

RESPOSTA DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 A
EXSUDATOS VEGETAIS: PERFIL PROTEÔMICO E PAPEL DA
PROTEÍNA ABC-F etta

TAMIRES CRUZ DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2019

RESPOSTA DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 A
EXSUDATOS VEGETAIS: PERFIL PROTEÔMICO E PAPEL DA
PROTEÍNA ABC-F *et al.*

TAMIRES CRUZ DOS SANTOS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S237

Santos, Tamires Cruz dos.

RESPOSTA DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 A EXSUDATOS VEGETAIS :
PERFIL PROTEÔMICO E PAPEL DA PROTEÍNA ABC-F *ettA* / Tamires Cruz dos Santos. -
Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

121 f.

Bibliografia: 65 - 84.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias, 2019.

Orientador: Goncalo Apolinario de Souza Filho.

1. Exsudatos vegetais. 2. Bactérias promotoras do crescimento vegetal. 3.
Estresse ambiental. 4. Resistência a antibióticos. I. Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

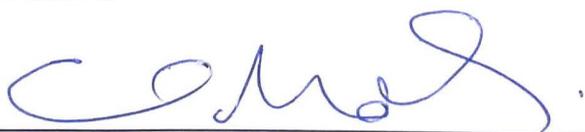
RESPOSTA DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 A
EXSUDATOS VEGETAIS: PERFIL PROTEÔMICO E PAPEL DA
PROTEÍNA ABC-F *ettA*

TAMIRES CRUZ DOS SANTOS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 12 de abril de 2019.

Comissão Examinadora:



Prof. Emanuel Maltempi de Souza (D.Sc., Ciências/Bioquímica) – UFPR



Prof. Fábio Lopes Olivares (D. Sc., Agronomia) – UENF



Prof. Vanildo Silveira (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de sabedoria, persistência e paciência durante essa jornada de quatro anos.

À UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, à coordenadora, prof^a. Telma Pereira, e ao secretário José Daniel, extensivo aos demais membros docentes e técnicos, pela infraestrutura, recursos humanos e pelos conhecimentos compartilhados que culminaram na concretização desta tese, na minha formação acadêmica e profissional.

À Faperj, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Faperj, CNPq, Finep e INCT, pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, prof. Gonçalo Apolinário, por todos os ensinamentos, paciência e compromisso com minha formação pessoal e profissional.

Aos membros da banca de defesa, prof. Emanuel Maltempi, prof. Vanildo Silveira e prof. Fábio Olivares, pelas avaliações e contribuições prestadas à melhoria do documento.

Aos meus queridos pais, Artur e Cláudia, por todo apoio, amor e compreensão durante toda minha caminhada pessoal e acadêmica, os quais nunca me deixaram desamparada nem nos momentos mais difíceis.

À minha irmã Taís, por todo apoio e confidências durante todo o percurso.

Ao meu namorado, Patrik, pelo apoio, compreensão e amor durante todos esses anos, por se fazer sempre presente, apesar da distância.

Aos meus queridos amigos Katherine Ruas, da AMES, Viviane Marculano e Dandara Cabral, por todos esses anos de amizade e por torcerem pelo meu sucesso. Em especial à Pâmela Becalli e Priscylla Pavione, por todos os anos de amizade e compreensão, sempre estando do meu lado e me ajudando com palavras reconfortantes, mesmo estando distantes.

Aos meus queridos amigos do LBT, Fabiano Soares, Júlia Rosa, Vívian Pimentel, Patrícia Rangel, Danyelle Mayrink, Barbara Portella, pelos ótimos momentos compartilhados no laboratório, com muitas trocas de experiências e auxílio nas pesquisas. Em especial, à Mariana Ramos, que desde o começo sempre esteve presente e foi peça fundamental na construção deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica, Daniel, Renato e Kariny, por todo auxílio e disponibilidade para ajudar.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. CAPÍTULOS	5
3.1 RESPOSTA DE GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS PAL5 AO COCULTIVO COM PLANTAS DE ARABIDOPSIS THALIANA E SEU EFEITO NO PERFIL PROTEÔMICO	5
3.1.1 INTRODUÇÃO	5
3.1.2 REVISÃO	7
3.1.2.1 Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal e sua Importância ..	7
3.1.2.2 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	9
3.1.2.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudo	10
3.1.2.4 Proteômica	11
3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1.3.1 Obtenção das plântulas	13
3.1.3.2 Microrganismo e condições de cultivo	13
3.1.3.3 Crescimento das plântulas e cocultivo de bactérias e preparação das amostras de exsudatos de plantas, bactérias e cocultivo	14

3.1.3.4	Análise Proteômicas	15
3.1.3.5	Análises LC-MS/MS	16
3.1.3.6	Análise dos dados proteômicos	17
3.1.3.7	Análises Estatísticas	17
3.1.4	RESULTADOS.....	18
3.1.4.1	Cocultivo com <i>A. thaliana</i> aumenta o crescimento de <i>G. diazotrophicus</i>	18
3.1.4.2	Metabólitos benéficos de plantas são exsudados em resposta a <i>G. diazotrophicus</i>	18
3.1.4.3	Proteômica comparativa da resposta de <i>G. diazotrophicus</i> a exsudatos de plantas	20
3.1.4.4	Classificação e análise das proteínas reguladas em <i>G. diazotrophicus</i> em cocultivo com <i>A. thaliana</i>	25
3.1.4.5	Proteínas de <i>G. diazotrophicus</i> reguladas em resposta ao cocultivo com <i>A. thaliana</i>	27
3.1.5	DISCUSSÃO	29
3.1.6	CONCLUSÕES	34
3.1.7	PERSPECTIVAS.....	34
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA ABC-F ETTA DE GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS PAL5 NA RESPOSTA A ANTIBIÓTICOS, ESTRESSES AMBIENTAIS E NA INTERAÇÃO INICIAL BACTÉRIA-PLANTA	35
3.2.1	INTRODUÇÃO	35
3.2.2.1	Proteínas ABC-F em bactérias.....	37
3.2.2.2	Resposta bacteriana aos antibióticos	39
3.2.2.2.1	Antibióticos com ação na parede celular.....	39
3.2.2.2.2	Antibióticos com ação na síntese de proteínas	40
3.2.2.2.3	Antibióticos inibidores da replicação do DNA.....	41
3.2.2.3	Exsudatos vegetais e sua influência na microbiota do solo	41
3.2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.2.3.1	Microrganismo e condições de cultura	43
3.2.3.2	Organização genômica e análises <i>in silico</i> do mutante GDI_3490 em <i>G. diazotrophicus</i> PAL 5	44
3.2.3.3	Análises filogenéticas das proteínas ABC-F etta	44

