 1.2.4 (Sievers *et al.*, 2011)

Através do programa PyMOL investigamos com quais aminoácidos a Gln 35 interage na enzima glutamina sintetase. E verificamos que a Gln 35 interage com os aminoácidos valina 19 e treonina 33 por ligações de hidrogênio e esses aminoácidos estão localizados no mesmo monômero da enzima dodecâmerica glutamina sintetase (figuras 6 e 7).

FIGURA 6 - ESTRUTURA DA GLUTAMINA SINTETASE DA ESTIRPE SF0 DE *Azospirillum brasilense* COM DESTAQUE AO AMINOÁCIDO GLUTAMINA NA POSIÇÃO 35.

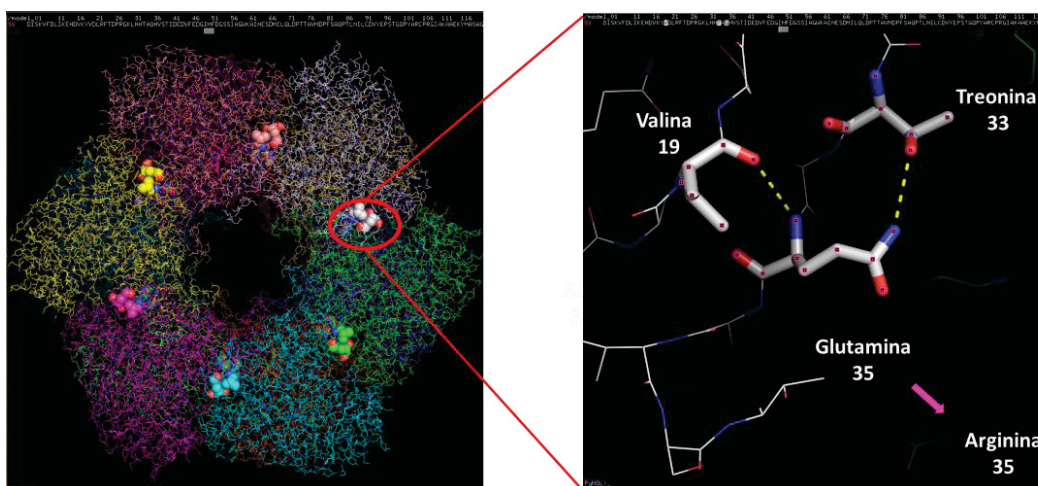
Glutamina sintetase



Estrutura monomérica (A) e estrutura dodecâmérica (B) da glutamina sintetase. As moléculas com formato esférico na cor vermelha indicam o aminoácido glutamina na posição 35 nos monômeros da enzima glutamina sintetase. Nota: Gln= glutamina; Arg= arginina; ➡ : substituição do aminoácido Gln por Arg na posição 35 na glutamina sintetase da estirpe mutante 38 SF0.

FONTE: O autor utilizando a ferramenta PyMOL.

FIGURA 7 - ESTRUTURA DA GLUTAMINA SINTETASE E INTERAÇÃO DO AMINOÁCIDO GLUTAMINA 35 COM OS AMINOÁCIDOS TREONINA 33 E VALINA 19 POR PONTES DE HIDROGÊNIO.



Os monômeros estruturais da glutamina sintetase da estirpe SF0 de *Azospirillum brasilense* estão representados por diferentes cores. As linhas pontilhadas em amarelo indicam a interação do aminoácido glutamina 35 com os aminoácidos treonina 33 e valina 19 por pontes de hidrogênio.

FONTE: o autor utilizando o programa pymol versão 1.7.2.1.

4.3 Discussão

Diversos estudos relataram que *Azospirillum* pode influenciar positivamente o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade de plantas (revisado em CASSÁN e DÍAZ-ZORITA, 2016) e que um conjunto de mecanismos são responsáveis por este efeito promotor (GLICK, 2012) como por exemplo a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Visando potencializar a promoção de crescimento via FBN foram isolados mutantes resistentes à etilenodimaina que foram capazes de fixar nitrogênio constitutivamente na presença de altas concentrações de amônia (10 mM de NH_4Cl).

Foram obtidos vinte e sete mutantes derivados da estirpe SF0 de *Azospirillum brasilense* e treze mutantes derivados do isolado HAI3 de *Azospirillum* sp. que foram capazes de fixar nitrogênio constitutivamente (fenótipo Nif^C). A verificação da capacidade de excreção de amônia destes mutantes Nif^C pelo método indofenol possibilitou a seleção do mutante excretor de amônia 38SF0, o qual apresentou um pico de excreção no tempo de 48 h de aproximadamente 0,5 mM de NH_4^+ (tabela 2)

Neste mutante foi identificada uma única mutação (substituição T por C) localizada no gene *glnA* e que ocasionou a substituição do aminoácido Q (glutamina) por R (arginina) na posição 35 da enzima glutamina sintetase (figura 4 e 6). Mutações pontuais no gene *glnA* que ocasionaram alterações de aminoácidos na glutamina sintetase (GS) foram encontradas, também, nos mutantes excretores de amônia isolados por Gauthier e Elmerich (1977), estirpes 7028 e 7029 (derivadas da estirpe Sp7) (VAN DOMMELEN *et al.*, 2003); e por Machado *et al.* (1991), estirpes HM014, HM026, HM0210 e HM053 (derivadas da estirpe FP2) (HAUER, 2012). Tantos os mutantes, 7028 e 7029, quanto os mutantes HM, apresentaram menores níveis de atividade da glutamina sintetase quando comparado aos da estirpe selvagem (VAN DOMMELEN *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 1991).

Recentemente Santos *et al.* (2017) mostrou por análise de 'Western Blot' que a GS do mutante HM053 não foi modificada por adenililação após choque de amônia em ambas as condições testadas (2 mM de NH_4Cl e 5 mM de glutamato). Com isso, foi sugerido pelos autores que a mutação encontrada em uma região conservada do gene *glnA* (levando a substituição de prolina para

leucina na posição 347) nessa estirpe ocasionou a baixa atividade da GS e a atividade constitutiva da nitrogenase.

Neste estudo, uma única mutação no gene *glnA* do mutante 38SF0 levou a substituição de um aminoácido conservado polar sem carga (Gln) por um polar com carga positiva (Arg) na posição 35 (figuras 4 e 5), o que provavelmente pode ter desestabilizado a interação de glutamina 35 com os aminoácidos valina 19 e treonina 33 (figura 7). Portanto, é provável que esta mutação encontrada na glutamina sintetase do mutante 38SF0 tenha alterado a estrutura tridimensional da proteína, ocasionando diminuição da atividade da enzima glutamina sintetase, o que poderia explicar o fenótipo excretor de amônia.

A maioria das estirpes da espécie *Azospirillum brasilense* são epifíticas e apenas poucas estirpes são endofíticas (DÖBEREINER, BALDANI e REIS, 1995). A estirpe Sp245 de *A. brasilense* é conhecida por ter uma boa capacidade de colonização sendo capaz de colonizar não apenas a superfície das raízes como também o seu interior. Essa estirpe foi encontrada nos espaços intercelulares da camada epidérmica, no interior dos pelos radiculares ou células do córtex, além do xilema das raízes de trigo (SCHLOTER *et al.*, 1994; SCHLOTER e HARTMANN, 1998). O xilema foi sugerido como provável local para a fixação biológica de nitrogênio, por causa da baixa pressão do oxigênio atmosférico e a troca de metabólitos entre a bactéria e a planta hospedeira (JAMES *et al.*, 1994). Aqui, o mutante 38SF0 foi capaz de colonizar a superfície das raízes e o interior da raiz, apresentando um tamanho de população epifítica e endofítica similar ao da estirpe selvagem ao longo do tempo (gráficos 3 e 4).

Autores sugerem que, no habitat endofítico, os diazotrofos são favorecidos, uma vez que viver nos tecidos vegetais representa a oportunidade de sempre estar em contato com as células vegetais, onde elas podem acessar a água e nutrientes mais facilmente (BALDANI e BALDANI, 2005). Além disso, uma vez que os endófitos estão estabelecidos nos tecidos da planta hospedeira, são menos afetados pelas flutuações ambientais, que podem inibir o crescimento e o funcionamento de PGPRs rizosféricos. Como por exemplo, as variações de temperatura, pH e conteúdo de água do solo, além da competição com outras bactérias do solo por locais de ligação nas superfícies das raízes de plantas (GLICK, 2012). Assim, sob diversas condições ambientais, os endófitos bacterianos são capazes de comunicar e interagir com a planta de forma mais

eficiente do que a bactéria rizosférica (ALI *et al.*, 2012). Diante disto, seria interessante testar a eficácia deste mutante excretor de amônia endofítico na promoção de crescimento de plantas. Além disso, esse dado é importante, uma vez que, a interação de *Azospirillum* com a planta promove o crescimento da planta hospedeira (PEREG *et al.*, 2016).

Para investigar se as estirpes mutantes poderiam incrementar o crescimento das raízes, as estirpes foram inoculadas em plântulas de milho e trigo cultivadas sob condições axênicas. A superfície, o comprimento total e o volume total das raízes das plantas do cultivar de milho 30A37 inoculadas com o mutante 38SF0 foi maior que as plantas não inoculadas ou inoculadas com a estirpe selvagem SF0, o que refletiu no aumento do peso seco das raízes (gráficos 5 e 6). Em comparação com as plantas de trigo inoculadas com a estirpe selvagem, as plantas inoculadas com as estirpes mutantes 38SF0 (Nif^C e excretor de amônio) e 39SF0 (Nif^C) mostraram maior crescimento, tanto na análise de morfometria das raízes quanto na análise de peso seco das raízes e parte aérea (gráfico 8 e 9).

No entanto, os aumentos observados em plantas de milho e trigo inoculadas com as estirpes mutantes não foram significativos pelo teste t ($p \leq 0,05$), devido a alta variabilidade das replicatas, sendo necessários experimentos com maiores números de replicatas. Assim, ao que parece, as estirpes mutantes tem maior potencial para promover o crescimento da planta inoculada do que a estirpe SF0 ou plantas não inoculadas.

Uma variedade de trigo de inverno inoculado em condições axênicas com um mutante excretor de amônio de *A. brasilense* estirpe 7029 mostrou peso seco total, desenvolvimento de perfilhos e peso seco das espigas, superiores às plantas inoculadas com a estirpe selvagem de *Azospirillum brasilense* Sp7 e esse aumento refletiu no rendimento (VAN DOMMELEN *et al.*, 2009).

Também em condições axênicas, plantas de trigo inoculadas com a mutante excretora de amônio de *A. brasilense* HM053 mostraram peso seco total da raiz e da parte aérea 30% maiores que as plantas inoculadas com a estirpe selvagem FP2 (SANTOS *et al.*, 2017). Além disso, a expressão do *nifH* em plantas colonizadas com essa mesma estirpe foi quase 300 vezes maior que as plantas colonizadas pela estirpe selvagem. Os autores sugeriram a estirpe HM053 como uma potencial promotora de crescimento de plantas e que

alterações sitio-dirigidas discretas no genoma das bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) podem permitir a construção de novas e mais efetivas estirpes de *A. brasilense* (SANTOS *et al.*, 2017).

Utilizando também a estirpe excretora de amônia HM053 em ensaios de inoculação, plantas de *Setaria viridis* apresentaram crescimento robusto em condições limitantes de nitrogênio; o peso seco da parte aérea das plantas inoculadas aumentou 82,2%, o comprimento da raiz aumentou 28,6% e o número de raízes laterais aumentou 39,6%, o que resultou num maior rendimento de produção de sementes em comparação com as plantas não inoculadas (PANKIEVICZ *et al.*, 2015).

No mesmo trabalho foi mostrado que as plantas inoculadas com a estirpe HM053 incorporou 16 vezes mais N derivado da FBN (isótopo ^{13}N) e assimilou 14 vezes mais CO_2 do que as plantas inoculadas com as estirpes selvagem de *A. brasilense* e *H. seropedicae*. Segundo os autores, esse nível é considerado suficiente para fornecer a demanda diária de N da planta e demonstra a transferência de níveis significativos de nitrogênio fixado para a planta hospedeira, e que assimilação aumentada de carbono também pode contribuir para a promoção de crescimento por PGPR. Além disso, foi mostrado que o N derivado da FBN e excretado pela estirpe mutante HM053 foi transportado para a parte aérea e incorporado na ribulose-1,5-bifosfato carboxilase, principal enzima requerida para a fotossíntese da planta (PANKIEVICZ *et al.*, 2015).

Em conjunto, esses estudos sugerem que estas estirpes mutantes com habilidade de fixar nitrogênio constitutivamente e/ou excretar amônia podem contribuir para o fornecimento do nitrogênio fixado para as plantas associadas, e que, portanto, são candidatos a biofertilizante agrícolas, porém tem que ser testados em experimentos de campo.

A seleção de estirpes mutantes excretoras de amônio que exibem características peculiares a bactéria, como por exemplo, diferentes capacidades de colonização, é importante, uma vez que, a resposta a inoculação de PGPRs pode ser influenciada pela espécie bacteriana, pela estirpe, pela espécie da planta em estudo, bem como pelo o genótipo da planta utilizada, além das condições ambientais (MONTEIRO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2015).

4.4 Conclusões

- Foram isolados mutantes de *Azospirillum* spp. resistentes à etilenodiamina, capazes de fixar nitrogênio na presença de altas concentrações de NH_4^+ ;
- Vinte e sete mutantes derivados da estirpe SF0 de *Azospirillum brasilense* e treze mutantes derivados do isolado HAI3 de *Azospirillum* spp. foram capazes de fixar nitrogênio na presença de altas concentrações de NH_4^+ (fenótipo Nif^C), no entanto apenas o mutante 38SF0 foi capaz de excretar NH_4^+ ;
- O mapeamento e comparação das sequências do mutante 38SF0 contra as da estirpe selvagem SF0 possibilitou a identificação de uma mutação pontual localizada no gene *glnA*, onde a mudança da base T por C, na posição 103, ocasionou a substituição do aminoácido Q (glutamina) por R (arginina) na posição 35, esta alteração provavelmente justifica o fenótipo Nif^C ou excretor de amônio no mutante.
- A sequência genômica do isolado HAI3 apresenta maior identidade com as estirpes de *Azospirillum brasilense* Sp245, Az39 e Sp7, porém nenhum valor acima de 95% foi obtido. O isolado HAI3 foi capaz de colonizar endofiticamente as raízes de milho.
- Os mutantes 38SF0 e 39SF0 foram capazes de colonizar eficientemente a superfície e o interior das raízes de milho.
- Nos ensaios preliminares de promoção de crescimento vegetal, o peso seco das raízes de milho (cultivar 30A37) e de trigo (variedade CD104) inoculado com o mutante 38SF0 foi maior que os das plantas inoculadas com a estirpe selvagem SF0.

5. Capítulo 2: Construção de estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 nos genes *flcA*, *ipdC* e *narL-like* e caracterização de seu envolvimento na interação com o trigo.

Para que *Azospirillum* promova o crescimento vegetal é necessário que haja uma interação bem-sucedida com a planta hospedeira. No entanto, os fatores envolvidos na interação de *Azospirillum* com gramíneas ainda não são completamente conhecidos (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; CARVALHO *et al.*, 2016). Assim, o objetivo geral deste capítulo foi construir estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 nos genes *flcA*, *narL-like* e *ipdC* e caracterizar seu envolvimento na interação com gramíneas, visando além da melhor compreensão da interação bactéria-planta, a aquisição de conhecimento para melhorar a produção e aplicação de inoculantes para a cultura de gramíneas.

5.1 Materiais e Métodos:

5.1.1 Estudo *in silico* dos genes *flcA*, *narL-like* e *ipdC* da estirpe FP2 de *Azospirillum brasilense*

Os três genes alvos (*flcA*, *narL-like* e *ipdC*) foram localizados na mais recente montagem anotada do genoma da estirpe FP2 (GUIZELINE, 2016) utilizando o software Artemis (CARVER *et al.*, 2012). Uma vez localizados os genes, suas sequências nucleotídicas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados do NCBI, através da ferramenta Blastp, visando confirmar similaridade com genes homólogos de outros organismos.

A partir da sequência genômica foram desenhados *primers* para amplificação dos genes de interesse (ANEXO 5) e posterior mutagênese.

As redes de interações proteína-proteína conhecidas e previstas das sequências de aminoácidos dos genes *narL-like* e *flcA* foram analisadas utilizando o software String versão 10.5 (SZKLARCZYK *et al.*, 2017).

Os domínios conservados da proteína NarL-like e FlcA foram analisados utilizando o software Pfam (pfam.xfam.org).

5.1.2 Bactérias e plasmídeos

As estirpes bacterianas utilizadas estão listadas na tabela 3. Os plasmídeos utilizados estão listados na tabela 4.

TABELA 3 - ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS.

ESTIRPES	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Azospirillum brasilense</i> FP2	N-nitroguanidina variante da estirpe tipo Sp7, Nif ⁺ , isolada de raízes de <i>Digitaria decumbens</i>	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	<i>hsdR</i> , <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>mcrA</i> , <i>endA1</i>	INVITROGEN
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>hsd RM</i> ⁺ ; SmR	KESSLER <i>et al.</i> , 1992

FONTE: O autor (2018)

TABELA 4 – PLASMÍDEOS UTILIZADOS.

PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
pTZ57R/T F	Amp ^R , Vetor de clonagem método T/A	FERMENTAS
pTZUipdC	Produto de PCR com 486 pb contendo região <i>upstream</i> ao gene <i>ipdC</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
ptZUflcA	Produto de PCR com 496pb contendo região <i>upstream</i> ao gene <i>flcA</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
ptZUnarL-like	Produto de PCR com 497 pb contendo região <i>upstream</i> ao gene <i>narL-like</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZDipdC	Produto de PCR com 433 pb contendo região <i>downstream</i> ao gene <i>ipdC</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
ptZDflcA	Produto de PCR com 476 pb contendo região <i>downstream</i> ao gene <i>flcA</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
ptZDnarL-like	Produto de PCR com 484 pb contendo região <i>downstream</i> ao gene <i>narL-like</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
ptZUDipdC	Produto de PCR com 919 pb contendo região <i>upstream</i> e <i>downstream</i> ao gene <i>ipdC</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
ptZUDflcA	Produto de PCR com 972 pb contendo região <i>upstream</i> e <i>downstream</i> ao gene <i>flcA</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
ptZUDnarL-like	Produto de PCR com 981 pb contendo região <i>upstream</i> e <i>downstream</i> ao gene <i>narL-like</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pK18mobsacB	Km ^R , <i>sacB</i> , <i>lacZ</i>	SCHAFER <i>et al.</i> , 1994
pK18UDipdC	Produto de PCR com 919 pb contendo região <i>upstream</i> e <i>downstream</i> ao gene <i>ipdC</i> ligado ao vetor pK18	Este trabalho
pK18UDflcA	Produto de PCR com 972 pb contendo região <i>upstream</i> e <i>downstream</i> ao gene <i>ipdC</i> ligado ao vetor pK18	Este trabalho

Pk18UDnarL-like	Produto de PCR com 981 pb contendo região <i>upstream</i> e <i>downstream</i> ao gene <i>ipdC</i> ligado ao vetor pK18	Este trabalho
pRK600	plasmídeo Helper utilizado nas conjugações triparentais; oriV(ColE1), RK2(mob+ tra+); Cm ^R	KESSLER <i>et al.</i> , 1992

FONTE: O autor (2018)

5.1.3 Condições e meios de cultivo

A estirpe FP2 de *A. brasilense* foi cultivada em meio líquido NFbHPN-lactato (ANEXO 1) (MACHADO *et al.*, 1991) a 30°C, sob agitação de 120 rpm por 24h. Os meios NFbHPN sólido e semi-sólido contêm 15g/L e 1,75 g/L de ágar, respectivamente.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (ANEXO 2) (SAMBROOK *et al.*, 1989) sob agitação de 120 rpm ou em meio sólido LA, a 37°C. O meio LA é composto de meio LB acrescido de 15g/L de ágar. O meio TY (ANEXO 3) (BROUGHTON *et al.*, 1986) foi utilizado na conjugação triparental.

5.1.4 Antibióticos

Os antibióticos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 5. As soluções estoque foram preparadas como descrito por Sambrook *et al.* (1989).

TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS

ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO FINAL PARA AS CULTURAS DE <i>E. coli</i>	CONCENTRAÇÃO FINAL PARA AS CULTURAS DE <i>A. brasilense</i>
Ampicilina (Amp)	250 µg/mL	-
Ác. Nalidíxico (Nal)	5 µg/mL	10 µg/mL
Kanamicina (Km)	50 µg/mL	50 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	40 µg/mL	80 µg/mL
Cloranfenicol (Cm)	30 µg/mL	-

FONTE: O autor (2018)

5.1.5 Manutenção das estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C. As estirpes de *A. brasilense* foram estocadas em frascos de vidros (vol 5 mL) contendo meio NFbHPN-lactato sólido e/ou semi-sólido, a temperatura ambiente

e sem agitação. Os frascos foram lacrados com fita de silicone. Além disso, as estirpes de *A. brasilense* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C.

5.1.6 Técnicas de manipulação de DNA

5.1.6.1 Purificação do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial das células de *E. coli* foi realizado segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al*, 1989). Após a purificação, os plasmídeos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1X) para a confirmação do tamanho dos fragmentos.

5.1.6.2 Purificação do DNA genômico

As células de *A. brasilense* cultivadas em meio NFbHPN-lactato (1,5 mL) foram coletadas por centrifugação em microcentrífuga (14.500 rpm por 1 minuto). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 400 µL de tampão GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10mmol/L e Tris.HCl 25 mmol/L pH 8.0). Para lisar as células foi usado lisozima (concentração final de 100 µg/mL), seguido de incubação a 30 °C por 1 hora. Ao lisado foi adicionado SDS 1 % (v/v), seguido por incubação a 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, foi acrescentado proteinase K (20 mg/mL) e RNase (10 mg/mL), sendo cada uma em concentração final de 50 µg/mL, seguido por incubação a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

A mistura foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e duas vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com três volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 80%, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µL de água MilliQ autoclavada. O DNA foi quantificado em aparelho Nanodrop (THERMO), conforme instruções do fabricante.

5.1.6.3 Extração de DNA a partir do gel de agarose

Bandas do gel de agarose que continham os fragmentos de DNA de interesse foram recortados. Em seguida, os fragmentos de DNA do gel de agarose foram purificados utilizando o kit de extração de DNA *UltraClean*

GelSpin DNA Extration Kit seguindo o protocolo do fabricante (MoBio). Após a extração, o tamanho dos fragmentos foi confirmado por eletroforese de agarose 1% (tampão TAE 1X).

5.1.6.4 Digestão do DNA por enzimas de restrição

A digestão de DNA foi realizada segundo protocolo recomendado pelo fabricante das enzimas de restrição (FERMENTAS ou INVITROGEN). A clivagem foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1X).

5.1.6.5 Ligação do fragmento de DNA aos vetores

O vetor linearizado, anteriormente clivado com as enzimas de restrição adequadas, foi ligado ao inserto numa razão molar de aproximadamente 1:3. Foram adicionados no sistema de reação de ligação: tampão de ligação e 0,5 U de T4 DNA ligase perfazendo um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a aproximadamente 20°C durante a noite.

5.1.6.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1% horizontal como descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

5.1.6.7 Amplificação de DNA

A amplificação dos fragmentos de DNA localizados a montante e a jusante dos genes *ipdC*, *flcA* e *narL-like* de *A. brasilense* FP2 foi realizado utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR). A partir da sequência genômica depositadas no banco de dados do GenBank foram desenhados 2 pares de primers localizados a montante jusante do gene. Nos primers foram introduzidos sítios de restrição para facilitar a clonagem nos vetores de interesse.

O sistema de reação de amplificação para um volume final de 20 µL foi composto de: 0,2 U de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas Int. Inc.), tampão para Taq [(NH₄)₂SO₄] na concentração de 1x o volume final de reação, 1-5 ng/mL de DNA genômico de *A. brasilense* FP2, 0,5 pmol/L de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 mol/L de dNTPs e 1,5 mmol/L de MgCl₂. As

condições de reação foram: uma etapa de 95°C por 1 minuto, 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, temperatura de anelamento (variável para cada dupla de iniciadores) por 45 segundos, 72°C por 30 segundos, seguidas de uma etapa de 72°C por 10 minutos.

5.1.6.8 Sequenciamento do DNA

Fragmentos de interesse foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para cada gene pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977). O sequenciamento de bases foi realizado no sequenciador automático de DNA ABI-PRISM 1500 (Applied Biosystems).

5.1.7 Preparo de células competentes utilizando solução TSS “Transformation and storage solution”

As células de *E. coli* TOP10 foram cultivadas em meio LB até a saturação. As culturas crescidas foram diluídas no mínimo 100 vezes em 5 mL de meio LB fresco em 5 mL frascos de vidro (vol. 25 a 40 mL) e cultivadas a 37°C e 120 rpm até que a cultura de células tivesse uma D.O.595 entre 0,2 – 0,4. As culturas foram transferidas para tubos de eppendorf, coletadas por centrifugação em minispin Eppendorf® (13400 rpm 1 minuto, temperatura ambiente) e o sedimento de células foi ressuspensão em solução TSS gelado (LB contendo 10% de PEG 6000, 50 mM MgCl₂ e 5% de DMSO). As células ressuspensas foram aliqüotadas em volume de 100 µL em tubos de plásticos de 1,5mL previamente gelados. As aliqüotas de células foram estocadas a -80°C.

5.1.8 Transformação bacteriana por choque térmico

Plasmídeos íntegros ou ligações foram misturados a uma suspensão de 100 µL de células competentes e incubadas por 30 minutos em banho de gelo. Após este período, a mistura foi levada a banho-maria a 42°C por 45 segundos e incubada novamente em gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, as células foram recuperadas em 400 µL de meio LB por 1 hora a 37°C. Durante o período de recuperação as células foram homogeneizadas por inversão em intervalos de 10-15 minutos. Após a recuperação, 250 µL da suspensão de células foram

plaqueados em meio LA contendo os antibióticos e indicadores para seleção de clones convenientes a cada transformação.

5.1.9 Transferência de plasmídeos por conjugação tripla

As estirpes de *E. coli* top 10 (estirpe doadora contendo pk18 com o inserto de interesse) e a HB110 (contendo o plasmídeo prK600) foram cultivadas em meio LB com antibióticos sob agitação constante por 16 h a 37°C. Após esse período as estirpes de *E. coli* foram re-inoculadas em uma proporção de 1:100 em meio LB sem antibióticos e incubadas sob agitação e temperaturas adequadas por um período de aproximadamente 3 horas. A estirpe FP2 de *A. brasilense* (receptora) foi cultivada em meio NFb-lactato HPN sem antibióticos por aproximadamente 6h até atingir uma DO=1. Em seguida, foram feitas misturas da cultura de *A. brasilense* com as culturas de *E. coli* em duas proporções distintas. Em um tubo falcon foram misturados 5mL de FP2 + 2,5 mL + 2,5 mL de *E. coli* HB101 + 2,5 mL de *E. coli* top10, e em outro tubo foram misturados 9 mL de FP2 + 0,5 mL de *E. coli* HB101 + 0,5 mL de *E. coli* top10. Em seguida, as misturas foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com o que sobrou de meio no tubo com pipeta (p1000) e então, a suspensão foi plaqueada em TY-NFb-lactato (1:1) e incubadas a 30°C *over night*. O meio NFb-lactato continha 45 mM da mistura de fosfatos e 18mM de NH₄Cl.

A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFb-lactato líquido e então 200 µL foram plaqueados em meio NFbHPN-lactato sólido contendo os antibióticos adequados para a seleção dos transconjugantes.

5.1.10 Obtenção das estirpes mutantes da estirpe FP2 de *Azospirillum brasilense*

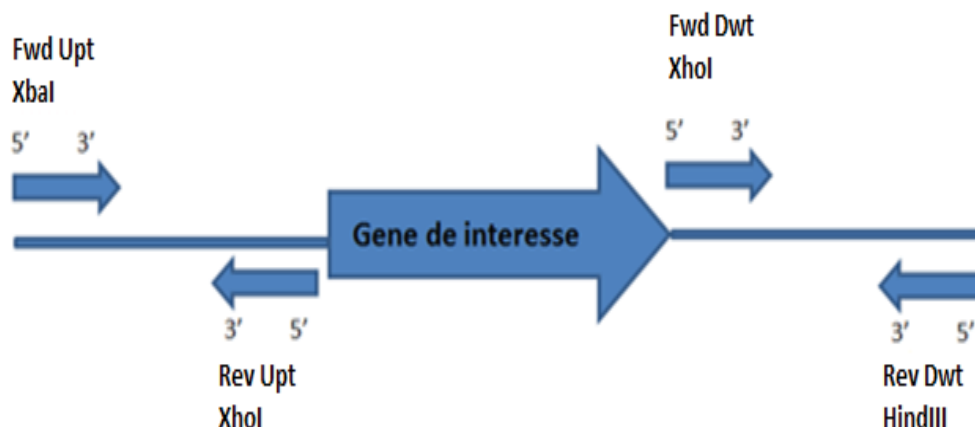
A obtenção de estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 para os genes *flcA*, *narL-like* e *ipdC* foi realizada utilizando-se a técnica de mutagênese por deleção. Em resumo, foram desenhados primers para amplificar fragmentos a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) do gene a ser deletado. Nesses primers foram inseridos sítios de restrição para facilitar a clonagem (ANEXO 5 e figura 8). Após a amplificação desses fragmentos por PCR (*upstream* e *downstream*), os mesmos foram ligados ao vetor pTZ57R/T e

transformados em *E. coli* top 10 (clonagem TA - Fermentas). Em seguida os clones foram confirmados por digestão com enzimas de restrição e analisados em gel de agarose, e por sequenciamento. Após essa confirmação, foi realizada uma restrição em maior escala (50 µL) dos fragmentos de DNA a montante do gene com as enzimas XbaI e XhoI e dos fragmentos de DNA a jusante do gene com as enzimas XhoI e Hind III. A restrição em maior escala foi posteriormente aplicada em gel de agarose 1% e submetidas a eletroforese para a confirmação da restrição por meio da verificação do tamanho do fragmento de DNA que deveriam ter aproximadamente 500pb. Os fragmentos confirmados foram então purificados do gel agarose utilizando o kit de extração de DNA a partir do gel de agarose - *UltraClean GelSpin DNA Extration Kit* da Mobio.

Os fragmentos de DNA a montante e a jusante purificados (unidos por ligação) foram clonados no vetor pTZ57R e digeridos com XbaI e HindIII para posteriormente serem subclonados no vetor pK18mobsacB que contém um marcador de seleção negativa, gene *sacB*, (GAY *et al.*, 1983). A construção obtida (vetor pK18mobsacB + inserto) foi transferido por conjugação tripla para estirpe FP2 de *A. brasilense* conforme descrito por Finan *et al.* (1986) utilizando o plasmídeo prK600 (Cm 30) da estirpe HB101 de *E.coli*.

Com a conjugação, ocorreu o fenômeno de recombinação homóloga, gerando estirpes com o gene deletado. Essas foram selecionadas por resistência a canamicina (primeiro evento de recombinação) e sensibilidade a 10 % de sacarose (segundo evento de recombinação). No primeiro evento de recombinação o vetor é integrado no locus gênico alvo, já no segundo evento de recombinação o vetor é eliminado. A presença de mutação na estirpe FP2 foi confirmada por PCR utilizando os primers Fwd Upt e Rev Dwt (figura 8), seguida de sequenciamento.

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS “PRIMERS” DESENHADOS A MONTANTE (*Upstream*) E A JUSANTE (*Downstream*) DO GENE A SER DELETADO.



Os sítios de restrição inseridos na sequência, XbaI, XhoI e HindIII, estão indicados nos *primers*.
 NOTA: Fwd= *Forward*; Rev= *Reverso*; Upt = *Upstream*; Dwt= *Downstream*.

FONTE: O autor (2018)

5.1.11 Ensaio de Floculação e de Ligação ao vermelho congo

A floculação foi avaliada como descrito por Hou et al. (2014) com algumas modificações. As culturas da estirpe FP2 de *Azospirillum brasilense* foram cultivadas em meio líquido NFb HPN-lactato (MACHADO *et al.*, 1991) até atingir uma DO_{600nm} 0,8 - 0,9 e as células foram coletadas por centrifugação a 3000xg por 5 min. O sedimento foi lavado em 5 mL de meio NFbHP-lactato e inoculado em meio de floculação (meio NFbHP-lactato suplementado com 8 mM frutose e 0,5 mM KNO_3) a uma DO_{600nm} de 0,3 – 0,4. Os experimentos foram realizados em frascos de 50 mL contendo 10 mL de meio de floculação, as quais foram incubadas a 30 °C num agitador a 120 rpm durante 6h. A floculação foi observada em microscópio Olympus BX51.

Para o ensaio de ligação ao vermelho congo, cinco microlitros das culturas das estirpes cultivadas em meio NFbHPN-lactato (DO_{600nm} = 0,8-0,9) foram plaqueadas em meio NFbHPN-lactato sólido contendo 40 µg/mL de vermelho-congo e as colônias resultantes foram analisadas quanto a cor e morfologia por estereomicroscopia.

5.1.12 Determinação da atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução de acetileno a etileno, conforme descrito por Klassen *et al.* (1997). Para isso, as estirpes de *A. brasilense* foram inicialmente cultivadas em meio NFbHPN lactato na presença de antibióticos. Ao final do tempo de incubação, vinte microlitros de culturas de *A. brasilense* ($DO_{600nm}=1$) cultivadas foram inoculados em frascos contendo 4 mL de meio semi-sólido NFbHP - lactato acrescido de 0,5 mM de glutamato de sódio. Após o período de incubação a 30°C por cerca de 24 horas, os frascos foram vedados com rolhas de borracha e injetados de acetileno gasoso com uma seringa (10% do volume da fase gasosa do frasco). Em seguida, os frascos foram incubados novamente a 30°C por uma hora. Após esse período, amostras de 500 µL da fase gasosa foram coletadas para medição do etileno formado por cromatografia em cromatógrafo Varian Star 3400 CX equipado com um detector de ionização de chama e coluna de Porapak N. A proteína foi dosada pelo método de Bradford (1976). A atividade da nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína na cultura.

5.1.13 Produção de ácido indol acético (AIA)

A produção de ácido indol acético foi determinada pela reação colorimétrica de Salkowski. As estirpes foram inoculadas, em duplicatas, em meio NFbHPN-lactato sem adição de triptofano (-Trp) e com adição de 1 mM de triptofano (+ 1 mM de Trp), a partir de uma DO_{600nm} de 0,1. Após 72h de incubação a 30°C e 120rpm, 1 mL de cada cultivo foi coletado e centrifugado a 3000Xg por 1 min. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de Salkowski (EHMANN, 1977): 100 microlitros de sobrenadante + 100 microlitros de reativo de Salkowski (em triplicata), e após 30 min a temperatura ambiente a DO_{540nm} foi determinada.

5.1.14 Ensaio de formação de Biofilme em fibra de vidro

A formação de biofilme em fibra de vidro por estirpes de *A. brasilense* foi avaliada como descrito por Balsanelli *et al.* (2010). Estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas em 10 mL de meio NFbHPN-lactato com adição de 50 mg de fibra de vidro, a 30 °C e 120 rpm. A fibra de vidro foi corada com 200 µL de violeta cristal a 1% e lavada três vezes com solução salina a 0,9%. Em seguida, 1 mL de etanol absoluto foi adicionado para remover o corante, e esta solução foi usada para determinar a DO_{540nm}. As amostras da fibra de vidro foram coletadas 72h após a inoculação. Os valores foram expressos como DO_{540nm} das amostras subtraído da DO_{540nm} do controle negativo (amostra não inoculada). Os resultados reportados representam a média de três experimentos independentes.