3.2.3.4	Ensaio para análise de resistência a antibióticos em <i>G. diazotrophicus</i> e mutante ΔGDI_{3490}	45
3.2.3.5	Análise de morte celular	45
3.2.3.6	Ensaio para análise de sensibilidade a estresse osmótico em <i>G. diazotrophicus</i> e mutante ΔGDI_{3490}	46
3.2.3.7	Ensaio de solubilização de fósforo e zinco.....	46
3.2.3.8	Obtenção das plantas	47
3.2.3.9	Crescimento das plântulas e cocultivo de bactérias.....	47
3.2.3.10	Análises estatísticas.....	48
3.2.4.1	Organização genômica do gene GDI-3490 em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5	48
3.2.4.2	Análise filogenética da proteína ABC-f ettA	49
3.2.4.3	Importância da proteína ABC-F ettA na resistência a antibióticos em <i>G. diazotrophicus</i>	50
3.2.4.4	A mutação no gene GDI_3490 afeta a tolerância de <i>G. diazotrophicus</i> PAL 5 aos estresses salino e osmótico.....	54
3.2.4.5	ABC-F ettA não participa da solubilização de fosfato e zinco em <i>G. diazotrophicus</i>	56
3.2.4.6	ABC-F ettA é essencial para a resposta de <i>G. diazotrophicus</i> a exsudatos vegetais	57
3.2.5	DISCUSSÃO	59
3.2.6	CONCLUSÕES.....	64
3.2.7	PERSPECTIVAS.....	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	APÊNDICE.....	85

RESUMO

TAMIRES CRUZ DOS SANTOS; D.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Abril, 2019. Resposta de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 a exsudatos vegetais: perfil proteômico e papel da proteína ABC-F ettA. Orientador: D.Sc. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: D.Sc. Valdirene Moreira Gomes e D.Sc. Vanildo Silveira.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria promotora do crescimento vegetal com grande potencial na agricultura. As associações deste tipo de bactérias se dão por um complexo mecanismo de comunicação com as plantas hospedeiras. Durante a interação com bactérias, plantas são capazes de exsudar compostos que podem favorecer o desenvolvimento de algumas espécies bacterianas ou reprimir o desenvolvimento de outras. As bactérias, por sua vez, desenvolveram diversos mecanismos de interação com as plantas, respondendo a tais substâncias ou mesmo modulando sua produção. O presente trabalho teve como objetivo estudar a resposta de *G. diazotrophicus* PAL5 aos exsudatos vegetais, bem como testar a importância da proteína ABC-F ettA neste processo. No primeiro capítulo foi avaliada a resposta bacteriana aos exsudatos vegetais, tanto durante o cocultivo com plantas de *Arabidopsis* quanto na presença de exsudatos filtrados. Os resultados revelaram que o cocultivo induz a multiplicação bacteriana e que a exsudação de metabólitos favoráveis pelas plantas é induzida pela presença da bactéria. As análises proteômicas revelaram um total de 450 proteínas identificadas, das quais 51 foram reguladas, sendo 39 proteínas induzidas e 12 reprimidas. Entre as proteínas que se mostraram interessantes,

estão *metE*, *acnA*, *EttA*, *ilvC* e *clpX*. Os resultados revelaram um mecanismo sincronizado de interação entre *G. diazotrophicus* e *A. thaliana*, em que substâncias produzidas por ambos os componentes modulam as respostas observadas. No capítulo dois, foi estudado o papel da proteína ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* na resistência a antibióticos, na resposta a estresses ambientais e na resposta a exsudatos vegetais. Para tanto, um mutante defeutivo para tal proteína, $\Delta ABC-F\ ettA$, foi comparado com a bactéria selvagem. O mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ se mostrou mais sensível que a estirpe selvagem quando tratado com antibióticos, comprovando o papel desta proteína na proteção contra tais substâncias. A proteína ABC-F *ettA* também se mostrou essencial para a resistência da bactéria a estresses osmóticos, tendo o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ se mostrado mais sensível que a estirpe selvagem. Foi avaliada também a importância de ABC-F *ettA* na interação bactéria-planta. O mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ foi colocado em cocultivo com plantas de *Arabidopsis* com dez dias de idade e também exposto aos exsudatos vegetais e exsudatos de cocultivo. Os resultados mostraram que a mutação no gene *ABC-F ettA* eliminou a capacidade de *G. diazotrophicus* responder aos exsudatos vegetais no âmbito da indução da multiplicação bacteriana. Juntos, os dados deste trabalho revelaram a importância dos exsudatos vegetais durante o processo inicial de interação entre *G. diazotrophicus* e plantas de *Arabidopsis* e que proteínas bacterianas específicas são reguladas neste processo. Também foi possível mostrar a importância da proteína ABC-F *ettA* na resistência a antibióticos e estresses osmóticos, bem como sua importância na interação inicial bactéria-planta. Tais resultados abrem perspectivas para o entendimento dos mecanismos envolvidos no processo inicial de interação entre bactérias endofíticas benéficas e plantas.

Palavras-chave: Exsudatos vegetais; Bactérias promotoras do crescimento vegetal; Estresse ambiental; Resistência a antibióticos.

ABSTRACT

TAMIRES CRUZ DOS SANTOS; D.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, April, 2019. Response of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 to plant exudates: proteomic profile and role of ABC-F ettA protein. Advisor: D.Sc. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Counselors: D.Sc. Valdirene Moreira Gomes e D.Sc. Vanildo Silveira.

Gluconacetobacter diazotrophicus is a plant growth promoting bacterium with great potential in agriculture. The associations of this type of bacteria are given by a complex mechanism of communication with the host plants. During interaction with bacteria, plants are able to exude compounds that may favor the development of some bacterial species or suppress the development of others. Bacteria, in turn, have developed various mechanisms of interaction with plants, responding to such substances or even modulating their production. The present work aimed to study the response of *G. diazotrophicus* PAL5 to plant exudates, as well as to test the importance of the ABC-F ettA protein in this process. In the first chapter the bacterial response to the plant exudates was evaluated, both during co-cultivation with *Arabidopsis* plants and in the presence of filtered exudates. The results showed that co-cultivation induces bacterial multiplication and that the exudation of plant-favorable metabolites is induced by the presence of the bacterium. The proteomic analyzes revealed a total of 450 identified proteins, of which 51 were regulated, being 39 proteins induced and 12 repressed proteins. Among the proteins that have been shown to be interesting are metE, acnA, EttA, ilvC, and clpX. The results revealed a synchronized mechanism of interaction between *G.*

diazotrophicus and *A. thaliana*, where substances produced by both components modulate the responses observed. In chapter two, the role of the ABC-F *ettA* protein of *G. diazotrophicus* in antibiotic resistance, in response to environmental stresses and in response to plant exudates was studied. To that end, a defective mutant for such a protein, $\Delta ABC-F\ ettA$ was compared to the wild-type bacterium. The $\Delta ABC-F\ ettA$ mutant showed to be more sensitive than the wild-type strain when treated with antibiotics, proving the role of this protein in the protection against such substances. The ABC-F *ettA* protein was also shown to be essential for bacterial resistance to osmotic stress, where the $\Delta ABC-F\ ettA$ mutant was shown to be more sensitive than the wild-type strain. The importance of ABC-F *ettA* in the bacterium-plant interaction was also evaluated. The $\Delta ABC-F\ ettA$ mutant was co-cultivated with ten-day-old Arabidopsis plants and also exposed to plant exudates and co-culture exudates. The results showed that the mutation in the ABC-F *ettA* gene eliminated the ability of *G. diazotrophicus* to respond to plant exudates in the induction of bacterial multiplication. Together, data from this work revealed the importance of plant exudates during the initial interaction process between *G. diazotrophicus* and Arabidopsis plants and that specific bacterial proteins are regulated in this process. It was also possible to demonstrate the importance of the ABC-F *ettA* protein in resistance to antibiotics and osmotic stresses, as well as its importance in the initial bacterial-plant interaction. These results open perspectives for the understanding of the mechanisms involved in the initial interaction process between beneficial endophytic bacteria and plants.

Keywords: Plant exudates; Plant growth promoting bacteria; Environmental stress; Resistance to antibiotics.

1. INTRODUÇÃO

A crescente necessidade global por alimentos e a diminuição dos recursos naturais constituem desafios para a produção agrícola (Matson *et al.*, 1997; Tilman *et al.*, 2002). Além disso, a forma como a agricultura convencional vem sendo conduzida acarreta grandes gastos com fertilizantes minerais (Zhang *et al.*, 2010). Apesar de serem aliados no aumento da produção agrícola, existe uma baixa eficiência de uso associada à aplicação de fertilizantes minerais na agricultura. Tal fato acarreta a necessidade da aplicação exacerbada destes compostos para que ocorra um efeito positivo no desenvolvimento das culturas, levando a perdas de recursos financeiros e aumentos nos riscos ambientais (Zhang *et al.*, 2010).

A utilização de abordagens biotecnológicas é uma alternativa ao uso massivo de fertilizantes minerais na agricultura. Entre as fontes de potenciais insumos a serem explorados pela biotecnologia, destaca-se a rizosfera, que inclui a raiz da planta e todo o solo adjacente (Hartmann *et al.*, 2008; Jacoby *et al.*, 2018). Na rizosfera, são exsudados componentes de baixo e alto peso molecular, altamente variáveis de acordo com a espécie vegetal e condições do ambiente. Estes componentes influenciam diretamente a população microbiana da rizosfera (Pii *et al.*, 2015; Sasse *et al.*, 2018). Estima-se que mais de 20% dos produtos fotossintéticos sejam exsudados pelas plantas na rizosfera (Bais *et al.*, 2006). Composto estes exsudatos, estão os compostos derivados de carbono, compostos fenólicos, metabólitos secundários, aminoácidos, entre outros (Rovira,

1969; Sasse *et al.*, 2018). Estes compostos podem agir de maneira benéfica, atraindo microrganismos ou como agentes antimicrobianos (Haichar *et al.*, 2008).

Entre os microrganismos benéficos atraídos por compostos exsudados pelas plantas na rizosfera, merecem destaque as bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria*, PGPB). Estas bactérias são capazes de se associar às raízes e estimular o crescimento das plantas hospedeiras pela solubilização de zinco e fósforo, fixação biológica do nitrogênio e produção de fitormônios (Glick, 2012). Porém alguns fatores limitam a eficiência do processo de interação PGPB/planta hospedeira, como a seca, variações de temperatura, variação osmótica do ambiente, presença de metais pesados e de outros agente tóxicos (Pérez-Pantoja *et al.*, 2013; Sévin *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2001).