5.1.15 Ensaios *in planta*

5.1.15.1 Ensaios de colonização

A capacidade das estirpes de *Azospirillum* colonizar as raízes de trigo foi determinada pela contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama fresca de raiz como descrito por Balsanelli *et al.* (2010). Aproximadamente 30 min após a inoculação foi determinada o número de células aderidas. O número de células planctônicas e epifíticas foram determinados em 1, 3, 7 e 12 dias após a inoculação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

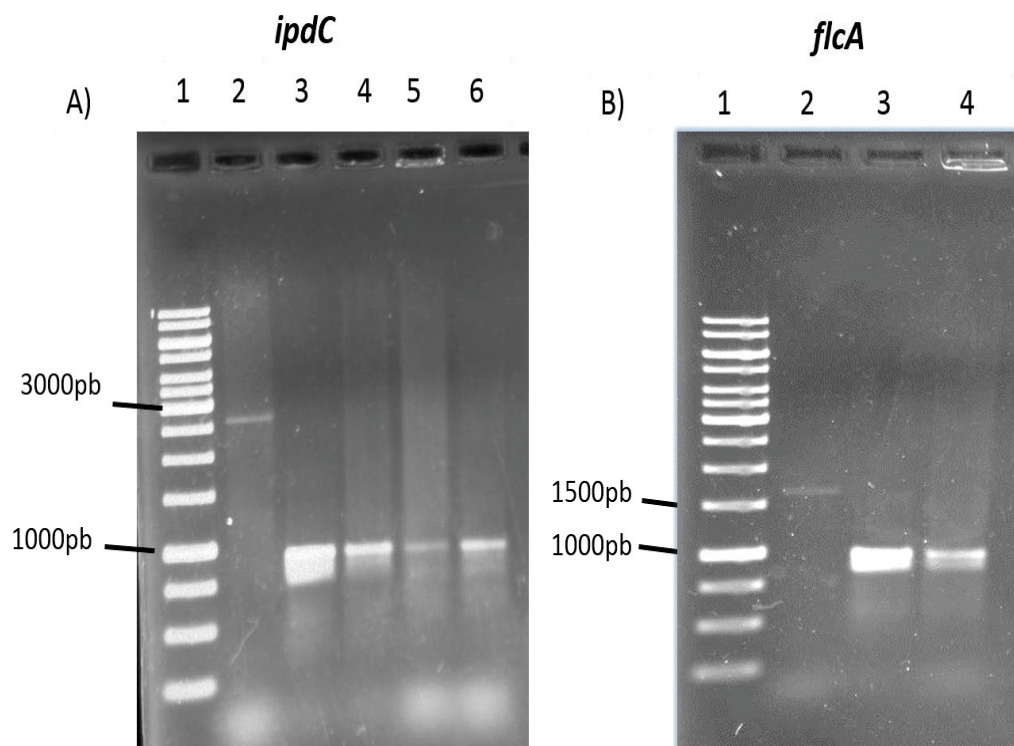
6.1 Obtenção dos mutantes $\Delta ipdC$, $\Delta flcA$ e $\Delta narL$ -like de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2

Para a obtenção de estirpes mutantes $\Delta flcA$, $\Delta narL$ -like e $\Delta ipdC$ de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 foi utilizada a técnica de mutagênese por deleção conforme descrito no item 5.1.10. O produto de deleção $\Delta flcA$, $\Delta narL$ -like e $\Delta ipdC$ (fragmentos *upstream* e *downstream* unidos de cada gene) foi clonado no plasmídeo pK18mobsacB, e então o plasmídeo obtido foi transferido para estirpe FP2 por conjugação tripla utilizando a estirpe helper *E.coli* HB101 (pRK600).

A confirmação da deleção destes genes nas estirpes mutantes foi realizada por reações de PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos *Forward Upstream* e *Dowsntream Reverso* desenhados para cada gene, os quais estão listados no ANEXO 5 e figura 8 (item 5.1.10).

O resultado das reações de PCR, confirmando a obtenção das estirpes mutantes nocauteadas nos genes *flcA*, *narL*-like e *ipdC* está apresentado nas figuras 9 e 10.

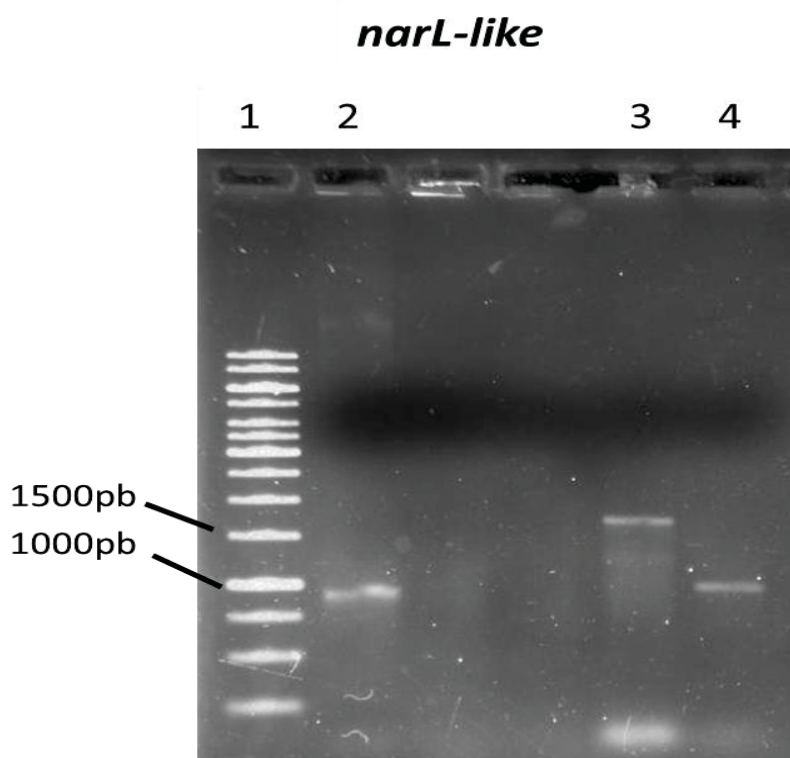
FIGURA 9 - CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO DOS GENES *ipdC* E *flcA* DE *Azospirillum brasilense* ESTIRPE FP2.



Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TAE 1X, das reações de PCR utilizando os primers externos (Fwd Upt e Rev Dwt) para a confirmação das regiões deletadas. A) Linha 1: 1kb ladder; linha 2: PCR com DNA da estirpe selvagem FP2 como molde (2556 pb); linha 3: PCR com o vetor PK18UDipdC como molde; linha 4 a 6: PCR das estirpes mutantes com o gene *ipdC* deletado (919 pb). B) Linha 1: 1kb ladder; linha 2: PCR com DNA da estirpe selvagem FP2 como molde (1620 pb); Linha 3: PCR com o vetor PK18UDflcA como molde; linha 4: PCR da estirpe mutante com o gene *flcA* deletado (972 pb).

FONTE: O autor (2018)

FIGURA 10 - CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO DO GENE *narL-like* DE *Azospirillum brasilense* ESTIRPE FP2.



Perfil eletroforético, em gel de agarose 1% em TAE 1X, das reações de PCR utilizando os primers externos (Fwd Upt e Rev Dwt) para a confirmação das regiões deletadas. Linha 1: 1kb ladder; linha 2: PCR com o vetor PK18UDnarL-like como molde; linha 3: PCR com DNA da estirpe selvagem FP2 como molde (1674 pb); linha 4: PCR da estirpe mutante com o gene *narL-like* deletado (981 pb).

FONTE: O autor (2018)

6.2 Organização estrutural da região dos genes *ipdC*, *flcA* e *narL-like* no genoma da estirpe FP2 de *Azospirillum brasilense* e análise *in silico* das proteínas

O genoma da estirpe FP2 de *A. brasilense* consiste de um único cromossomo e 6 plasmídeos (GUIZELINE, 2016). Na anotação realizada por Guizeline (2016) os genes *ipdC*, *flcA* e *narL-like* estão localizados no cromossomo da estirpe FP2. A localização no cromossomo, bem como as características gerais desses genes estão mostradas na tabela 6.

TABELA 6 - LOCALIZAÇÃO NO GENOMA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GENES *ipdC*, *flcA* E *narL-like* DA ESTIRPE FP2 DE *Azospirillum brasilense*

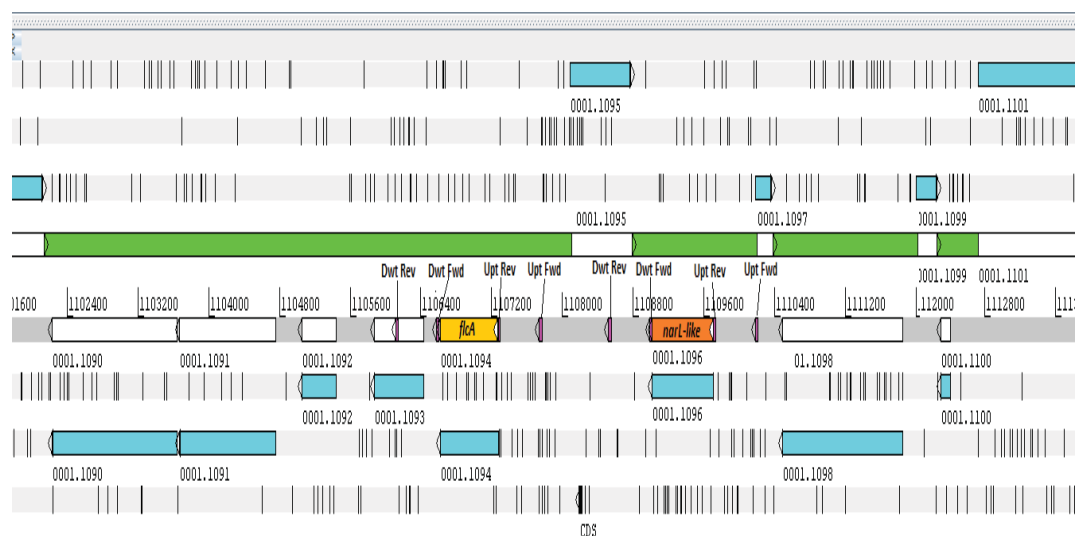
Gene	Locus Tag	Tamanho	Localização	Proteína	Funções	Referências
<i>ipdC</i>	Id.0001.0255	1638 pb	252806..254443	descarboxilas e indol-3-piruvato	Enzima chave da principal via da produção de AIA em <i>Azospirillum</i> sp.	Dobbelaere <i>et al.</i> , (2003)
<i>flcA</i>	id.0001.1094	648 pb	1106618..1107265	regulador transcricional membro da família LuxR	Controla a flocculação de <i>A. brasilense</i> , tanto em cultura como em associação com plantas. Mutantes $\Delta flcA$ -Sp7 são desprovidos de algum material polissacarídeo de superfície celular	Pereg <i>et al.</i> , (2001) Hou <i>et al.</i> , (2014)
<i>narL-like</i>	id.0001.1096	693 pb	1109011..1109703	Hipotético regulador transcricional	Função desconhecida	Este trabalho

FONTE: O autor (2018)

Na figura 11 são mostrados com maiores detalhes a organização estrutural dos genes *flcA* e *narL-like* no genoma da estirpe FP2. Esses genes estão localizados próximos no genoma de *A. brasilense* FP2, com o gene *flcA* localizado a montante e no mesmo sentido de transcrição do gene *narL-like* (fita anti-sense) (figura 11).

A escolha do gene *narL-like* foi baseada no resultado da análise transcricional de RNA-Seq de raízes de trigo (*Triticum aestivum*) colonizadas pela estirpe FP2 de *Azospirillum brasilense*. Esse gene foi bastante expresso durante a interação de *Azospirillum*-trigo com uma cobertura de 30,2 X (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014). Os outros dois genes, *ipdC* e *flcA*, foram escolhidos por serem genes já descritos na literatura como importantes para interação bactéria-planta (Ver referências na tabela 6). Além disso, uma vez que os genes *flcA* e *narL-like* estão localizados próximos no genoma de *A. brasilense* FP2 (figura 11) surgiu o interesse de pesquisar se existiria alguma relação de interação funcional entre estes genes.

FIGURA 11 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIÃO DO GENE *flcA* E *narL-like* NO GENOMA DE *A. brasilense* FP2.



As cores amarela e laranja indicam os genes *flcA* e *narL-like*, respectivamente. A cor rosa indica a localização dos primers desenhados a montante (*Upstream*) e a jusante (*Downstream*) do gene. O gene localizado entre *flcA* e *narL-like*, id 0001.1095, codifica para um provável regulador de resposta. Nota: Upt = *Upstream*; Dwt = *Downstream*; Fwd = *Forward*; Rev = *Reverse*
 FONTE: O autor utilizando o programa Artemis versão 16.0.0.

Com o auxílio do software String (SZKLARCZYK *et al.*, 2017) foi possível prever a associação funcional dos genes *flcA* e *narL-like* conforme demonstrado no ANEXO 4. Os genes que apresentaram maior valor de *Score* de associação funcional com *flcA* foram os que codificam para duas prováveis histidina quinase, CCC98758.1 e CCC96673.1, e para um regulador transcricional, CCC99123.1. As histidinas quinase (CCC98758.1 e CCC96673.1) e o regulador transcricional possuem interações com *flcA* determinadas experimentalmente, de vizinhança, de coexpressão e de dados minerados. Essas interações foram deduzidas pelo programa baseado em evidências observadas em genes ortólogos a *flcA* encontrados em outros organismos.

Com relação a provável rede interações de *narL-like* observa-se que *narL-like* possui maior associação funcional com a histidina quinase de 841 aminoácidos, CCC98758.1, seguida do regulador transcricional da família LuXR/FixJ, CCC98052.1, e de duas proteínas de função desconhecida, CCC98570.1 e CCC98571.1, sendo que apenas a interação de *narL-like* com o regulador transcricional é encontrada no nosso organismo de estudo *A.*

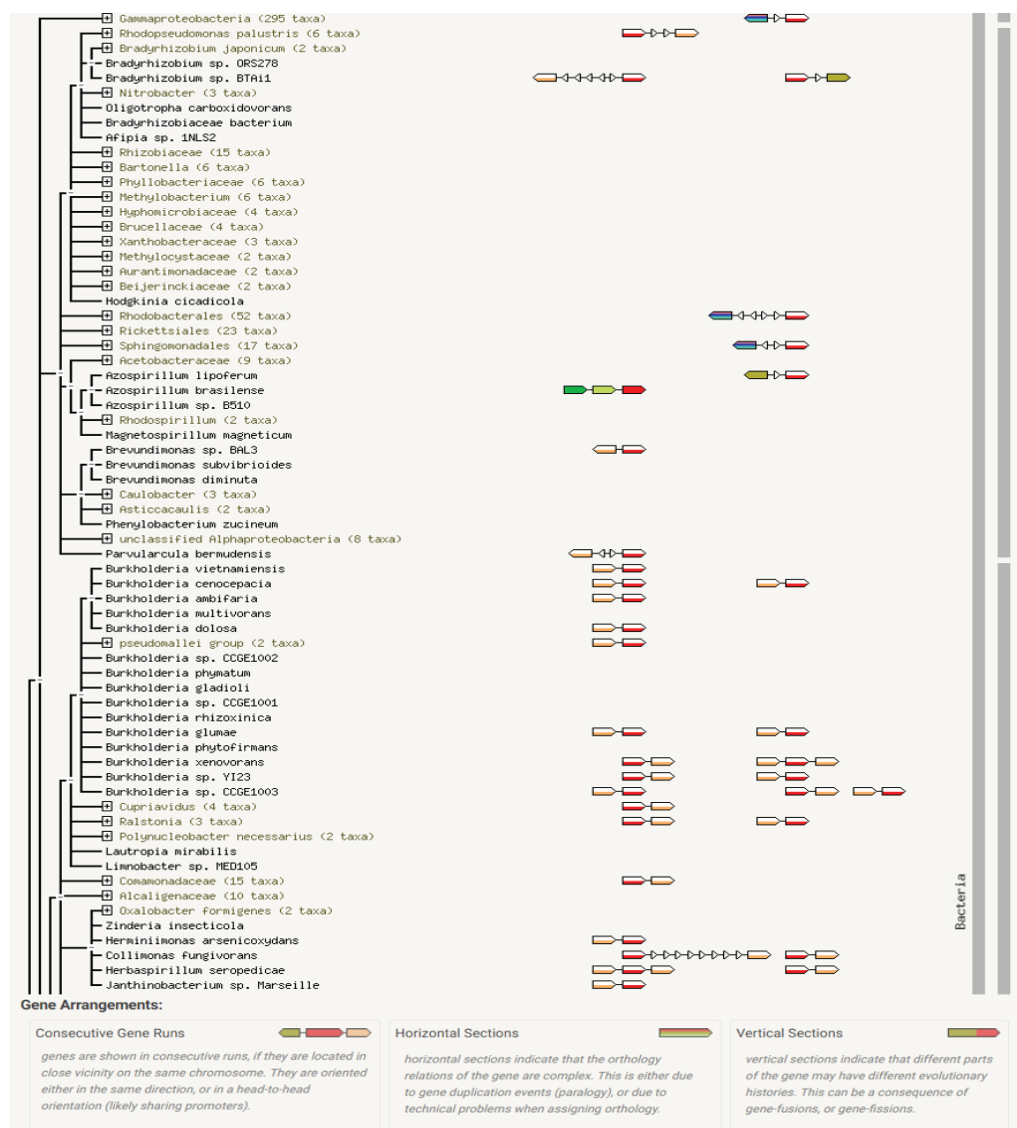
brasiliense e foi apontada no banco de dados curados, ou seja, já revisados manualmente (ANEXO 4).

De acordo com análise de vizinhança do gene *narL-like*, foi verificado que existem genes ortólogos a *narL-like* em outros organismos de alfa-proteobactérias como *Azospirillum lipoferum* 4B, *Brevundimonas* sp. BAL3 e *Bradyrhizobium* sp. BTAi1; e de beta-proteobactérias como algumas espécies do gênero *Burkholderia*, como *B. vietnamiensis* e *B. ambifaria*; *Herbaspirillum seropedicae*, entre outros. No entanto, nenhum desses genes ortólogos, encontrados em espécies de PGPR ou não, possuem a mesma organização gênica encontrada em *Azospirillum brasiliense* estirpe Sp245 (figura 12).

Os genes preditos vizinhos a *narL-like* em *A. brasiliense* codificam para duas proteínas com função desconhecida, CCC98570.1 e CCC98571.1, contendo 33 e 44 aminoácidos, respectivamente. Em *A. lipoferum* estirpe 4B, o gene consecutivo ao gene ortólogo a *narL-like*, CCC98052.1, possivelmente codifica um regulador transcricional da família LuxR. Já em outros organismos foi observado que existe conservação de dois genes localizados próximos a genes ortólogos a *narL-like*: o gene que codifica um regulador transcricional citado anteriormente, CCC98052.1, e o gene, CCC98758.1, que codifica uma possível proteína sensora histidina quinase (figura 12). Além disso, esses genes, CCC98052.1 e CCC98758.1, co-ocorrem com o gene *narL-like* nas três estirpes de *Azospirillum* (figura 14), mostrando ser típica do gênero.