Entre as PGPB, muitas espécies podem ser rizosféricas, enquanto outras são epifíticas ou endofíticas. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma PGPB endofítica, inicialmente isolada de plantas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Dobereiner, 1988). Pode promover o crescimento em diversas outras espécies vegetais, como cana-de-açúcar, café e *Arabidopsis* (Rangel de Souza *et al.*, 2016; Reis, 1994). Além disso, esta bactéria tem resistência a diversos estresse abióticos, como seca, variação de temperatura, metais pesados, sacarose e antibióticos (Cavalcante e Dobereiner, 1988; Mowade e Bhattacharyya, 2000; Tejera *et al.*, 2003; Intorne *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos têm mostrado que a regulação proteica em *G. diazotrophicus* é alterada durante o processo de interação entre seus hospedeiros (Lery *et al.*, 2011; Meneses *et al.*, 2017; Meneses *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2010). Análises proteômicas feitas em *G. diazotrophicus* exposta a exsudatos vegetais de cana-de-açúcar revelaram diversas proteínas potencialmente importantes para o processo de interação bactéria-planta (Lery *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2010). Em trabalho também proteômico conduzido com outra bactéria benéfica, desta vez exposta a extrato vegetal, foi revelada mudança no perfil proteômico da bactéria, mostrando que o hospedeiro pode ser capaz de induzir respostas específicas em bactérias benéficas durante a associação (Cordeiro *et al.*, 2013), não sendo ainda claros os mecanismos moleculares que estão por trás dos processos de interação em relação a plantas dicotiledôneas.

Algumas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a esses estresses ambientais. Alguns exemplos destes mecanismos são as bombas de efluxo multidrogas para o efluxo de substâncias antimicrobianas, produção de sideróforos (de Paula Soares *et al.*, 2015), bombas de transporte de metais, entre outros (Intorne *et al.*, 2012).

Diversos mecanismos bacterianos de resistência a antibióticos têm sido abordados na literatura (Alcalde-Rico *et al.*, 2016; Bizzarro *et al.*, 2008; Kerr *et al.*, 2005; Levin-Reisman *et al.*, 2017a). Entre o conjunto de atributos relacionados aos mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos, encontra-se a proteína ABC-F (Sharkey *et al.*, 2016; Sharkey e O'Neill, 2018, Ero *et al.*, 2019). Apesar de pertencer à família de proteínas ABC, comumente descritas como transportadoras, a proteína ABC-F não tem tal atividade (Sharkey *et al.*, 2016). ABC-F é descrita como participante da resistência a antibióticos, reparo do DNA (Davidson *et al.*, 2008) e controle da tradução (Boël *et al.*, 2014). A maioria destes mecanismos associados à proteína ABC-F foram caracterizados em bactérias patogênicas de humanos, mas nada é conhecido referente ao seu papel em bactérias que se associam a plantas.

Diante do exposto, o primeiro capítulo deste trabalho foi dedicado a avaliar a resposta da bactéria *G. diazotrophicus* ao cocultivo com plântulas de *A. thaliana*. O efeito dos exsudatos vegetais sobre a multiplicação bacteriana foi avaliado. Por meio de análises proteômicas comparativas, foram identificadas as principais proteínas reguladas neste processo de interação.

No segundo capítulo deste trabalho, foi estudado o papel da proteína ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* concernente à resistência a antibióticos, a estresses ambientais e à resposta bacteriana a exsudatos vegetais.

Juntos, estes trabalhos contribuem para um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na interação entre *G. diazotrophicus* e plantas, com ênfase nas etapas iniciais da interação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os mecanismos de *G. diazotrophicus* PAL5 envolvidos na resposta a exsudatos vegetais, com ênfase nas principais proteínas bacterianas reguladas e no papel da proteína reguladora da atividade ribossomal ABC-F *ettA*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito do cocultivo de *G. diazotrophicus* PAL5 com plantas de *Arabidopsis thaliana*, sobre o crescimento bacteriano.
- ✓ Identificar, através de análise proteômica comparativa, as proteínas de *G. diazotrophicus* reguladas durante o cocultivo com plantas de *A. thaliana*.
- ✓ Verificar a participação da proteína ABC-F *ettA* na resistência a antibióticos em *G. diazotrophicus*, através da avaliação do mutante $\Delta ABC-F \text{ ettA}$.
- ✓ Verificar o papel da proteína ABC-F *ettA* na resposta a estresses ambientais, pela comparação da resistência do mutante $\Delta ABC-F \text{ ettA}$ com a estirpe selvagem, quando expostos a NaCl, PEG e sacarose.
- ✓ Verificar a importância da proteína ABC-F *ettA* para a solubilização de fósforo e zinco.
- ✓ Avaliar a importância da proteína ABC-F *ettA* para a resposta bacteriana aos exsudatos vegetais, através da análise do mutante $\Delta ABC-F \text{ ettA}$, em cocultivo com plantas *A. thaliana in vitro* e na presença de exsudatos filtrados

3. CAPÍTULOS

3.1 RESPOSTA DE *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS* PAL5 AO COCULTIVO COM PLANTAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* E SEU EFEITO NO PERFIL PROTEÔMICO

3.1.1 INTRODUÇÃO

A interação entre bactérias e plantas envolve mecanismos complexos de reconhecimento e sinalização, ativando respostas específicas (Dennis *et al.*, 2010; Sasse *et al.*, 2018). As raízes representam a principal região da planta para interação com bactérias, onde os metabólitos exsudatos atuam como fonte de nutrientes, energia e hospedagem para microrganismos (Gibson *et al.*, 2008; Den Herder e Parniske, 2009; Masson-Boivin *et al.*, 2009).

A composição específica do rizomicrobioma associado a cada espécie de planta indica que as plantas modelam a comunidade microbiana associada às raízes, principalmente pela exsudação de metabólitos (Sasse *et al.*, 2018). Os compostos exsudados pelas raízes das plantas são conhecidos como rizodepósitos, sendo ricos em açúcares, aminoácidos, mucilagens e metabólitos voláteis capazes de atrair bactérias (Dennis *et al.*, 2010; Farrar *et al.*, 2014). Durante o processo de interação, as bactérias também são capazes de exsudar

substâncias necessárias para o estabelecimento de tal associação com o hospedeiro (Wang *et al.*, 2017). Bactérias benéficas expostas ao extrato da raiz de *Arabidopsis* exsudam uma série de compostos, como aminoácidos, derivados de auxina e nucleotídeos, que podem auxiliar no processo de interação (Jacoby *et al.*, 2018).

Entre os microrganismos associados às plantas, as bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB) têm recebido uma importância crescente na agricultura. As PGPB podem interagir com as plantas, colonizando a rizosfera, as superfícies de folhas e raízes ou estabelecendo colonização endofítica (Lery *et al.*, 2008; Zúñiga *et al.*, 2017).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria endofítica Gram-negativa, fixadora de nitrogênio, inicialmente isolada de plantas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Dobereiner, 1988). Essa bactéria também é capaz de promover o crescimento de plantas em várias outras espécies de plantas, como batata-doce, abacaxi, café e *Arabidopsis* (Rangel de Souza, 2016; Reis, 1994). Nos últimos anos, *G. diazotrophicus* tem sido destacada como modelo de estudo para associação endofítica, proporcionando um melhor entendimento das vias metabólicas envolvidas nesse processo de interação bactéria-plantas (Bertalan *et al.*, 2009). Apesar dos estudos acerca do conhecimento dos mecanismos moleculares que interagem na interação entre *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar, dados detalhados sobre como ocorre essa interação ainda são escassos (Letícia M. S. Lery *et al.*, 2011; Meneses *et al.*, 2017; Meneses *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2010).

Estudos genômicos, transcriptômicos e proteômicos abordaram os genes e proteínas regulados durante a associação de *G. diazotrophicus* com hospedeiros vegetais (Lery *et al.*, 2011; Meneses *et al.*, 2017; Meneses *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2010). Entre elas, as mesmas abordagens proteômicas analisaram as principais vias reguladas em *G. diazotrophicus* quando expostas a exsudatos de cana-de-açúcar, revelando ativação de respostas específicas (von Krüger *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2010). Entretanto, os mecanismos moleculares que modulam essa interação ainda não são claros, com ênfase naqueles ativados durante a associação com plantas hospedeiras dicotiledôneas.

O presente trabalho objetivou avaliar a resposta de *G. diazotrophicus* a exsudatos vegetais, através de análises de cocultivos com plantas de *A. thaliana*,

bem como de exsudatos filtrados. As respostas moleculares ativadas na bactéria durante o cocultivo foram estudadas através de proteômica comparativa (LC-MS/MS), tendo sido identificadas as principais proteínas bacterianas reguladas.

3.1.2 REVISÃO

3.1.2.1 Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal e sua Importância

O crescimento exponencial da população mundial, somado à alta demanda por mais alimentos e à sua má distribuição, são causas de grandes preocupações dos governos nos últimos anos. Para manter a produção no patamar em que se encontra, o uso de adubos e de fertilizantes sintéticos se faz necessário (Glick, 2015). Porém o uso contínuo desses fertilizantes causa grandes impactos ao meio ambiente, assim, explorar novas alternativas para contornar esse problema é de extrema importância (Oteino *et al.*, 2015). Uma alternativa ecologicamente viável são as Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV), e o uso desses microrganismos, que fazem interações benéficas com as plantas, pode ser um grande aliado ao desuso dos fertilizantes químicos usados em larga escala na agricultura e, assim, proporcionar uma produção mais sustentável e com menor impacto possível ao ambiente (Tilman *et al.*, 2002).

A interação entre plantas e esses microrganismos tem sido estudada há vários anos (Bergersen, 1971; Hardoim *et al.*, 2015; Sasse *et al.*, 2018). Diversas interações já são conhecidas, sendo benéficas ou patogênicas. As associações benéficas, através das bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal, se destacam por terem a capacidade de melhorar o crescimento e o desenvolvimento do hospedeiro. Essas associações endofíticas oferecem às bactérias a vantagem de obterem proteção diante de mudanças ambientais que possam afetá-las e de redução da competição por nutrientes com outras bactérias da rizosfera. O interior da planta tem uma baixa disponibilidade de oxigênio, sendo um ambiente propício para a fixação biológica de nitrogênio, apresentando,

assim, efeito direto na promoção do crescimento vegetal (Reinhold-Hurek e Hurek, 2011).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal, de modo geral, melhoram o desenvolvimento das plantas de diversas maneiras, seja atuando no controle biológico de diversas doenças, auxiliando na produção de fitormônios como auxina, giberelina e citocinina, na fixação biológica de nitrogênio e na solubilização de fosfato (Glick, 2012; Glick, 2015; Oteino *et al.*, 2015).

Bactérias endofíticas já foram isoladas de diversas plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, tais como cana-de-açúcar (Cavalcante e Dobereiner, 1988), videira (López-Fernández *et al.*, 2016), milho, tomate, melão, pimenta (Xia *et al.*, 2015), arroz (Chung *et al.*, 2015), batata (Rado *et al.*, 2015), trigo (Robinson *et al.*, 2016), feijão (Lopes *et al.*, 2015), entre outras.

A fixação biológica do nitrogênio é um dos mecanismos mais bem estudados de promoção do crescimento vegetal induzido por bactérias (Bergersen, 1971; Broothaerts *et al.*, 2005; Van Rhijn e Vanderleyden, 1995). Sabe-se que o nitrogênio é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Embora esteja em grande abundância na atmosfera, esse elemento não está na forma assimilável pelas plantas. A maior parte do fornecimento de nitrogênio advém da adubação química nitrogenada, que proporciona um importante aumento no rendimento das culturas, mas a utilização destes fertilizantes nitrogenados representa altos custos econômicos na produção agrícola e traz diversos prejuízos ambientais (Ferguson *et al.*, 2010). Neste cenário, a fixação biológica de nitrogênio, um processo natural em que ocorre redução do nitrogênio atmosférico a amônia, feita por microrganismos, pode ser uma alternativa de baixo custo para melhorar a produção agrícola (de Bruijn, 2015).