Para as estirpes do gênero *Azospirillum* a análise de conservação de vizinhança gênica do gene *flcA* não apresentou nenhum gene (figura 13). Porém, observou-se que algumas bactérias como em *Cupriavidus taiwanensis*, *Polynucleobacter necessarius asymbioticus* e *Hyphomicrobium* sp. MC1, possuem genes para prováveis proteínas sensoras histidina quinase localizadas próximas a genes ortólogos a *flcA* (figura 13). Também foi possível observar que genes que codificam para esta proteína sensora histidina quinase, CCC98758.1 e CCC96673.1, co-ocorrem com *flcA* nas estirpes do gênero *Azospirillum* (figura 15).

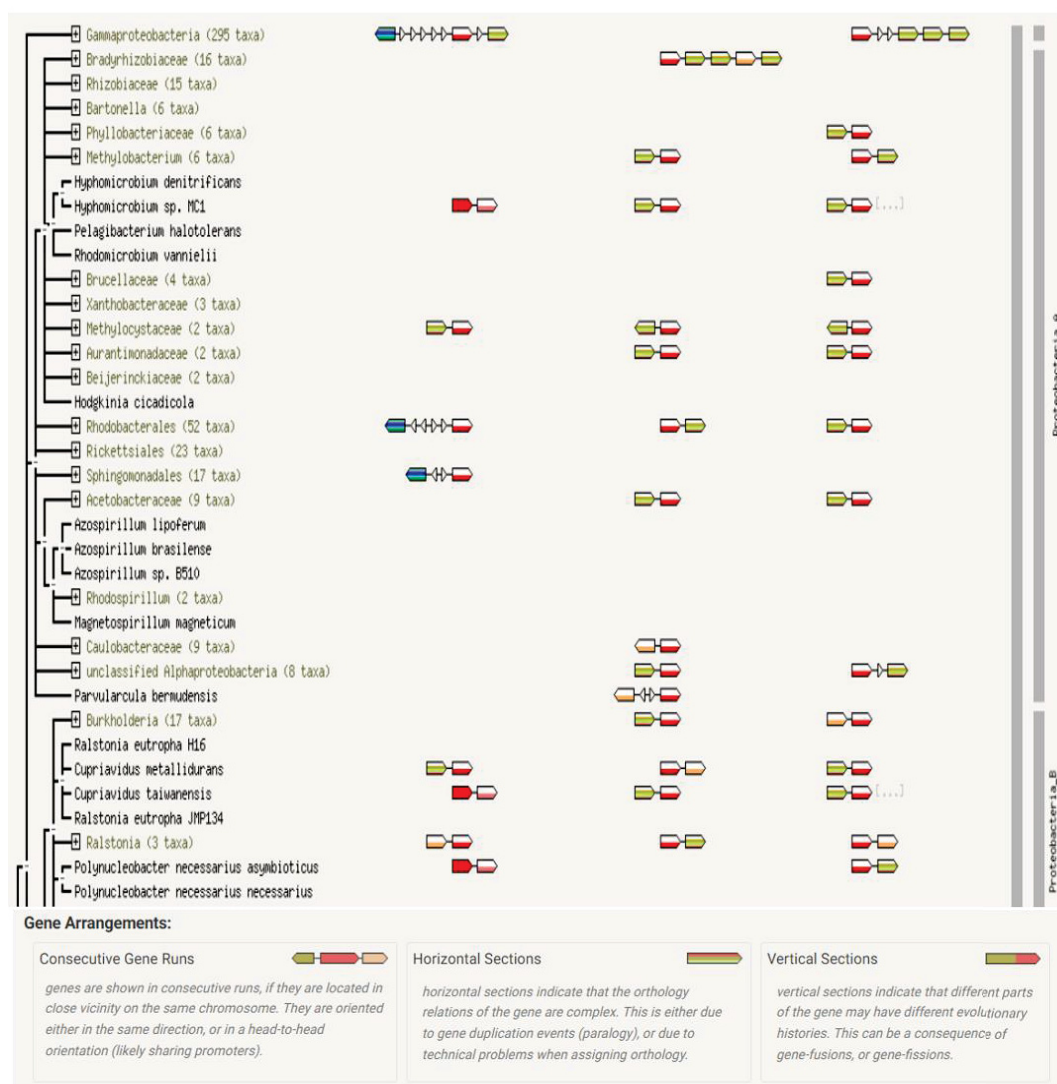
FIGURA 12 – CONSERVAÇÃO DE VIZINHANÇA GÊNICA DO GENE *narL-like* EM ALGUMAS ALFA-PROTEOBACTÉRIAS E BETA-PROTEOBACTÉRIAS.



Em vermelho : gene *narL-like*. Em vermelho e branco : predição ortóloga de *narL-like*, genes que possivelmente codificam um regulador transcricional da família Lux/R. Em verde-escuro  e verde-claro : genes que codificam uma proteína hipotética, CCC98570.1 e CCC98571.1, respectivamente. Em verde-oliva : predição ortóloga de CCC98052.1, genes que possivelmente codificam um regulador transcricional da família Lux/R. Em laranja e branco , predição ortóloga de CCC98758.1, genes que possivelmente codificam uma proteína sensora histidina quinase. Em diferentes cores de azul (, , , ): a cor  predição ortóloga para CCC98448.1, genes que possivelmente codificam uma enoil-CoA hidratase-isomerase; a cor  predição ortóloga para CCC99282.1, genes que possivelmente codificam para uma enoil-CoA hidratase; e a cor  predição ortóloga para CCC97058.1, genes que possivelmente codificam uma enoil-CoA hidratase/carnitine racemase. Em roxo: predição ortóloga para CCC98149.1, genes que possivelmente codificam uma enoil-CoA hidratase-isomerase. Em lilás: predição ortóloga para paaF1, genes que possivelmente codificam para uma enoil-CoA hidratase-isomerase. Em rosa: predição ortóloga para paaF2, genes que possivelmente codificam uma enoil-CoA hidratase. As seções horizontais em diferentes cores de azul, roxo, lilás e rosa são representadas por .

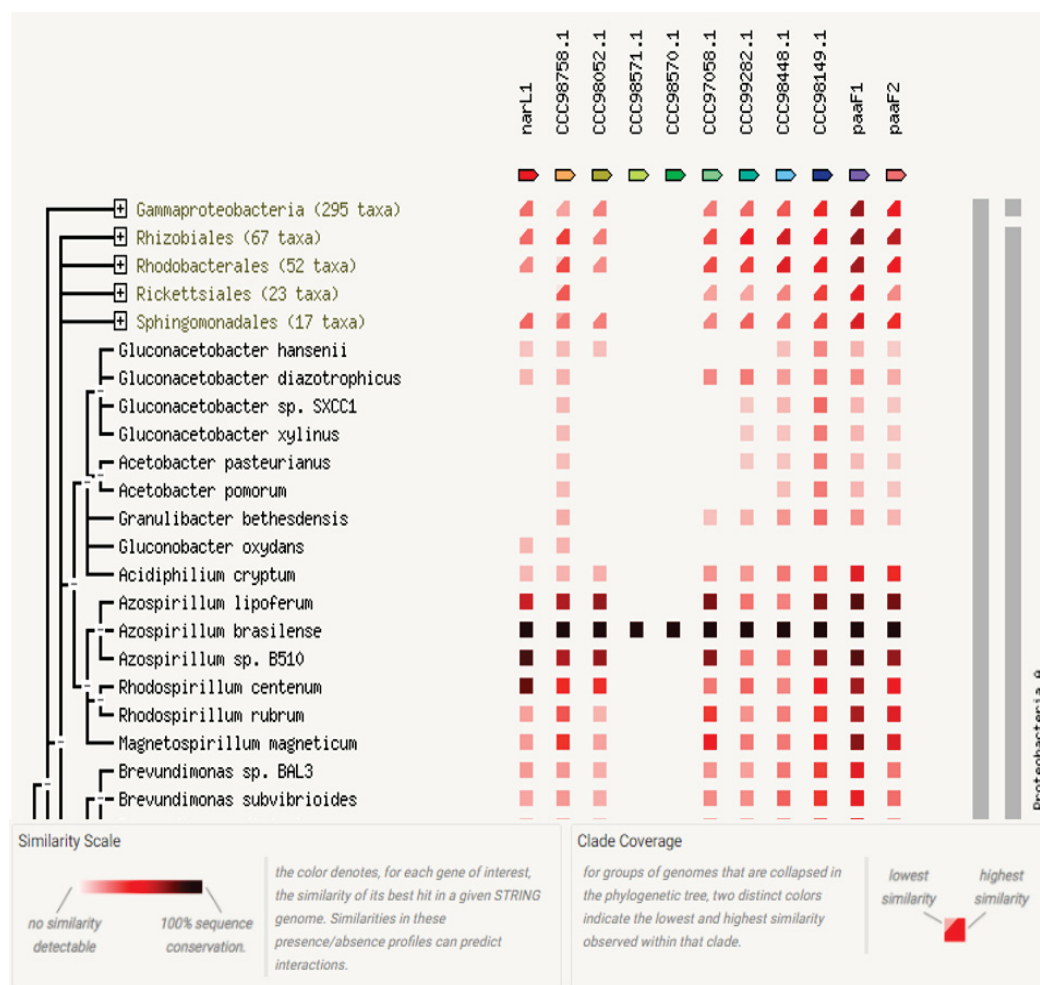
FONTE: String (2017)

FIGURA 13. CONSERVAÇÃO DE VIZINHANÇA GÊNICA DO GENE *flcA* EM ALGUMAS ALFA-PROTEOBACTÉRIAS E BETA-PROTEOBACTÉRIAS.



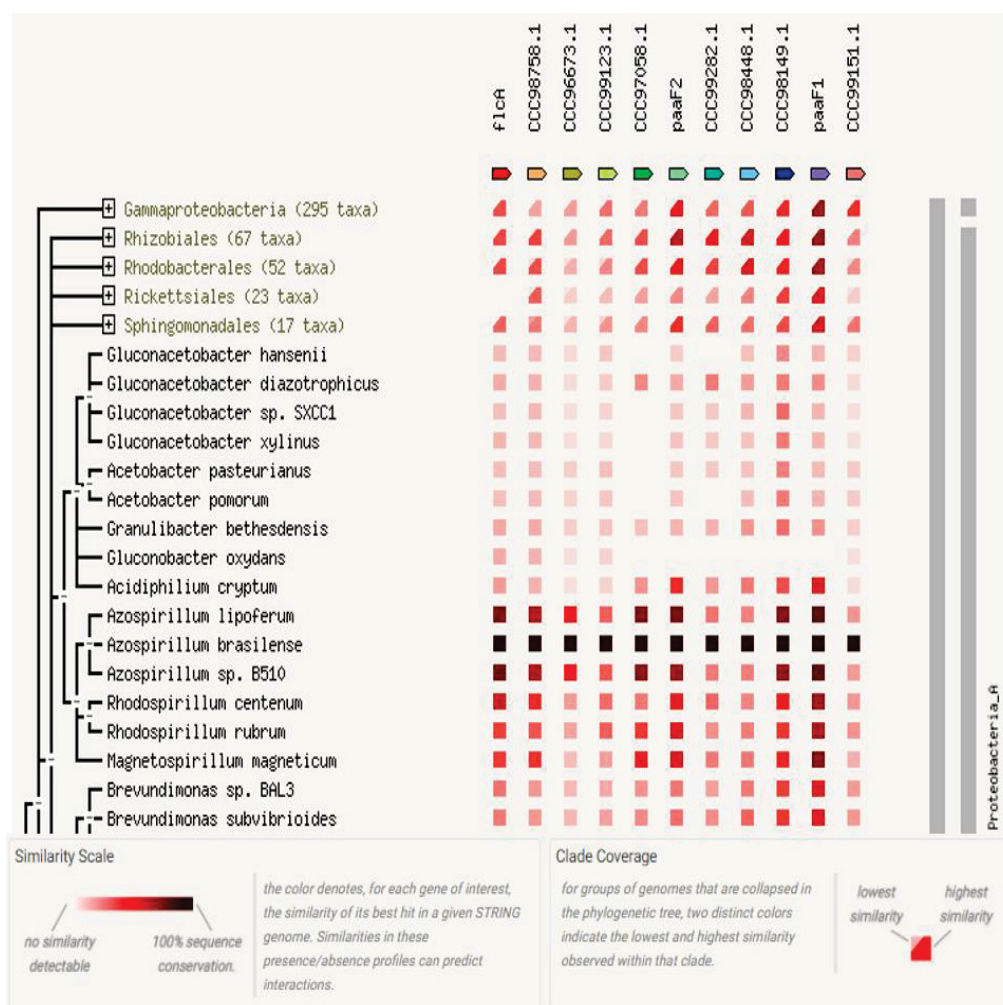
Em vermelho : gene *flcA*. Em vermelho e branco : predição ortóloga de *flcA*, genes que possivelmente codificam um regulador transcricional da família Lux/R. Em rosa e branco : predição ortóloga de CCC99151.1, genes que possivelmente codificam uma proteína sensora. Em laranja e branco , predição ortóloga de CCC98758.1, genes que possivelmente codificam uma proteína sensora histidina quinase. As seções horizontais em rosa, verde-claro e verde-oliva  representam: rosa representa predição ortóloga de CCC99151.1, genes que possivelmente codificam uma proteína sensora; verde-claro representa predição ortóloga de CCC99123.1, genes que possivelmente codificam uma proteína sensora histidina quinase; e verde-oliva representa predição ortóloga de CCC96673.1, genes que possivelmente codificam uma proteína histidina quinase. As seções horizontais em  representam: a cor  representa predição ortóloga para CCC98448.1, genes que possivelmente codificam uma enoil-CoA hidratase-isomerase; a cor  representa predição ortóloga para CCC99282.1, genes que possivelmente codificam para uma enoil-CoA hidratase; a cor  representa predição ortóloga para paaF2, genes que possivelmente codificam uma enoil-CoA hidratase; a cor roxa representa predição ortóloga para CCC98149.1, genes que possivelmente codificam uma enoil-CoA hidratase-isomerase; a cor lilás representa predição ortóloga para paaF1, genes que possivelmente codificam para uma enoil-CoA hidratase-isomerase; e a cor rosa representa predição ortóloga de CCC99151.1, genes que possivelmente codificam uma proteína sensora.

FONTE: String (2017)

FIGURA 14 - ANÁLISE DE CO-OCORRÊNCIA DO GENE *narL-like*.

Nota: CCC98758.1= provável proteína sensora histidina quinase; CCC98052.1= provável regulador transcricional da família LuxR; CCC98571.1= proteína de função desconhecida; CCC98570.1= proteína de função desconhecida; CCC97058.1= provável enoil-CoA hidratase/carnitina racemosa; CCC99282.1= provável enoil-CoA hidratase; CCC98448.1= provável enoil-CoA hidratase-isomerase; CCC98149.1= provável enoil-CoA hidratase-isomerase; paaF1= enoil-CoA hidratase-isomerase; paaF2= enoil-CoA hidratase;

FONTE: String (2017)

FIGURA 15 - ANÁLISE DE CO-OCORRÊNCIA DO GENE *flcA*.

Nota: CCC98758.1= provável proteína sensora histidina quinase; CCC96673.1= provável proteína histidina quinase; CCC99123.1= provável proteína sensora histidina quinase; CCC97058.1= provável enoil-CoA hidratase/carnitina racemosa; paaF2= enoil- CoA hidratase; CCC99282.1= provável enoil-CoA hidratase; CCC98448.1= provável enoil-CoA hidratase-isomerase; CCC98149.1= provável enoil-CoA hidratase-isomerase; paaF1= enoil-CoA hidratase-isomerase; CCC99151.1=provável proteína sensora.

FONTE: String (2017)

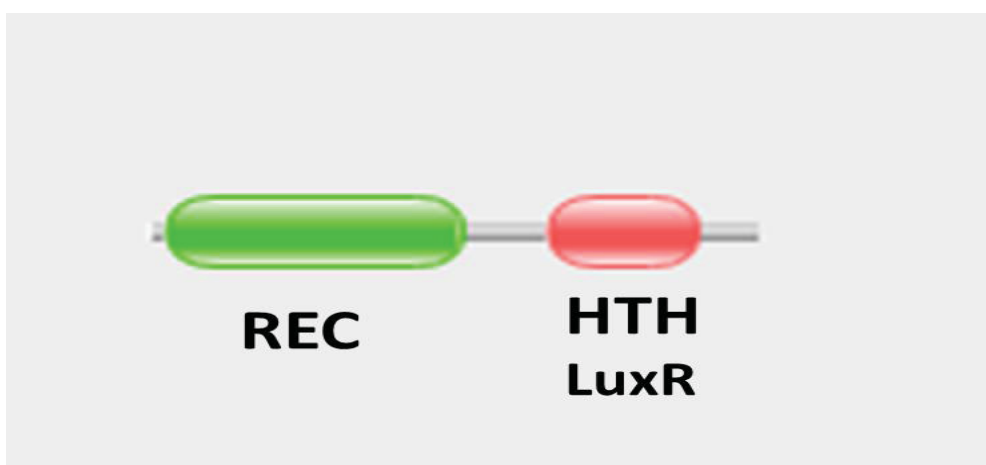
A provável interação funcional de proteínas quinase de histidina com os reguladores transcricionais, *narL-like* e *flcA*, era esperado, visto que a proteína sensora histidina quinase (HQ) associada a uma proteína reguladora de resposta (RR) cognata, compõe o sistema de sinalização de dois componentes (SDC ou TCS - *Two component system*) típico, comumente encontrado em bactérias (STOCK *et al.*, 2000).

O sistema de sinalização de dois componentes é um mecanismo predominante utilizado pelas bactérias para regular a expressão de genes em respostas às condições ambientais. Este sistema é baseado em uma via de

fosfotransferência conservada. Após a percepção de um estímulo ambiental, a HQ sofre autofosforilação em um resíduo de histidina conservado, e então o grupo fosforil gerado é transferido para o resíduo de aspartato conservado no domínio receptor do RR, ativando seu domínio de saída para efetuar a resposta, ou seja, a ativação ou inibição da transcrição gênica (CAPRA e LAUB, 2012)

A maioria (quase 70%) dos RRs classificados são fatores de transcrição com domínios efetores de ligação ao DNA. Esta classe de RRs consiste de dois domínios: um domínio receptor N-terminal que contém o sítio conservado de fosforilação de aspartato e um domínio de saída ou efector, C-terminal, de ligação ao DNA (STOCK e GAO, 2009). Assim como a proteína reguladora de transcrição da família LuxR, FlcA (HOU *et al.*, 2014), a proteína NarL-like, possui dois domínios típicos de reguladores transcricionais: o domínio receptor de proteínas reguladoras de resposta (REC), e o domínio hélice-volta-hélice (HTH-helix-turn-helix) do tipo LuxR de ligação ao DNA (Figura 16- dados obtidos através do Pfam versão 31.0). Esse resultado confirma a semelhança estrutural da proteína codificada pelo gene *narL-like* com a proteína reguladora de resposta NarL que associada à proteína sensora de membrana NarX forma um sistema clássico de dois componentes, NarX/NarL, responsável pela regulação das nitrato redutases da membrana respiratória em *E.coli* e *P. aeruginosa* (MORENO VIVIÁN *et al.*, 1999; VAN ALST *et al.*, 2007).