A interação planta-microrganismo é de grande importância para a promoção do crescimento vegetal, visto essas bactérias apresentarem diversas características benéficas para plantas, que vão desde o incremento do crescimento pela produção de hormônios, à fixação biológica de nitrogênio e à proteção contra patógenos, entre outros (Glick, 2015; Glick, 2012; Santoyo *et al.*, 2016). Por isso são importantes estudos a respeito e esclarecimentos do funcionamento dos mecanismos dessa interação, a fim de otimizar diversas estratégias que auxiliem a promoção de crescimento

3.1.2.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

G. diazotrophicus pertence ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rhodospirillales, família Acetobacteraceae, gênero *Gluconacetobacter* (Kerstens et al., 2006) e foi isolada primeiramente da cana-de-açúcar. É uma bactéria ácido-tolerante (Cavalcante & Dobereiner, 1988), sensível a condições de seca, apresenta alta tolerância a tratamentos de calor e a elevadas concentrações de sais em meio de cultura (Tejera et al., 2003). Sua temperatura ideal de crescimento e fixação de N₂ é 30° C, crescendo bem em altas concentrações de sacarose (30%) (Cavalcante e Dobereiner, 1988).

A associação entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar é denominada como endofítica obrigatória, já que a bactéria vive apenas no interior da planta, não conseguindo sobreviver no solo (Baldani et al., 1997). Sua colonização não causa sintomas visíveis de doença ou mudanças na anatomia vegetal, ocorrendo nos espaços intercelulares (Dong et al., 1994) do colmo, podendo ser encontrada também em folhas e raízes.

Entre as bactérias diazotróficas, *G. diazotrophicus* é um organismo extremamente aerotolerante e tem um sistema respiratório com propriedades únicas associadas a seu comportamento. Como muitas bactérias, *G. diazotrophicus* contém uma ampla gama de desidrogenases ativas ligadas à membrana, que doam elétrons diretamente para a cadeia respiratória (Gómez-Manzo et al., 2010; Gómez-Manzo et al., 2008).

G. diazotrophicus é capaz de colonizar diversas espécies vegetais, incluindo café (Jimenez-Salgado et al., 1997), abacaxi (Baldani e Baldani, 2005), arroz (Muthukumarasamy et al., 2005), trigo e sorgo (Luna et al., 2010) e *Arabidopsis* (Rangel de Souza et al., 2016) e milho (Cocking et al., 2006). As principais portas de entrada dessa bactéria nas plantas são: ponta de raízes, células da coifa e meristema, zonas de emergência de raízes laterais, pelos radiculares e estômatos (Luna et al., 2010). *G. diazotrophicus* também é conhecida por sua capacidade de promover crescimento vegetal, fazer fixação biológica de nitrogênio (FBN) no solo, sendo essa característica muito importante para o cultivo da cana-de-açúcar, solubilizar fosfato e produzir alguns hormônios como auxinas e giberelinas (Bastián et al., 1998; Muthukumarasamy et al., 2000). Todos esses atributos fazem dessa bactéria uma grande aliada do crescimento vegetal. Esta bactéria pode também solubilizar nutrientes como fósforo e zinco

(Intorne *et al.*, 2009; Saravanan *et al.*, 2007), produzir sideróforos, como também atuar no biocontrole de fitopatógenos pela produção de bacteriocina (Blanco *et al.*, 2005).

Outra importante característica de *G. diazotrophicus* é sua tolerância a estresses ambientais. Essa bactéria tem a capacidade de crescer em meios de cultura com até 30% de sacarose (Cavalcante and Dobereiner, 1988), o que sugere sua alta tolerância a estresse osmótico. Apesar de ter demonstrado resistência ao estresse osmótico, *G. diazotrophicus* se mostra sensível ao estresse salino (Velázquez-Hernández *et al.*, 2011). Contudo, os danos causados por tal estresse podem ser oriundos do efeito iônico e não osmótico, uma vez que *G. diazotrophicus* consegue se desenvolver bem em altas concentrações de outros tipos de sais, como N_2SO_4 e K_2SO_4 (De Oliveira *et al.*, 2016). Além disso, estudos realizados por Intorne *et al.*, 2012 demonstraram que esta bactéria possui elevada resistência a metais pesados, justificando seu estudo na busca por novos mecanismos de resistência a estresses em bactérias.

3.1.2.3 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudo

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh é uma dicotiledónea descoberta por Johannes Thal (de onde surge o nome *thaliana*) nas montanhas Harz, Alemanha, no século XVI, e é amplamente distribuída por vários continentes, principalmente nas regiões temperadas do hemisfério norte (Al-Shehbaz *et al.*, 2002; Koornneef e Meinke, 2010). *A. thaliana* não é uma planta economicamente importante, porém oferece vantagens para a pesquisa básica em genética e biologia molecular. É membro da família da mostarda (Cruciferae ou Brassicaceae), tem ciclo de vida curto, o que acaba se tornando uma importante vantagem em relação a outras espécies. A sequência de processos envolvendo germinação, formação da roseta, florescimento e maturação das primeiras sementes é completada em seis semanas (Meinke *et al.*, 1998).

Existem diferentes ecótipos disponíveis para diversas análises experimentais, entre eles destaca-se o ecótipo Colúmbia (COL-0), um dos mais utilizados para estudos genéticos e moleculares (Nishimura e Dangl, 2010). O genoma de *A. thaliana* contém 120 Mb e está organizado em cinco cromossomos, contendo aproximadamente 22.000 genes (Meinke *et al.*, 1998). Pelo fato de seu

genoma ser pequeno, *A. thaliana* apresenta vantagem para seu uso em estudos genéticos e moleculares.

Esta espécie tem sido utilizada em alguns estudos com o objetivo de entender quais genes bacterianos estão envolvidos na interação com plantas e quais os efeitos desta relação nos aspectos químicos e fisiológicos de ambos os organismos (Mitchell *et al.*, 2015; Zamioudis *et al.*, 2015).

Diversos trabalhos acerca da resposta aos exsudatos de *Arabidopsis* e sua interação com microrganismos vêm sendo desenvolvidos (Jacoby *et al.*, 2018; Micallef *et al.*, 2009; Rudrappa *et al.*, 2007). *Arabidopsis* exsuda diferentes substâncias capazes de atrair espécies benéficas e patogênicas (Jacoby *et al.*, 2018; Rudrappa *et al.*, 2007). Jacoby *et al.* (2018), em trabalho em que comparou o perfil de exsudatos de *Arabidopsis* em cocultivo com espécies bacterianas benéficas e patogênicas, perceberam que havia mudança nos metabólitos exsudados pela planta quanto ao tipo de bactéria em que era posta em cocultivo. Witzel *et al.* (2017) verificaram que o perfil de metabólitos de *Arabidopsis* é bastante afetado pela presença da bactéria. Outros trabalhos também têm mostrado que plantas de *Arabidopsis* são capazes de exsudar diversas substâncias que podem atrair microrganismos benéficos para suas raízes, como ácido jasmônico, alguns flavonoides e glicosinolatos (Carvalhais *et al.*, 2015; Mönchgesang *et al.*, 2016).