FIGURA 16 - DOMÍNIOS DAS PROTEÍNAS *narL-like* E *flcA*.



A abreviação REC refere-se ao domínio receptor de resposta e o HTH refere-se ao domínio hélice-volta-hélice de ligação ao DNA do tipo LuxR.

FONTE: Pfam 31.0.

Os resultados obtidos através do programa String e Pfam sugerem que possivelmente exista uma interação funcional de uma proteína sensora quinase de histidina com a proteína reguladora de resposta *narL-like*, bem como com a proteína FlcA, formando um prototípico sistema de dois componentes.

As bactérias desenvolveram mecanismos sofisticados para detectar e responder aos seus ambientes, que envolvem frequentemente vias de transdução de sinal de dois componentes (STOCK e GAO, 2009). Os resultados obtidos neste estudo indicam que a proteína NarL-like possui domínios típicos de reguladores transcricionais da família LuxR (domínio REC e HTH) que respondem a estímulos ambientais geralmente associados a uma histidina quinase sensora. Isso, associado ao fato que o nível de expressão do gene *narL-like* foi significativo no transcriptoma de *Azospirillum* em associação com trigo (CAMILIOS-NETO, *et al.*, 2014), sugere que este gene deve atuar na regulação transcricional gênica e que esta regulação pode estar relacionada com a interação desta bactéria com a planta hospedeira.

6.3 Determinação da atividade da nitrogenase

Como citado anteriormente ainda não é conhecida a função do gene *narL-like* em *A. brasilense*. Curiosamente, o mutante $\Delta narL-like-FP2$ apresenta maior atividade nitrogenase que a estirpe selvagem, e essa diferença é significativa pelo teste t ($p \leq 0,05$) (gráfico 10). Esse resultado sugere que a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico foi afetada pela deleção do gene no mutante $\Delta narL-like-FP2$ e que essa mutação parece ter favorecido a atividade da nitrogenase. No entanto, a razão deste efeito não está clara ainda.

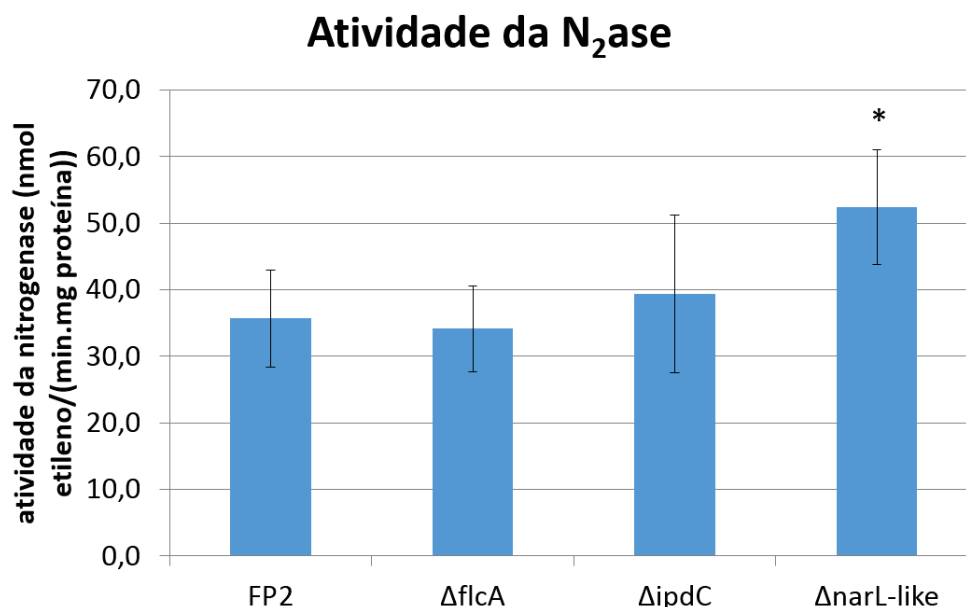
Os mutantes $\Delta ipdC-FP2$ e $\Delta flcA-FP2$ apresentaram o mesmo nível de atividade nitrogenase que a estirpe selvagem (~ 30 a 40 nmol de etileno/min.mg proteína) (gráfico 10). O resultado obtido para o mutante $\Delta flcA-FP2$ corrobora o obtido no trabalho de PEREG GERK *et al.* (1998) que avaliaram a atividade nitrogenase de mutantes *flcA* tn5 induzidos incapazes de flocular, Sp7-72001, -72002 e -72004.

Curiosamente o envolvimento do gene *flcA* no metabolismo de nitrogênio foi sugerida por Valverde *et al.* (2006) e Hou *et al.* (2014) que estudaram o controle de *flcA* a nível de mRNA pelo cDNA-AFLP (usando mutante tn5 Sp72002) e a nível de proteína por 2-DE (usando mutante $\Delta flcA-Sp7$),

respectivamente. No estudo de Valverde *et al.* (2006) uma proteína transmembrana da superfamília dos facilitadores principais que realiza o transporte de nitrato e nitrito, NarK (CLEGG *et al.*, 2002; JIA *et al.*, 2005), foi *down* regulada por FlcA, enquanto que no estudo de Hou *et al.*, (2014) *narL*, que é um ativador de transcrição de NarK (BONNEFOY *et al.*, 1992) foi “*up*” regulado por FlcA.

O gene *narK* foi analisado posteriormente usando qRT-PCR por Hou *et al.*, (2014). A análise revelou um aumento na expressão de *narK* em $\Delta flcA$ -Sp7 em comparação a estirpe selvagem Sp7 nas condições de meio rico e de floculação, ou seja, células cultivadas em meio líquido NB (Difco) e em meio NFbHP-lactato suplementado com 8 mM frutose e 0,5 mM KNO₃, respectivamente. O aumento da expressão de *narK* no mutante $\Delta flcA$ -Sp7 em comparação a estirpe Sp7 em ambas as condições testadas e a diminuição da expressão de *glnA* na presença de FlcA, sugerem que este gene pode controlar a assimilação e a fixação de nitrogênio através da regulação negativa da glutamina sintetase em *Azospirillum* (HOU *et al.*, 2014), visto que a glutamina sintetase realiza um papel importante na assimilação de nitrogênio e, por isso, indiretamente, na regulação de enzimas envolvidas na fixação de nitrogênio, tais como a nitrogenase (ZAMAROCZY *et al.*, 1993; VAN DOMMELEN *et al.*, 2003)

GRÁFICO 10 - ATIVIDADE DA NITROGENASE DAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense* – FP2 E SEUS MUTANTES.



A análise da atividade da nitrogenase foi realizada em meio semi-sólido NFbHP-lactato acrescido de 0,5 mM de glutamato, em triplicata. Diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste *t* de Student) entre a atividade nitrogenase da estirpe selvagem e as estirpes mutantes é indicada por asterisco.

FONTE: O autor (2018)

6.4 Produção de ácido indol acético (AIA)

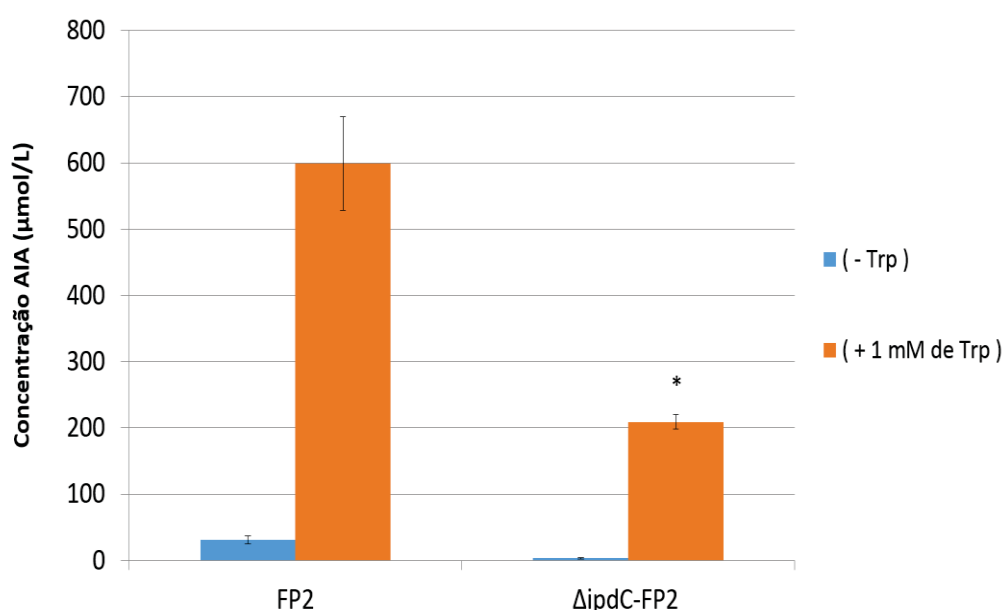
A produção de ácido-3-indol acético (AIA) por *Azospirillum brasilense* pode ocorrer através de três vias metabólicas, usando o triptofano como precursor: (I) a via indol-3-piruvato (SPAEPEN *et al.*, 2007), (II) a via indol-3-acetamida e (III) a via indol-3-acetonitrila (CARREÑO-LOPEZ *et al.*, 2000). A principal via de produção de AIA em *A. brasilense* é a via do indol-3-piruvato (IPA), que tem como enzima chave a descarboxilase-3-indol-piruvato, codificada pelo gene *ipdC* (PRINSEN *et al.*, 1993).

Assim, para avaliar se a produção de AIA no mutante $\Delta ipdC$ -FP2 foi afetada pela deleção do gene *ipdC*, a produção desta auxina foi avaliada e comparada com a estirpe selvagem em meio contendo 1 mM de triptofano. O mutante $\Delta ipdC$ -FP2 produziu 33% do nível da produção de AIA da estirpe selvagem FP2 (gráfico 11). Essa redução dos níveis de produção de AIA observada no mutante, está de acordo com o descrito na literatura para os mutantes *ipdC* de *A. brasilense*: como por exemplo, o mutante *ipdC* da estirpe

Sp245 mostrou uma redução de 90% da produção de AIA da estirpe selvagem, indicando a importância da via do ácido indol-3-piruvato na produção da auxina (PRINSEN *et al.*, 1993); o mutante *ipdC* da estirpe Sp7 obteve uma redução de ~ 50% da síntese de AIA (ZIMMER *et al.*, 1998); e o mutante *knockout-ipdC* da estirpe SM que também mostrou níveis de produção de AIA menores (~ 51%) que a estirpe selvagem (MALHOTRA e SRIVASTAVA, 2008).

Portanto, nosso resultado combinado com os relatos de outros, indicam que a redução dos níveis de produção de AIA nos mutantes *ipdC* de *A. brasilense* é variável nas diferentes estirpes. Além disso, como citado anteriormente, existem outras vias de síntese de AIA em *A. brasilense* que podem estar sendo utilizadas pelas estirpes mutantes, o que, possivelmente, poderia explicar essa variabilidade de estirpe para estirpe.

GRÁFICO 11 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO PELA ESTIRPE SELVAGEM DE *Azospirillum brasilense* (FP2) E PELO MUTANTE $\Delta ipdC$ -FP2



A quantificação da produção de AIA foi realizada em meio NFbHPN-lactato sem adição de triptofano (-Trp) e com adição de 1 mM de triptofano (+ 1 mM de Trp) determinadas 72h após a inoculação pelo ensaio de Salkowski. Diferença significativa pelo teste t ($p \leq 0,05$) é indicado por asterisco. Nota: Trp= triptofano.

FONTE: O autor (2018)

Um mutante originado da estirpe Yu62 de *A. brasilense*, interrompido no gene *aldA*, mostrou níveis de produção de AIA significativamente menores que

a estirpe selvagem. Este gene (*aldA*) codifica para a enzima aldeído desidrogenase, que catalisa a conversão de indol-3-acetaldeído a ácido indol-3-acético, último passo da via IPA (XIE *et al.*, 2005). Isso, associado ao fato que o mutante *ipdC* da estirpe SM de *A. brasilense* apresenta diminuição significativa na atividade enzimática da desidrogenase-indol-3-piruvato, sugere que os níveis de AIA comparativamente mais baixos nas estirpes mutantes *ipdC* são causados pela redução da atividade de IpdC, uma vez que, esta enzima é crucial na conversão de indol-3-piruvato a indol-3-acetaldeído na via IPA; e reforça a importância desta via na biossíntese de AIA em *A. brasilense*.

Diante dessa variabilidade nos níveis de produção de AIA mostradas nas estirpes mutantes *ipdC* de *A. brasilense*, a possibilidade de mais de uma cópia do gene *ipdC* em *A. brasilense* já foi levantada na estirpe Sp7 (ZIMMER *et al.*, 1998) e mais recente, na estirpe SM (MALHOTRA e SRIVASTAVA, 2008). Por isso, foi realizado uma nova busca da sequência do gene *ipdC* no genoma da estirpe FP2 (GUIZELINE, 2016). Porém, não foi encontrada nenhuma outra cópia do gene *ipdC* no genoma da estirpe. Outra hipótese seria a existência no genoma de *A. brasilense* uma enzima genérica que possa realizar a mesma função da IpdC. Logo, esta ainda é uma questão que está aberta a investigação.

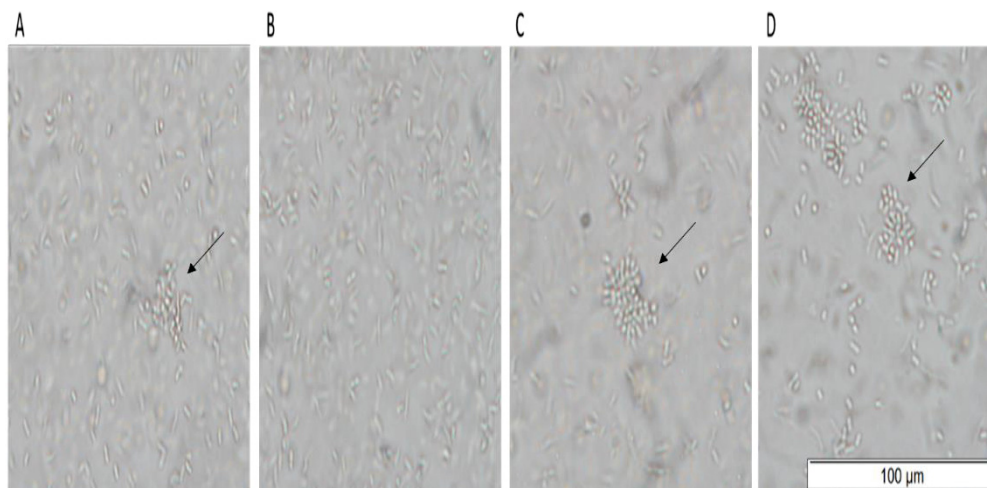
A produção de fitohormônios e a fixação biológica de nitrogênio foram sugeridos como os principais fatores de promoção de crescimento vegetal proporcionados por *Azospirillum* (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000). Logo, a obtenção do mutante *ipdC* na estirpe FP2 de *A. brasilense* é importante, uma vez que este mutante poderá ser utilizado posteriormente em estudos de promoção de crescimento vegetal, a fim de comparar se a indução de crescimento é devido a FBN ou a produção de AIA por *A. brasilense*.

6.5 Ensaio de Floculação e de Ligação ao vermelho congo

A capacidade das estirpes de *A. brasilense* flocular foi verificada em meio mínimo com uma razão elevada de C:N (frutose:KNO₃), que é conhecido como meio ótimo para induzir a formação de flocos em *A. brasilense* (SADASIVAN e NEYRA, 1985). As células da estirpe selvagem FP2 e as estirpes

mutantes, *ΔnarL-like-FP2* e *ΔipdC-FP2*, flocluraram nestas condições, enquanto que *ΔflcA-FP2* não floclurou (figura 17).

FIGURA 17 - MICROSCOPIA ÓTICA DAS ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*

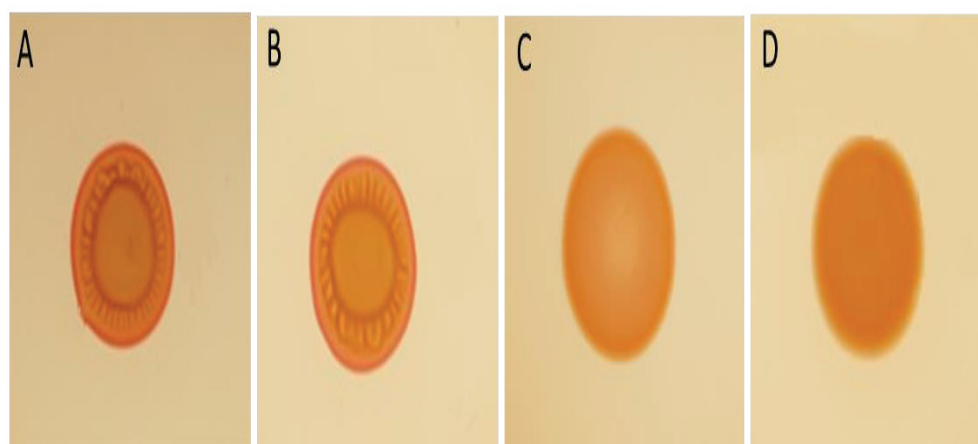


As estirpes foram cultivadas por 6h no meio de floclulação (NFbHP-lactato acrescido de 8mM de frutose e 0,5mM de KNO₃). As letras representam: (A) estirpe selvagem FP2; (B) *ΔflcA*; (C) *ΔnarL-like* e (D) *ΔipdC*.