Neste cenário, *Arabidopsis* se mostra um excelente modelo de estudo para exsudatos vegetais e de como eles podem participar do processo de interação bactéria-plantas, abrindo portas para diversos novos estudos.

3.1.2.4 Proteômica

O grande avanço nas pesquisas nas áreas de genômica e pós-genômica tem gerado dados relevantes sobre os perfis de expressão de genes e proteínas. Entre as “Ômicas”, a proteômica mostra grande potencial para o entendimento das funções biológicas através das informações oriundas da expressão de proteínas (Baginsky, 2009; Wilkins *et al.*, 1996).

A proteômica é conhecida como a análise em larga escala de um conjunto de proteínas de uma determinada célula, tecido ou organismo, sob determinadas condições ambientais, ou estágio de desenvolvimento, refletindo o momento específico da expressão (Wilkins *et al.*, 1996). As técnicas proteômicas facilitam a

identificação e a caracterização do nível de modulação das proteínas e as modificações em resposta a diferentes condições. Com o advento da técnica, a maioria dos estudos dos proteomas tinha como base apenas os resultados de análises de perfis proteicos em eletroforese bidimensional. Diversos avanços tecnológicos na área, principalmente, das técnicas de sequenciamento, possibilitaram a identificação do perfil de proteínas através da espectrometria de massas (MS) (Vanderschuren *et al.*, 2013). A técnica de proteômica utiliza programas de bioinformática para a análise dos dados, correlação das informações e sua disponibilização em bancos de dados de domínio público (Baginsky, 2009)

O volume de informações geradas pelos estudos proteômicos vem contribuindo para grandes avanços no entendimento das respostas moleculares de plantas e microrganismos em diferentes condições. Nesse campo da pesquisa, a utilização de proteômica comparativa é muito comum, por ser baseada na comparação da composição de diferentes proteomas (Kosová *et al.*, 2011).

Para investigar a dinâmica das proteínas durante as respostas de plantas a estresses bióticos e abióticos, têm sido utilizadas análises proteômicas (Vanderschuren *et al.*, 2013). Estudos foram conduzidos em plantas de arroz (*Oryza sativa*) e *A. thaliana* para apurar respostas a estresses abióticos, como frio, calor, seca, salinidade, ozônio, hipóxia, anoxia, herbicidas, condições inadequadas de luz, desbalanço na nutrição mineral, metais pesados, radioatividade e ferimentos mecânicos, pela utilização de técnicas proteômicas. Com isso, foi possível identificar vias de resposta à proteína sob várias condições de estresse (Kosová *et al.*, 2011). Além disso, estudos sobre interação planta-patógeno vêm utilizando a proteômica como ferramenta de pesquisa para averiguar a expressão das proteínas e esclarecer as complexas redes de resposta da defesa vegetal (Mukherjee *et al.*, 2010).

As análises proteômicas permitem que os estudos com microrganismos não se limitem à caracterização básica *in vitro*. Diante disso, a proteômica microbiana pode ser utilizada em diversos ambientes com alta complexidade e sofisticação, como, por exemplo, na interação planta-patógeno, em comunidades microbianas mistas e na metaproteômica microbiana (Wilmes e Bond, 2006).

Estudos proteômicos podem auxiliar no entendimento acerca da interação bactéria-plantas. Diversos estudos proteômicos mostraram que durante o processo

de interação há mudanças no perfil proteico bacteriano quando em contato com plantas hospedeiras (Cordeiro *et al.*, 2013; Lery *et al.*, 2008; Lery *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2010; dos Santos *et al.*, 2010). Lery *et al.* (2011) comprovaram que *G. diazotrophicus* identificou proteínas somente expressas na presença da planta, mostrando que proteínas específicas participam do processo de interação bactéria-planta. Cordeiro *et al.* (2013). Cordeiro *et al.* (2013), ao procederem a análises proteômicas em bactéria benéfica exposta ao extrato vegetal, identificaram mudanças no perfil proteômico da bactéria, mostrando que o hospedeiro pode ser capaz de induzir respostas específicas em bactérias benéficas durante a associação.

Portanto, estudos de proteômica têm papel fundamental para o esclarecimento do funcionamento dos sistemas biológicos. Nesse sentido, as ferramentas proteômicas são importantes na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação bactérias-planta.

3.1.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1 Obtenção das plântulas

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) foram submetidas à desinfestação superficial em fluxo laminar, lavadas com etanol 95% durante 1 min, colocadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5%, sob agitação por 10 min, na sequência, foram lavadas em água ultrapura estéril e transferidas para tubos estéreis. As sementes foram mantidas por 2 dias, a 4° C, na ausência de luz para a quebra da dormência. As sementes foram germinadas em placas de Petri em meio MS (Murashige, T.; Skoog, 1962) ½ F, com sacarose 0.5% e tampão MES 0.05%, pH a 5,7, e mantidas em BOD por 10 dias, a 23° C e irradiância de 120 mol/fótons m⁻² s⁻¹, durante 12 horas diárias.

3.1.3.2 Microrganismo e condições de cultivo

A estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* PAL 5 foi cultivada em meio DYGS, composto por (em g.L⁻¹) 2,0 glicose, 1,5 peptona bacteriológica, 2,0

extrato de levedura, 0,5 K₂HPO₄, 0,5 MgSO₄.7H₂O, 3,75 ácido glutâmico, com o pH do meio ajustado para 6,0 (Döbereiner *et al.*, 1999). O cultivo das células bacterianas ficou sob agitação e temperatura constantes (250 rpm min⁻¹ e 30° C) em agitador (C25 Incubator, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) até atingir densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) igual a 1,0 (~10⁸ células.mL⁻¹).