FONTE: O autor (2018)

A capacidade de agregação celular e floclulação em *Azospirillum sp.* foi relacionada a produção de polissacarídeos (BURDMAN *et al.*, 1998) que são excretados ou expostos em superfícies celulares. Assim, para investigar a formação de polissacarídeos de superfície foi verificada a capacidade do vermelho congo se ligar as estirpes, uma vez que este corante interage com vários polissacarídeos de bactérias. A estirpe mutante *ΔipdC-FP2* e a estirpe selvagem formaram colônias vermelhas escuras, mais secas e de superfície mais rugosa quando cultivadas em meio ágar contendo vermelho congo, enquanto *ΔflcA-FP2* e *ΔnarL-like-FP2* formaram colônias vermelhas claras e de superfície lisa (figura 18). Esses resultados sugerem que, apesar de *ΔnarL-like-FP2* ser capaz de floclular, possui alteração na composição de polissacarídeos de superfície celular quando comparado a estirpe selvagem, assim como o mutante *ΔflcA-FP2*.

FIGURA 18 - ENSAIO DE LIGAÇÃO AO VERMELHO-CONGO.



Culturas de *A. brasilense* (5uL) foram plaqueadas em meio NFbHPN-lactato contendo 40 ug/mL de vermelho-congo e observadas após 4 dias de incubação a 30° C. Foram utilizadas as seguintes estirpes de *A. brasilense*: estirpe selvagem FP2 (A), $\Delta ipdC$ (B), $\Delta flcA$ (C) e $\Delta narL-like$ (D).

FONTE: O autor (2018)

Os resultados aqui apresentados corroboram outros trabalhos descritos para os mutantes *flcA*, como os mutantes Tn5 induzido Sp7-2001, -2002 e -2004 (PEREG-GERK *et al.*, 1998), e o mutante $\Delta flcA$ -Sp7 (HOU *et al.*, 2014). Ao contrário da estirpe selvagem Sp7, mutantes *flcA* não floculam, se ligam ao vermelho-congo em menor grau que a estirpe selvagem e são desprovidos de algum material polissacarídeo de superfície celular (HOU *et al.*, 2014).

Com estes ensaios o fenótipo de floculação e de ligação ao vermelho congo do mutante $\Delta flcA$ -FP2 foi confirmado, além de constatar a menor capacidade do mutante $\Delta narL-like$ -FP2 de se ligar ao vermelho congo. Mas o que *flcA* e *narL-like* podem fazer para alterar a composição de polissacarídeos em *A. brasilense*?

Na análise de expressão diferencial realizada por Hou *et al.* (2014) a enzima citrato sintase (*GltA*) foi “up” regulada na estirpe selvagem Sp7 em comparação à $\Delta flcA$ -Sp7. A citrato sintase é a primeira enzima do ciclo ácido tricarboxílico que utiliza acetil-CoA como substrato. Esta enzima foi relacionada à produção de EPS, uma vez que o mutante de *gltA* de *Sinorhizobium meliloti* (citrato sintase inativa), teve alteração na sua composição de polissacarídeos de superfície celular (MORTINER *et al.*, 1999).

Autores mostraram alteração na composição de polissacarídeos de superfície nos mutantes *flcA* de *A. brasilense* (PEREG GERK *et al.* 1998; 2000), assim, Hou *et al.* (2014) sugerem que um dos mecanismos pelos quais a proteína FlcA interfere na composição do EPS pode ser ativando a GlcA alterando o fluxo através do ciclo ácido tricarboxílico e promovendo completa assimilação do açúcar no EPS.

Outra proteína que foi ativada na estirpe selvagem Sp7 em comparação $\Delta flcA$ -Sp7 foi UTP-glucose-1-fosfato uridililtransferase (GalU). Esta proteína catalisa a formação de UDP-glucose, que está envolvida na síntese de estruturas de superfície glicosiladas e na biossíntese enzimática de carboidratos (SCHULMAN e KENNEDY, 1977). Mutações no gene *galU* levou a redução da virulência das bactérias patogênicas *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella flexneri*, que foram atribuídas à mudanças na produção dos polissacarídeos de superfície, como EPS e LPS (CHANG *et al.*, 1996; SANDLIN *et al.*, 1995). A ativação de GalU na estirpe selvagem em comparação ao $\Delta flcA$ -Sp7 levaram os autores sugerir que FlcA possa regular a produção de EPS através também da regulação de GalU (HOU *et al.*, 2014).

A proteína UDP-N-acetilglucosamina aciltransferase, LpXA, foi super expressa no mutante $\Delta flcA$ -Sp7 em condições de floculação. Esta enzima LpxA está envolvida na biossíntese do lipídio-A, que é um componente do LPS da membrana externa em bactérias gram negativas (WILLIAMS e RAETZ, 2007). Assim, Hou *et al.*, (2014) sugeriram que o FlcA pode estar envolvido ainda na biossíntese de LPS da membrana externa, uma vez que esta enzima foi *up* regulada no mutante $\Delta flcA$ -Sp7 em condições de floculação.

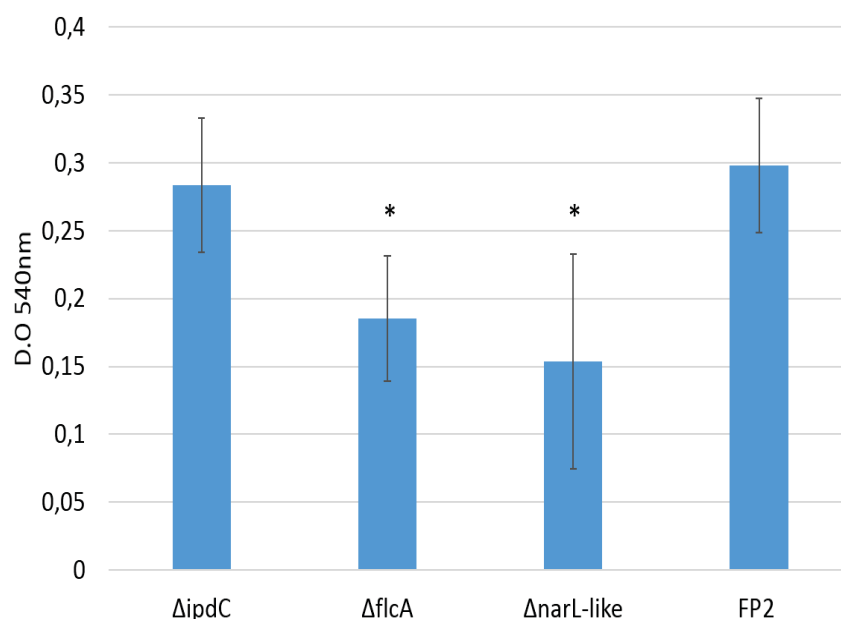
Em relação a NarL-like não foi encontrada literatura que descreva a função desta proteína em outros organismos, para que fosse possível a investigação de alguma relação da proteína com a alteração do material polissacarídico de superfície. Logo, a razão desta alteração não está evidente ainda.

6.6 Ensaio de formação de biofilme em fibra de vidro

Para avaliar a formação de biofilme, as estirpes selvagem e mutantes de *Azospirillum brasilense* FP2, foram cultivadas na presença de fibra de vidro como substrato sólido. Após 72h de crescimento, o biofilme formado foi quantificado

por coloração com violeta cristal das bactérias aderidas à fibra de vidro. As estirpes mutantes $\Delta flcA$ -FP2 e $\Delta narL$ -like-FP2 mostraram uma redução de 40 e 50 % na formação de biofilme quando comparada a estirpe selvagem, respectivamente. A formação de biofilme pela estirpe mutante $\Delta ipdC$ -FP2 foi similar a selvagem (gráfico 12).

GRÁFICO 12 - FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO POR *A. brasilense*



Culturas de *A. brasilense* foram cultivadas em meio NFbHPN-lactato líquido com adição de 50 mg de fibra de vidro por 72h. A formação de biofilme foi quantificada por coloração com violeta cristal das bactérias aderidas à fibra de vidro. Diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste *t* de Student) entre a formação de biofilme da estirpe selvagem e as estirpes mutantes é indicada por asterisco.

FONTE: O autor (2018)

Esses resultados reforçam os dados obtidos no ensaio de ligação ao vermelho congo, sugerindo uma mudança ou falta de polissacarídeos de superfície celular nos mutantes $\Delta flcA$ -FP2 e $\Delta narL$ -like-FP2, visto que a formação de biofilme em *A. brasilense* tem sido relacionada a biossíntese de polissacarídeos de superfície (BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, 2000; BURDMAN *et al.*, 2000).

Além disso, a redução na formação de biofilme no mutante $\Delta flcA$ -FP2 reforça a evidência molecular obtida por Hou *et al.*, (2014) de que FlcA pode estar envolvida na regulação de genes que estão envolvidos na biossíntese de polissacarídeos de superfície, como EPS e LPS.

Para averiguar se as alterações biológicas observadas nos mutantes, nos ensaios efetuados até o momento, poderiam afetar a colonização das raízes pelas estirpes de *A. brasilense*, foram realizados ensaios de interação destas estirpes com a planta hospedeira.

6.7 Ensaio de colonização

A colonização de raízes de trigo pelas estirpes de *A. brasilense* foi avaliada 30 min após a inoculação (população aderida), e em 1, 3, 7 e 12 dias após inoculação (populações planctônicas e epifíticas). Não houve diferença no número de células aderidas a superfície das raízes (10^6 UFC.g⁻¹ de raiz) entre as estirpes (gráfico 13). A população planctônica das estirpes, ao longo do tempo, variou entre 10^5 a 10^8 células por mL (gráfico 14). A população planctônica de *ΔnarL-like* aparentemente foi maior que a da estirpe selvagem ao longo do tempo. No entanto, este aumento não foi estatisticamente significativo pelo teste t ($p \leq 0,05$).

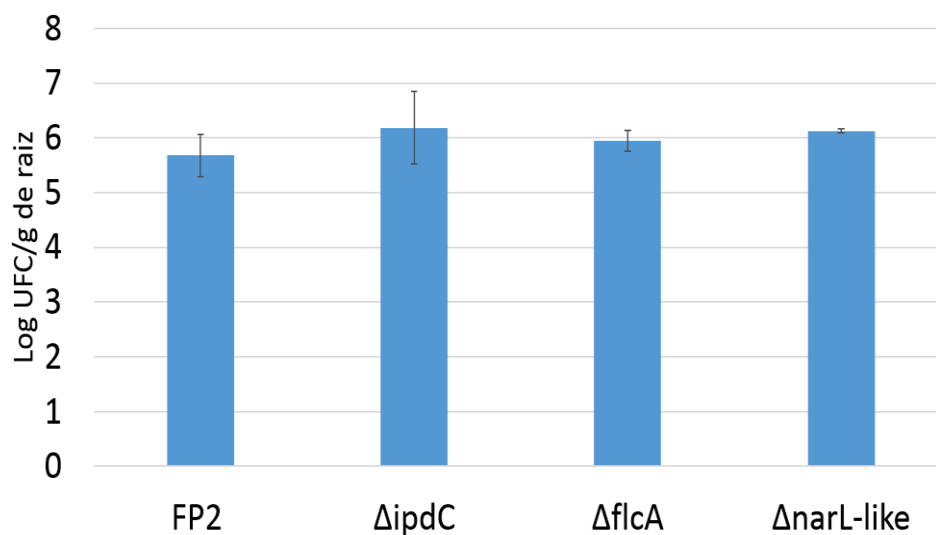
A população epifítica das estirpes, ao longo do tempo, variou de 10^7 a 10^8 células por grama de raiz (gráfico 14). Número similar de células epifíticas, 10^7 UFC. g⁻¹ de raiz, foi obtido por Santos (2014) para a estirpe FP2 inoculada nas raízes de trigo, em 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação.

A população epifítica das estirpes mutantes, *ΔflcA-FP2* e *ΔipdC-FP2*, foram similares a da estirpe selvagem. Resultados semelhantes foram observados por Katupitiya *et al.*, (1995) e por Remans *et al.*, (2008) que observaram que o mutante *flcA*, Sp7-S, e o mutante *ipdC*, FAJ009, apresentaram o mesmo número de bactérias associadas a superfície de raízes de trigo que a estirpe selvagem de *A. brasilense* Sp7 e Sp245 com aprox. 10^7 e 10^8 UFC.g⁻¹ de raiz, respectivamente. Assim, os resultados obtidos para estes mutantes não diferem do descrito na literatura mostrando um número de células epifíticas idênticas a estirpe selvagem (gráfico 14).

O mutante *flcA*, Sp7-S, apesar de apresentar número similar de bactérias associadas a superfície de raízes de trigo que a estirpe selvagem Sp7, mostrou um padrão de colonização diferente da Sp7 (KATUPITIYA *et al.*, 1995), assim como outros mutantes *flcA*, mutantes tn5 induzido e *ΔflcA*-Sp7 (PEREG GERK *et al.*, 1998; HOU *et al.*, 2014). As células destes mutantes foram observadas apenas nas fendas em torno dos locais de emergência da raiz lateral e na zona

pilífera densa perto da ponta da raiz, contrastando com a estirpe selvagem Sp7 que colonizou intensamente a superfície das raízes (KATUPITIYA *et al.*, 1995; PEREG GERK *et al.*, 1998; HOU *et al.*, 2014).

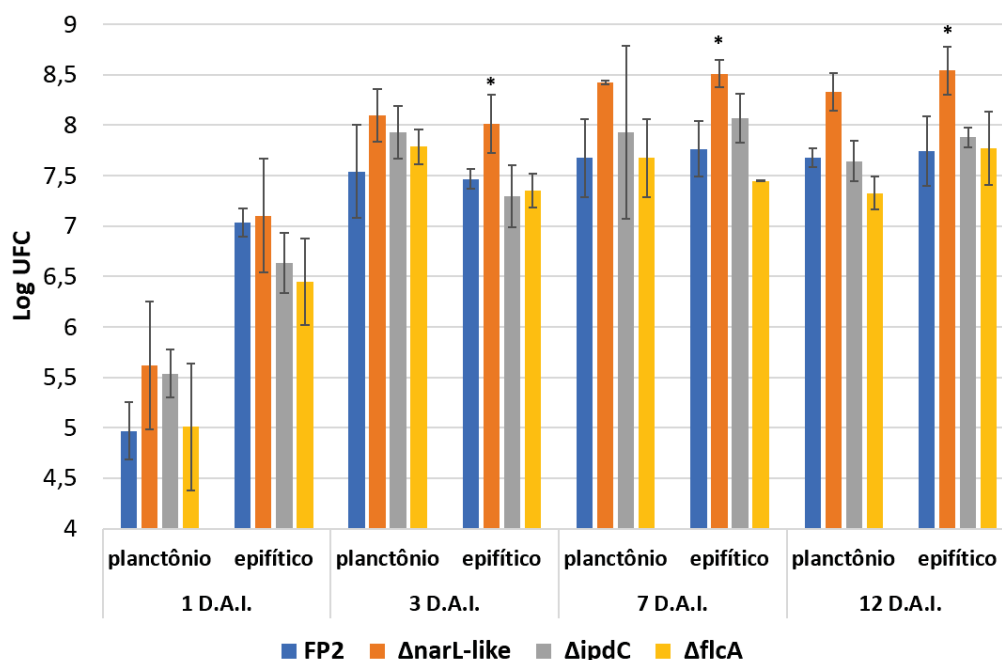
GRÁFICO 13 - POPULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* ADERIDA À SUPERFÍCIE DE RAÍZES DE TRIGO.



Plântulas de trigo foram inoculadas com as estirpes de *Azospirillum* spp. (10^5 células/plântula) e o número de UFC (expresso em log) aderidos à raiz após lavagem foi determinado 30 min após a inoculação.

FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 14 - POPULAÇÃO PLANCTÔNICA E EPIFÍTICA DE RAÍZES DE TRIGO INOCULADAS COM AS ESTIRPES DE *A. brasilense*.



Plântulas de trigo foram inoculadas com as estirpes de *A. brasilense* (10^5 células/plântula) e o número de células planctônicas (UFC/ml de meio) e epifíticas (UFC/g de raiz) foi determinado em 1, 3, 7 e 12 D.A.I. Diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste *t* de Student) entre as populações da estirpe selvagem e das estirpes mutantes é indicada por asterisco. Nota: D.A.I.: dias após a inoculação.

FONTE: O autor (2018).

Curiosamente, neste trabalho o número de bactérias epifíticas de *ΔnarL-like-FP2* foi maior que a estirpe selvagem ao longo do tempo, porém este dado foi estatisticamente significativo em 3, 7 e 12 D.A.I ($p \leq 0,05$) (gráfico 14). Esse resultado indica que o mutante *ΔnarL-like-FP2*, possivelmente, apresenta maior capacidade de colonização de raízes de trigo que a estirpe selvagem.

Embora alguns componentes de superfície de *A. brasilense* como flagelos e polissacarídeos de superfície (EPS e LPS), foram relatados como necessários a ligação e colonização das raízes de plantas (FIBACH-PALD et al., 2012), a interação entre *Azospirillum* e plantas ainda é mal compreendida, bem como a interação de PGPRs associativas diazotróficas.

Abordagens como transcriptoma, têm sido utilizadas para estudar os mecanismos envolvidos na interação planta-bactéria. No estudo RNA-seq que comparou os perfis transcricionais de *H. seropedicae* SmR1 planctônico e aderido a raízes de milho indicou que vários genes relacionados a biossíntese e

ao transporte de polissacarídeos apresentaram níveis de transcrição alterados na presença da planta, que pode ser em consequência da modificação química de polissacarídeos e rearranjos de envelope (BALSANELLI *et al.*, 2016). Outro estudo de RNA-seq de *A. brasilense* FP2 associado ao trigo mostrou que genes que codificam transportadores de monossacarídeos e proteínas relacionadas a polissacarídeos, biossíntese e transporte de EPS e LPS, exibiram níveis de expressão modificados quando em associação com a planta. Ressalta-se que nesta análise o gene *narL-like*, objeto de estudo deste trabalho, foi altamente expresso sugerindo o envolvimento deste gene na interação de *Azospirillum*/planta (CAMILIOS NETO *et al.*, 2014).

A deleção do gene *narL-like* na estirpe FP2 causou mudanças na capacidade de ligar ao vermelho-congo, de formar biofilme e de interagir com a planta. No entanto, não está claro como este gene interfere nas características testadas. Para o nosso conhecimento, este trabalho é o primeiro relatório que descreve função da proteína NarL-like sendo imprescindível uma maior investigação para melhor caracterização destes mutantes.

Em conclusão, os resultados apresentados reforçam o papel dos produtos dos genes *flcA* e *ipdC* em *A. brasilense* e fornecem evidências do possível envolvimento do gene *narL-like* na interação de *Azospirillum* com trigo, bem como a importância destes genes na interação de *Azospirillum*-planta.

7 CONCLUSÕES

- O gene *narL-like* provavelmente codifica um regulador transcricional da família LuxR.
- A capacidade de fixar nitrogênio atmosférico não foi afetada pela deleção dos genes *flcA* e *ipdC* em *A. brasilense* FP2.
- O mutante $\Delta narL-like$ apresentou maior nível de atividade nitrogenase que a estirpe selvagem.
- Os níveis de produção de AIA no mutante $\Delta ipdC$ foi significativamente menor que os da estirpe selvagem.
- O mutante $\Delta flcA$ não apresentou o fenótipo de floculação e apresentou um menor grau de ligação ao vermelho congo que a estirpe selvagem.
- O mutante $\Delta narL-like$ apresentou menor capacidade de se ligar ao vermelho congo que a estirpe selvagem, sugerindo uma alteração na composição de polissacarídeos de superfície neste mutante, mas não apresentou diferença no padrão de floculação.
- A formação de biofilme em lâ de vidro nos mutantes $\Delta flcA$ e $\Delta narL$ foi 40 % e 50% menor que a da estirpe selvagem, respectivamente.
- O fenótipo de colonização de raízes de trigo pelos mutantes $\Delta flcA$ e $\Delta ipdC$ não diferiu da estirpe selvagem.
- O mutante $\Delta narL-like$ apresentou populações epifíticas maiores que a estirpe selvagem no ensaio de colonização de raízes de trigo.

8 REFERÊNCIAS

- ALI, S.; CHARLES, T.C.; GLICK, B.R. Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **J.Appl. Microbiol.** v.113, n. 5, p.1139-1144, 2012.
- ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant Soil**, v.252, p.1-9, 2003.
- ARAÚJO, L.M.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, B.R.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Res. Microbiol.** v.155, n.6, p. 491–495, 2004.
- ARSENE, F; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J Bacteriol**, v.178, n.16, p. 4830–4838, 1996.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 2008.
- BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Regulation and function of root exudates. **Plant Cell Environ**, v.32, n. 6, p. 666-681, 2009.
- BAHAT-SAMET, E.; CASTRO-SOWINSKI, S.; OKON, Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 237, n. 2, p. 195–203, 2004.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int J Sys Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant Soil**, v. 384, p. 413-431, 2014.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.549-579, 2005.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on roots infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n.8, p. 924-929, 1983.
- BALSANELLI, E.; BAURA, V.A.; PEDROSA, F.A.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. **Plos One**, v.9, ed.10, e110392, 2014.

BALSANELLI, E., SERRATO, R.V., DE BAURA, V.A., SASSAKI, G., YATES, M.G., et al. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environ Microbiol.**, v.12, n.8, p. 2233-2244, 2010.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M.Z.; FAORO, H.; PANKIEVICZ, V.C.S.; DE BAURA, V.A.; PEDROSA, F.O.; DE SOUZA, E.M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R.A. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environ Microbiol.**, v.18, n.8, p. 2343-56, 2016.

BARAK, R.; NUR, I.; OKON, Y. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense*, **J. Appl. Bacteriol.**, v.54, n.3, p. 399-403, 1983.

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

BASU, S.; RABARA, R.; NEGI, S. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. **Plant Gene**, v.12, p. 43–49, 2017.

BAUDOIN, E.; LERNER, A.; SAJJAD MIRZA, M.; EL ZEMRANY, H. et al., Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. **Research in Microbiology**, v.161, n. 3, p.219 – 226, 2010.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genet. Mol. Biol.** v. 35, n.4 (suppl), p. 1044–1051, 2012.

BERNHARD, A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. **Nature Education Knowledge**, 3(10):25, 2010.

BIBLE, A.N.; STEPHENS, B.B.; ORTEGA, D.R.; XIE, Z.; ALEXANDRE, G. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol** v.190, n.19, p. 6365–6375. 2008.

BOBBINK, R.; HICKS, K.; GALLOWAY, J.; SPRANGER, T.; ALKEMADE, R.; ASHMORE, M.; BUSTAMANTE, M.; CINDERBY, S.; DAVIDSON, E.; DENTENER, F.; EMMETT, B.; ERISMAN, J.W.; FENN, M.; GILLIAM, F.; NORDIN, A.; PARDO, L.; DE VRIES, W. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. **Ecological Applications**, v.20, n. 1, p. 30–59, 2010.

BONNEFOY, V.; DEMOSS, J. Identification of functional cis-acting sequences involved in regulation of *nark* gene expression in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, v.6, n.23, p. 3595–3602, 1992.

BOYD, E.S.; PETERS, J.W. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. **Front Microbiol.**v.4, n. 201, p. 1-12, 2013.

BOZOUKLIAN, H.; ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. **Biochimie**, v.68, p. 1181-1187, 1986.

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

BROUGHTON, W.J.; WONG, C.H.; LEWIN, A.; SAMREY, U.; MYINT, H.; MEYER, H.; DOWLING, D. N.; SIMON, R. Identification of Rhizobium plasmid sequences involved in recognition of Psophocarpus, Vigna, and other legumes. **J. Cell Biol.**, v.102, p. 1173–1182, 1986.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SORIA-DIAZ, M.E.; GIL SERRANO, A.M.; OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **FEMS Microbiol Lett.** v.189, p. 259–264, 2000.

BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Crit Rev Microbiol.** v. 26, p.91–110, 2000.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**. v. 144, n. 7, p. 1989-1999, 1998.

BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P. Biological nitrogen fixation. **Annual Review of Nutrition**, v. 13, p. 317-335, 1993.

BUSCHART, A.; SACHS, S.; CHEN, X. et al. Flagella mediate endophytic competence rather than act as MAMPS in rice-*Azoarcus* sp. strain BH72 interactions. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 25, n.2, p. 191–199, 2012.

CAMILIOS NETO. D.; BONATO, P.; WASSEM. R.; TADRA-SFEIR, M. Z.; BRUSAMARELLO-SANTOS, C.C.; VALDAMERI, G.; DONATTI, L.; FAORO, H.; WEISS, V.A.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v.15, p. 378, 2014.

CAPRA, E.J.; LAUB, M.T. Evolution of two-component signal transduction systems, **Annu. Rev. Microbiol.** v. 66, p. 325–347, 2012.

CARDOSO, R.L.A. **Análise Genômica Comparativa de bactérias do gênero *Herbaspirillum***. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

CARREÑO-LOPEZ, R.; CAMPOS-REALES, N.; ELMERICH, C.; BACA, B.E. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. **Mol Gen Genet.**, v.264, p. 521–530, 2000.

CARVALHO, T. L. G.; BALLESTEROS, H. F. G.; THIEBAUT, F.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. **Plant Mol. Biol.** v.90, p. 561–574, 2016.

CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M. PARKHILL, J.; MCQUILLAN, J.A. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics.** v28, n.4, p. 464–469, 2012.

CASSÁN, F. D. & DÍAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biol. Biochem.**, v.103, p. 117–130, 2016.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S.; Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. **J Plant Growth Regul.**, v.33, p. 440–459, 2014.

CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clin. Chem.**, v.8, n. 2, p. 130–132, 1962.

CHANG, H.Y.; LEE, J.H.; DENG, W.L.; FU, T.F.; PENG, H.L. Virulence and outer membrane properties of a galU mutant of *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Microb Pathog**, v. 20, n. 5, p. 255–261, 1996.

CLEGG, S.; YU, F.; GRIFFITHS, L.; COLE, J.A. The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. **Mol Microbiol**, v.44, n. 1, p.143–155, 2002.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3- pyruvate decarboxylase. **Mol Gen Genet.**, v. 243, n. 4, p.463–472, 1994.

CROES, C.L.; MOENS, S.; VAN BASTELAERE, E.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, K.W. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. **J. Gen. Microbiol.** v.139, n.9, p. 2261–2269, 1993.

CURATTI, L.; RUBIO, L. M; Challenges to develop nitrogen-fixing cereals by direct nif-gene transfer. **Plant Sci**, v. 225, p.130–137, 2014.

DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H. M.; KUIPER, I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G. V.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT, R.; LUGTENBERG, B. J. J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.15, n.11, p. 1173–1180, 2002.

DEKHILL, S. B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n.1, p. 72–77, 1997.

DÍAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ-CANIGIA, M.V.; BRAVO, O.A.; BERGER, A.; SATORRE, E.H. Field evaluation of extensive crops inoculated with *Azospirillum* sp. In: CASSAN, F.D., OKON, Y., CREUS, C.M. (Eds.), **Handbook for *Azospirillum*, technical Issues and Protocols**. Springer Int. Publishing Switzerland, p. 435 - 445, 2015.

DIXON, R. & KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, 2004.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; VAN DE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**, v. 212, n. 2, p.155–164, 1999.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; De Zamaroczy, M. (eds.). ***Azospirillum* VI and related microorganisms**. ATO ASI Series (Series G: Ecological Sciences), vol 37. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 3-14, 1995.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Sci. Tech. Publishers, 155 p, 1987.

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

ECKFORD, R.; COOK, F. D.; SAUL, D.; AISLABIE, J.; FOGHT, J. Free-Living Heterotrophic Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Fuel-Contaminated Antarctic Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.10, p. 5181–5185, 2002.

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. **Mol Plant-Microbe Interact.**, v.11, n. 1, p.71–75, 1998.

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v.12, n. 9, p. 813-819, 1999.

EHMANN, A. The van urk-salkowski reagent - a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **Journal of Chromatography**, v.132, n.2, p. 267-276, 1977.

ELMERICH, C.; AUBERT, J.P. Synthesis of glutamate by a glutamine: 2-oxo-glutarate amidotransferase (NADP oxidoreductase) in *Bacillus megaterium*. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.42, n.3, p. 371–376, 1971.

ELSER, J. J.; BRACKEN, M. E. S.; CLELAND, E. E.; GRUNER, D. S.; HARPOLE, W. S.; HILLEBRAND, H.; NGAI, J. T.; SEABLOOM, E. W.; SHURIN, J. B.; SMITH, J. E. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary production in freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. **Ecol. Lett.** v.10, n.12, p. 1135-1142, 2007.

FADEL-PICHETH, C.M.T.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 179, n.2, p. 281-288, 1999.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 326, n. 2, p. 99–108. 2012.

FINAN, T.M.; KUNKEL, B.; DE VOS, G.F.; SIGNER, E.R. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. **J Bacteriol.**, v. 167, n.1, p. 66–72, 1986.

FLORES, P.; FENOLL, J.; HELLÍN, P.; APARICIO-TEJO, P. Isotopic evidence of significant assimilation of atmospheric-derived nitrogen fixed by *Azospirillum brasilense* co-inoculated with phosphate-solubilising *Pantoea dispersa* in pepper seedling. **Appl. Soil Ecol.** v.46, n.3, p. 335–340, 2010.

FU, H.; HARTMANN, A.; LOWERY, R.G. et al. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum*. **J. Bacteriol.**, v. 171, n.9, p. 4679-4685, 1989.

FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. *Nif A*- Mutants of *Azospirillum brasilense* strain Sp245. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E.H.J. (eds). **Nitrogen fixation research progress**. pp. 522. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, 1985.

GARCÍA DE SALAMONE, I.E., et al., Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on the rhizosphere microbial communities and field crop production. **Appl Soil Ecol.** v.61, p.196–204, 2012.

GAUTHIER, D.; ELMERICH, C. Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in *Spirillum lipoferum*. **FEMS Microbiol Lett**, v.2, n.2, p. 101–104, 1977.

GAY, P. et al. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *B. subtilis*: expression of the gene in *E. coli*. **J. Bacteriol.**, v.153, n. 3, p.1424-1431, 1983.

GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p.1-15, 2012.

GORIS, J., et al., DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 57, n.1, p. 81–91, 2007.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant bacterium signaling processes. **Soil Biol Biochem.** v.3, n.3, p.395- 412, 2005.

GUIZELINE, D. G-FINISHER: **Uma nova estratégia para refinar e finalizar montagens de genomas bacterianos.** Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

HARTMANN, A.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.** v.169, n.3, p. 944-948, 1987.

HAUER, V. **Sequenciamento do gene *glnA* das estirpes mutantes HM14, HM26, HM053 e HM210 de *Azospirillum brasilense*.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

HEINRICH, D.; HESS, D., Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. **Can. J. Microbiol.**, v 31, n.1, p. 26 -31, 1985.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**, Circular 347, pp. 32, 1950.

HOU, X.; MCMILLAN, M.; COUMANS, J.V.F.; POLJAK, A.; RAFTERY, M.J.; PEREG, L. Cellular responses during morphological transformation in *Azospirillum brasilense* and its *flcA* knockout mutant. **PLoS ONE**, v. 9, n.12, e114435, 2014.

HUERGO, L.F.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiol.Lett.** v. 223, n.1, p. 33-40, 2003.

HUERGO, L.F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiol Rev.** v.37, n.2, p. 251-83, 2013.

HUNGRIA, M; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p.413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; MENDES, I.C. Nitrogen fixation with soybean: The perfect symbiosis? In: De Bruijn, F.J., editor, **Biological nitrogen fixation.** v.2, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, p. 1009–1023, 2015.

HUNGRIA, M. et al. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M., **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. EMBRAPA Soja, Londrina (PR, Brazil), 38p. Documentos 325, 2011.

HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 221, p. 125-131, 2016.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283), 2007.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **J. Bacteriol.** v. 176, n.7, p. 1913-1923, 1994.

JAMES EK, GYANESHWAR P, MATHAN N. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growthpromotion bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Mol Plant Microbe Interact**, v.15, n.9, p. 894–906, 2002.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.** v.17, n.1, p.77-119, 1998.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANDI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Exp. Bot.** v. 45, n.275, p.757-766, 1994.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p.197– 209, 2000.

JIA, W.; COLE, J.A. Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. **Biochem Soc Trans**, v. 33, p. 159–161, 2005.

JOFRÉ, E., LAGARES, A., MORI, G. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production and root colonization in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, n. 2, p. 267-275, 2004.

KATUPITIYA, S. et al. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. **Appl Environ Microbiol**, v.61, n.5, p.1987–1995, 1995.

KESSLER, B.; DE LORENZO, V.; TIMMIS, K. N. A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the

Pm-promotor of the Tol-plasmid studied with all controlling elements in monocopy. **Mol. Gen. Genet.**, v. 233, p. 293-301, 1992.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMOT, P. A.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.**, v.140, n.9, p. 679-693, 1989.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 887-891, 1997.

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, vol. 60, p. 2832-7, 2010.

LEE, A.I., DELGADO, A., GUNSALUS, R.P. Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite. **J Bacteriol**, v.181, n.17, p.5309–5316, 1999.

LERNER, A. et al., The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis. **Microbiology**, v.155, n.12, p.4058-4068, 2009.

LIN, S.Y., YOUNG, C.C., HUPFER, H., SIERING, C., ARUN, A.B., CHEN, W.M., LAI, W.A., SHEN, F.T., REKHA, P.D., YASSIN, A.F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.59, n.4, p. 761-765, 2009.

LIN, S.Y.; SHEN, F.T.; YOUNG, L. S.; ZHU, Z.L.; CHEN, W.; YOUNG, C.C. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1185–1190, 2012.

LOPEZ DE VICTORIA, G.; LOVELL, C. R., Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds, **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, n.9, p. 2951-2955, 1993.

LYNCH, J.M. The rhizosphere. **Wiley-Interscience**, Chichester, 458 p., 1990.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n.7, p. 549-553, 1991.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v.55, n.4, p. 417-430, 1983.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. An *ipdC* gene *Knock-out* of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and

plant growth promotion. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 93, ed. 4, pag. 425-433, 2008.

MALIK, K.A.; MIRZA, M.S.; HASSAN, U.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P., The role of plant-associated beneficial bacteria in rice-wheat cropping system. In: Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A. (Eds.), **Biofertilisers in Action. Rural Industries Research and Development Corporation**, Canberra, Australia, p. 73–83, 2002.

MEERS, J.; TEMPEST, D.W.; BROWN, C.M. Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. **J Gen Microbiol** v. 64, p.187–194, 1970.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v.57, p. 2805–2809, 2007b.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620–624, 2007a.

MENESES, C.H.S.G. et al. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Mol Plant Microbe Interact.**, v. 24, p. 1448–1458, 2011.

MERRICK, M.J.; EDWARDS, R.A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol Rev**, v. 59, n.4, p. 604-622, 1995.

MONTEIRO, R.A. et al. *Herbaspirillum*–plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, p. 175-196, 2012.

MORAIS, R.; QUESADA, D.; REIS, V.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.R.; BODDEY, R. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v. 356, p. 23-34, 2012.

MORENO-VIVIAN, C.; CABELLO, P.; MARTÍNEZ-LUQUE, M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F: Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **J Bacteriol.** v.181, n. 21, p. 6573-6584, 1999.

MORTIMER, M. W.; MCDERMOTT, T. R.; YORK, G. M.; WALKER, G. C.; KAHN, M. L. Citrate Synthase Mutants of *Sinorhizobium meliloti* Are Ineffective and Have Altered Cell Surface Polysaccharides. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n.24, p. 7608–7613, 1999.

MOURE, V.R. et al., The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADPribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB. **J Bacteriol**, v.195, p. 279–286, 2013.

NIA, S.H.; ZAREA, M.J.; REJALI, F.; VARMA, A., Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil. **J. Saudi Soc. Agric. Sci.** v.11, p.113–121, 2012.

OJEDA-MORALES, M.E.; DOMINGUEZ, M.D.; RIVERA, M.A.; CRUZ, J.Z. Biosurfactant production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites. **Water Air Soil Pollution**, v. 226, p.400–415, 2015.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends Biotechnol.**, v. 3, p. 223–228 1985

OKON, Y.; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R.H. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.** v.128, n.2, p. 592–597, 1976.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 33, n.197, 2017.

OLIVARES, J.; BEDMAR, E. J.; SANJUÁN, J. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. **Mol. Plant Microbe.**, v.26, n. 5, p.486–494, 2013.

ONA, O.; SMETS, I.; GYSEGOM, P.; BERNAERTS, K.; IMPE, J.; PRINSEN, E.; VANDERLEYDEN, J. The effect of pH on indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* sp7. **Symbiosis**, v. 35, p. 199–208, 2003.

ONA, O. et al., Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiol Lett**, v. 246, p.125–132, 2005.

OTT, T. et al. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. **Curr. Biol.** v.15, p.531–535, 2005.

PANKIEVICZ, V.C.S. et al. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant J.**, v.81, p. 907–919, 2015.

PEDROSA, F.O. et al. Structural organization and regulation of the nif genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil. Biol. Biochem.** v.29, p.843–846, 1997.

PEDROSA, F.O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **Plos Genetics**, v. 7, p. 1–10, 2011.

PELANDA, R. et al. Glutamate synthase genes of the diazotroph *Azospirillum brasilense*. Cloning, sequencing, and analysis of functional domains. **J. Biol. Chem.** v.268, p. 3099–3106, 1993.

PENG, G. et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p. 1263–1267, 2006.

PEREG GERK, L.; PAQUELIN, A.; GOUNON, P.; KENNEDY, I.R.; ELMERICH C. A transcriptional regulator of the *LuxR-UhpA* family, FlcA, controls flocculation

and wheat root surface colonization by *A. brasilense* Sp7. **Mol Plant-Microbe Interact.** v.11, p.177–187, 1998.

PEREG GERK, L.; GILCHRIST, K.; KENNEDY, I.R. Mutants with enhanced nitrogenase activity in hydroponic *Azospirillum brasilense*-wheat associations. **Appl Environ Microbiol.** v.66, p. 2175–2184, 2000.

PEREG, L.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant Soil**, v. 399, p.389–414, 2016.

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

PIROLA, M.C.; MONOPOLI, R.; ALIVERTI, A.; ZANETTI, G. Isolation and characterization of glutamine synthetase from diazotroph *Azospirillum brasilense*. **Int J Biochem**, v. 244, p.1749–1754, 1992.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: Cambridge Uni. Press. 252p., 1982.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Mol Plant Microbe Interact** v. 6, p. 609–615, 1993.

RABIN, R.S.; STEWART, V. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. **J Bacteriol.**, v.175, p. 3259-3268, 1993.

RABIN, R.S.; STEWART, V. Either of two functionally redundant sensor proteins, NarX and NarQ, is sufficient for nitrate regulation in *Escherichia coli* K-12. **Proc Natl Acad Sci U S A**.v.89, n.18, p. 8419–8423, 1992.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indolacético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.40, n.10, p.997-1004, 2005.

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

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp., **J. Bacteriol.**, v.162, p.190-195, 1985.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.14, p.435–443, 2011.

REMANS, R. et al., Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **Plant Soil**, v. 302, p.149–161, 2008.

ROBERTSON, G. P.; VITOUSEK, P. M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. **Annu. Rev. Environ. Resour.** v.34, p.97–125, 2009.

RODRIGUES, E.P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, v.302, p.249–261, 2008.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. V.8, p.827–837, 2006.

ROSSI, F.A.; MEDEOT, D.B.; LIAUDAT, J.P.; PISTORIO, M.; JOFRÉ, E. In *Azospirillum brasilense*, mutations in *flmA* or *flmB* genes affect polar flagellum assembly, surface polysaccharides, and attachment to maize roots. **Microbial Res.** v.190, p. 55-62, 2016.

ROWELL, P.; KERBY, N.W.; DARLING, A.J.; STEWART, W.D.P. Physiological and biochemical aspects of N₂-fixing cyanobacteria. In: Nitrogen fixation research progress. Edited by H.J. Evans, P.J. Bottomley and W.E Newton., **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, vol 1. Springer, Dordrecht, p. 387-393, 1985. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5175-4_53.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C.A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. **J Bacteriol.** v.163, p.716–723, 1985.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C.A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. **J Bacteriol.** v.169, n.4, p. 670-1677, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDLIN, R.C.; LAMPEL, K.A.; KEASLER, S.P.; GOLDBERG, M.B.; STOLZER, A.L. et al. Avirulence of rough mutants of *Shigella flexneri*: Requirement of O antigen for correct unipolar localization of lcsA in the bacterial outer membrane. **Infect Immun**, v. 63, p.229-237, 1995.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, v.74, n.12, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS, K. F. D. N. **Colonização de *Triticum aestivum* e *Setaria viridis* por *Azospirillum brasilense* HM053, uma estirpe excretora de íons amônio**. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Departamento em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2014.

SANTOS, K. F. D. N.; MOURE, V. R.; HAUER, V.; SANTOS, A. R.; DONATTI, L.; GALVÃO, C.W.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; WASSEM, R.; STEFFENS, M. B. R. Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant Soil**. v.415, p. 245-255, 2016.

SANTOYO, G. et al., Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.

SCHAFER, A.; TAUCH, A.; JAGER, W.; KALINOWSKI, J.; THIERBACH, G.; PÜHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, v. 145, p. 69–73, 1994.

SCHENBERGER, S. et al., Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, vol 118, p.422-426, 2017.

SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**. v.25, p.159–179, 1998.

SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HEINZMANN, J.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Immunological studies of the wheat-root-colonization by *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: Hegazi, N.A., Fayes, M., Monib, M. (Eds.), **Nitrogen Fixation with Non-leguminous**. American University in Cairo Press, Cairo, p. 291-297, 1994.

SCHULMAN H, KENNEDY EP. Identification of UDP-glucose as intermediate in the biosynthesis of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. **J Biol Chem**., v.252, p.6299–6303, 1977.

SEGAL, A.; STADTMAN, E.R. Effect of cobaltous ion on various catalytic parameters and on heterologous subunit interaction of *Escherichia coli* glutamine synthetase. **Arch Biochem Biophys**., v. 152, p.356–36, 1972.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T.; KRPLUS, K., et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**. v. 7, p. 539, 2011.

SOMERS, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; SRINIVASAN, M.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. **Appl Environ Microbiol**. v.71, p. 1803–1810, 2005.

SOUZA, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**., v.38, n.4, p. 401-419, 2015.

SOUZA, M. S.; BAURA, V. A.; SANTOS, S. A.; FERNANDES-JUNIOR, P.I.; REIS JUNIOR, F. B.; MARQUES, M. R.; PAGGI, G. M.; DA SILVA BRASIL, M., *Azospirillum* spp. from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain:

biodiversity and plant growth promotion potential. **World J Microbiol Biotechnol.**, v.33, n.4, p.81, 2017.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant Soil**, v. 312, p.15–23, 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol Rev.**, v.31, p.425–448, 2007.

SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, A. K. Adenosine Diphosphate Ribosylation of Dinitrogenase Reductase and Adenylation of Glutamine Synthetase Control Ammonia Excretion in Ethylenediamine-Resistant Mutants of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Current Microbiology**, v.53, p.317-323, 2006.

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

STOCK, A. M.; GAO, R., Biological Insights from structures of two-components proteins. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p.133-154, 2009.

STOCK, A.M.; ROBISON, V.L.; GOUDREAU, P.N., Two-Components signal transduction. **Annu Rev Biochem.**, v.69, p.183-215, 2000. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183.

SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J.H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N. T.; ROTH, A.; BORK, P.; JENSEN, L.J.; MERING, C.V. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible, **Nucleic Acids Research**, Volume 45, Issue D1, Pages D362–D368, 2017.

TARRANT, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A. taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol**, v. 24, p. 967-980, 1978.

TORRES, A. R.; KASCHUK G.; SARIDAKIS, G. P.; HUNGRIA, M. Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean Glycine max (L.) Merrill. **World J Microbiol Biotechnol.**, v.28, p.1831-1835, 2012.

VALDAMERI, G.; KOKOT, T.B.; PEDROSA, F.O.; DE SOUZA, E.M. Rapid quantification of rice root-associated bacteria by flow cytometry. **Lett Appl Microbiol**, v.60, p. 237–241, 2015. doi: 10.1111/lam.12351.

VALVERDE, A.; OKON, Y.; BURDMAN, S. cDNA-AFLP reveals differentially expressed genes related to cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol Lett.**, v.265, p.186–194, 2006.

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

VAN BASTELAERE, E.; LAMBRECHT, M.; VERMEIREN, H.; VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; PROOST, P.; VANDERLEYDEN, J. Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediating chemotaxis to and uptake of sugars. **Mol. Microbiol.** v. 32, p.703–714, 1999.

VAN DE BROEK, A.; GYSEGOM, P.; ONA, O.; HENDRICKX, N.; PRINSEN, E.; VAN IMPE, J.; VANDERLEYDEN, J. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. **Mol Plant Microbe Interact.**, v.18, n.4, p.311–323, 2005.

VAN DE BROEK, A.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol.**, v.181, p.1338–1342, 1999.

VAN DOMMELEN, A.; CROONENBORRIGHS, A.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Wheat growth promotion through inoculation with an ammonium-excreting mutant of *Azospirillum brasilense*. **Biol. Fertil. of Soils**, v.45, p. 549–553, 2009.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; WOLLEBRANTS, A.; VANDERLEYDEN, J. Phenotypic Changes Resulting from Distinct Point Mutations in the *Azospirillum brasilense* *glnA* Gene, Encoding Glutamine Synthetase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n. 9, p.5699-5701, 2003.

VAN PUYVELDE, S.; CLOOTS, L.; ENGELN, K.; DAS, F.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. **Microb Ecol.**, v. 61, p.723–728, 2011.

VENTURI, V.; KELL, C. Signaling in the Rhizosphere. **Trends Plant sci.** v.21, p.187-198, 2016.

VITOUSEK, P. M.; ABER, J. D.; HOWARTH, R. W.; LIKENS, J. E.; MATSON, P. A.; SCHINDLER, D. W.; SCHLESINGER, W. H.; TILMAN, D. G. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. **Ecol. Appl.**, v.7, p.737-750, 1997.

WESTBY, C. A., ENDERLINC, S.; STEINBERGN., A.; JOSEPHC, M.; MEEKS, J. C. Assimilation of "NH," by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **J. Bacteriol.** v.169, p.4211-4214, 1987.

WILLIAMS, A.H.; RAETZ, C.R. Structural basis for the acyl chain selectivity and mechanism of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase. **PNAS**, v.104, p.13543–13550, 2007.

XIE, B.; XU, K.; ZHAO, H.X.; CHEN, S.F. Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-

acetic acid biosynthesis, **FEMS Microbiology Letters**, Volume 248, Issue 1, Pages 57–63, 2005.

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

YAMASHITA, M.M, et al. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. **J Biol Chem.**, v.264, n.30, p.17681-17690, 1989.

YOUNG, C.C. et al. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.58, p.959–963, 2008.

ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Mol Gen Genet**, v. 224, n. 3, p.421-430, 1990.

ZAMAROCZY, M, PAQUELIN A, ELMERICH C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol.**, v.175, n9, p.2507–2515, 1993.

ZHANG, Y. et al., Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol Lett**, v.152, n.2, p.195-204, 1997.

ZHANG, Y.; BURRIS, R.H.; LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **J Bacteriol.** v.175, p. 6781-6788, 1993.

ZHENG, Z.L. Carbon and nitrogen nutrient balance signalling in plant. **Plant Signal Behav.** v.4, p. 584–591, 2009.

ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y.; YANG, G.; ZHUANG, L.; HU, P. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **Int J Syst Evol Microbiol.** v.63, p.2618-2624, 2013.

ZHOU, Y.; WEI, W.; WANG, X.; XU, L.; LAI, R. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. **Journal J. Gen. App. Microbiol.** v.55, n.1, p. 1-7, 2009.

ZHULIN, I. B.; ARMITAGE, J. P., Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*, **J. Bacteriol.**, v.175, n.4, p. 952-958, 1993.

ZIMMER, W.; WESCHE, M.; TIMMERMANS, L. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: sequencing and functional analysis of the gene locus. **Curr Microbiol.** v.36, p. 327–331, 1998.

ZUMFT, W. G.; CASTILLO, F. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. **Arch. Microbiol.** v. 117, p. 53-60, 1978.

Anexo 1 - Composição do meio NFbHP-lactato (MACHADO *et al.*, 1991)

Elemento	Gramas/Litro
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilo-triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Lactato sólido	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

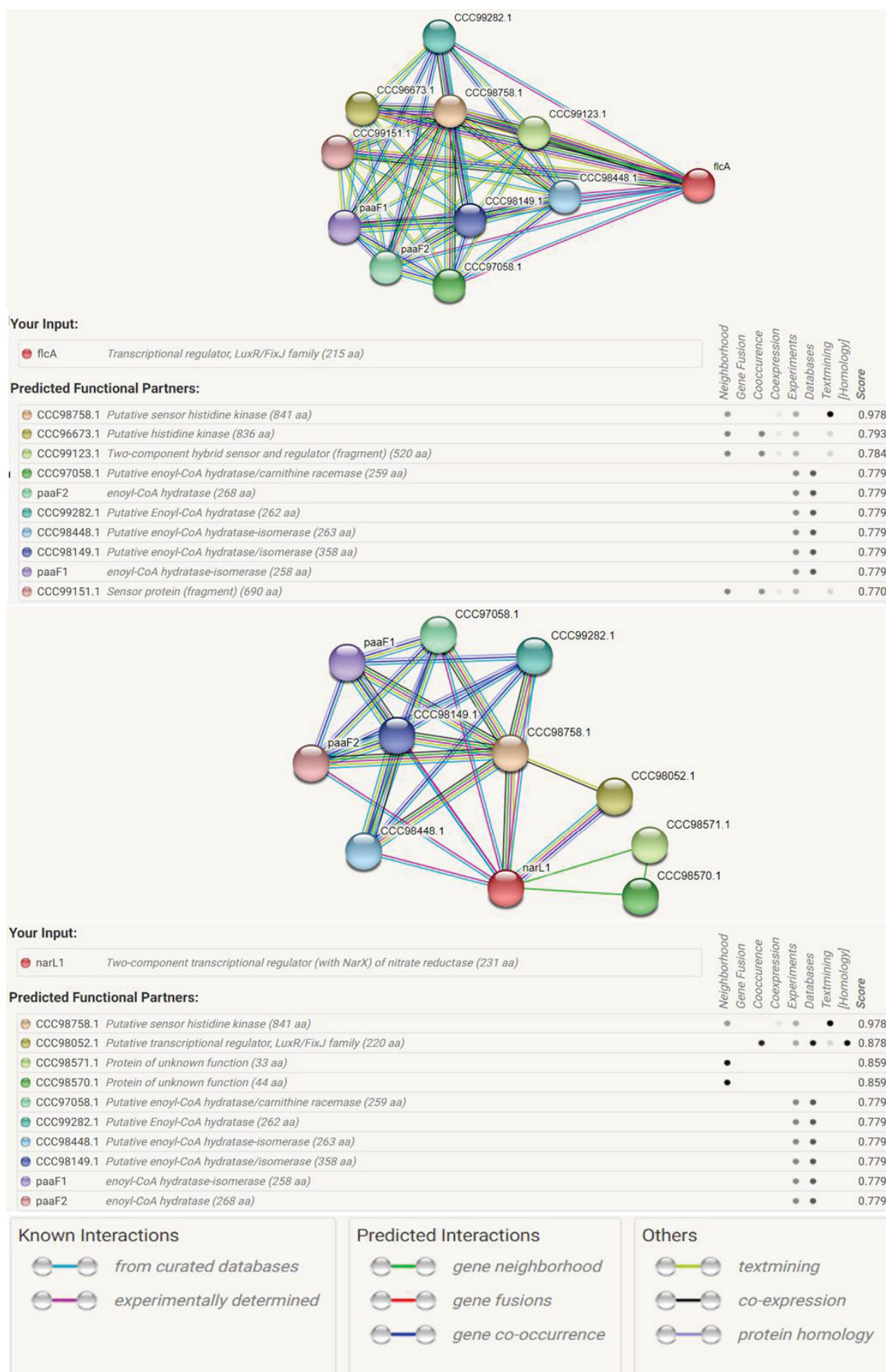
Anexo 2 - Composição do meio de cultura LB (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Elemento	g/L
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
NaCl	10

Anexo 3 - Composição do meio de cultura TY (BROUGHTON *et al.*, 1986).

Elemento	g/L
Triptona	5
Extrato de Levedura	3
Cloreto de Cálcio Dihidratado	0,9

ANEXO 4 - REDES DE INTERAÇÕES PROTEÍNAS-PROTEÍNAS CONHECIDAS E PREVISTAS de *narL-like* E *flcA* EM *Azospirillum brasilense* ESTIRPE SP245.



As proteínas estão representadas por esferas com cores relacionadas na lista da imagem. Linhas azul-claras indicam interações para dados curados; linhas lilás indicam interações determinadas experimentalmente; linhas verdes indicam vizinhança gênica; linhas vermelhas indicam fusão gênica; linhas azul-escuras indicam co-ocorrência gênica; linhas verde-claras indicam mineração de dados; linhas pretas indicam co-expressão e linhas cinzas indicam homologia protéica.

FONTE: String (2017)

ANEXO 5 - *Primers* utilizados nas reações de PCR. As denominações, A e B, significam *primers* construídos a montante (*upstream*) e a jusante (*downstream*) do gene a ser deletado, respectivamente. Os sinais, + e –, significam o sentido *forward* e *reverso* dos *primers*, respectivamente. Em vermelho está destacado os sítios de restrição.

Primer	Sítio de Restrição	Sequência (5' → 3')	Aplicação	Tm (° C)
ipdC A+	XbaI	CGGC TCTAG AGGTCGCTTTC	Amplificar 486pb a montante do gene <i>ipdC</i>	55
ipdC A-	XhoI	CGCT CTCGAG TTCCAATAGGT		55
ipdC B+	XhoI	TTGT CTCGAG TGCGCTTGGA	Amplificar 433pb a jusante do gene <i>ipdC</i>	48
ipdC B-	HindIII	CCAC AAGCTT GGAGCGGTGA		48
flcA A+	XbaI	GGTT TCTAG AAAGCGATAACTCTTT	Amplificar 496pb a montante do gene <i>flcA</i>	55
flcA A-	XhoI	CCCG CTCGAG TTCGTTTATAC		55
flcA B+	XhoI	CAGG CTCGAG AACAAAGAAA	Amplificar 476pb a jusante do gene <i>flcA</i>	52-55
flcA B-	HindIII	AGGG AAGCTT AAAGCCGTGT		52-55
narL-like A+	XbaI	GCCAT CTAG AGCATCTGTCAGGA	Amplificar 497pb a montante do gene <i>narL-like</i>	55
narL-like A-	XhoI	TCAG CTCGAG CGATTTTGTGA		55
narL-like B+	XhoI	CTCT CTCGAG ATTTTCCCACT	Amplificar 484pb a jusante do gene <i>narL-like</i>	55
narL-like B-	HindIII	GAGG AAGCTT GAACCCGAGTT		55