3.1.3.3 Crescimento das plântulas e cocultivo de bactérias e preparação das amostras de exsudatos de plantas, bactérias e cocultivo

Aproximadamente dez plântulas foram cultivadas *in vitro* por dez dias em placas de Petri contendo 18 ml de meio MS de meia força contendo 0,5% de sacarose sem a adição de hormônios. Plântulas de *A. thaliana* com 10 dias de idade foram então inoculadas com *G. diazotrophicus* a uma concentração final de 10⁷ células mL⁻¹. O tratamento controle foi feito por inoculação de *G. diazotrophicus* a uma concentração de 10⁷ células mL⁻¹ em meio MS sem mudas de *A. thaliana*. As placas de Petri foram mantidas a 23° C sob irradiância de 120 mol/fotóns m⁻² s⁻¹. O crescimento bacteriano foi quantificado por análise de densidade óptica (D.O.₆₀₀) do meio de controle e cocultivo.

Exsudatos de *G. diazotrophicus*, *A. thaliana* e cocultivo *G. diazotrophicus/A. thaliana* foram obtidos e sido feitas três repetições biológicas de cada tratamento.

Os exsudatos de plantas foram recolhidos por filtração do meio de cultura com filtros de seringa (0,22µm) e armazenados a -80° C.

Para a obtenção dos exsudatos de *G. diazotrophicus*, as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo 18 ml de meio MS de meia força e cultivadas, por aproximadamente, 24 horas a 23° C. Quando as culturas bacterianas atingiram D.O.₆₀₀= 1,0, elas foram transferidas para tubos do tipo *ependorf* e centrifugadas a 8.000g por 5 min. O sobrenadante foi filtrado com um filtro de seringa (0,22 µm) e armazenado a -80° C.

Os exsudatos do cocultivo de plântulas de *A. thaliana* e *G. diazotrophicus* foram obtidos de ensaios de cocultivo feitos como descrito no item anterior. Após o cocultivo, o meio foi coletado e centrifugado a 8.000 g por 5 min. O sobrenadante foi filtrado com um filtro de seringa (0,22 µm) e armazenado a -80° C.

3.1.3.4 Análise Proteômicas

Três repetições biológicas de células de *G. diazotrophicus* foram coletadas de culturas em meio MS (controle) e de bactérias cocultivadas com *A. thaliana* e utilizadas para análise proteômica. Para este propósito, 6,5 mL de cada amostra de meio de cultivo foram centrifugados para coletar as bactérias. Depois de descartar o sobrenadante, o pellet foi ressuspensão em 300 µL de tampão de extração TCA/Acetona às amostras (ácido tricloroacético 10% em acetona com 20 mM de ditionitrito - DTT), que foram mantidas sob agitação constante a 4° C por 60 min. Em seguida, foram incubadas por 60 min a -20° C e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 g a 4° C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado por três vezes pela adição de acetona gelada contendo 20 mM de DTT, com breve agitação e centrifugação a 12.000 g por 5 min, 4° C. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco em temperatura ambiente. Os pellets foram ressuspensos em 300 µL de tampão ureia/tiourea (7M ureia, 2M tiourea, 1% DTT, 2% triton X-100, 5µM pepstatina, 1mM fenilmetanosulfonilfluorídrico – PMSF) e mantidos sob agitação até completa homogeneização das amostras. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min, a 4° C, o sobrenadante proveniente desta centrifugação foi coletado, e as proteínas totais, quantificadas.

A concentração de proteínas totais foi estimada com a utilização do 2-D Quant Kit (GE Healthcare, UK), seguindo recomendações do fabricante. A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão com soro de albumina bovina (BSA, GE Healthcare, UK) foi feita em leitor de microplacas Synergy 2 Multi-mode Reader (Biotek Instruments, USA) a 485 nm. As amostras foram normalizadas com base na quantificação individual para obter a concentração final de 50µg de proteínas totais por amostra. Elas foram armazenadas em ultrafreezer a -80° C até as análises proteômicas.

Um total de três repetições biológicas do ensaio de cocultivo de *G. diazotrophicus* com plântulas de *A. thaliana* juntamente com seu controle foram separadas. Para a digestão de proteínas, 25 µL de surfactante RapiGest a 0,2% (v/v) (Waters, Milford, CT) foram adicionados a cada amostra. As misturas resultantes foram rapidamente submetidas a vórtice e incubadas em um misturador térmico por 15 min a 80° C, e 2,5 µL de DTT 100 mM (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA) foram adicionados. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas a 60° C por 30 min sob agitação a 350 rpm, 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM (GE Healthcare, Piscataway, NJ) foram adicionados, e as amostras foram agitadas em vórtex e incubadas no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, a digestão foi feita pela adição de 20 µL de solução de tripsina 50 ng/µL (Promega, WI, USA), preparada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram incubadas a 37° C *overnight*. Para a precipitação do Rapigest®, 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (v/v) foram adicionados e os tubos incubados por 30 min a 37° C, seguido de centrifugação por 30 min a 15.000 g, a 8° C. Depois, as digestões trípticas foram dessalinizadas usando colunas de spin Pierce C18 (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os peptídeos eluídos foram secos a vácuo e reconstituídos em 50 mM de Bicarbonato de amônio mais 0,1% ácido fórmico e ajustados para uma concentração final de 2 µg µL⁻¹. As amostras digeridas foram então transferidas para frascos tipo Total Recovery (Waters, CT, USA).

3.1.3.5 Análises LC-MS/MS

Um cromatógrafo líquido de nanoAcquity ultraperformance (UPLC) conectado a um espectrômetro de massa Synapt G2-Si HDMS (Waters) foi usado para análise de espectrometria de massa em tandem por cromatografia em fase eletro-líquida. A etapa cromatográfica foi feita pela injeção de 2 µL das amostras digeridas para a normalização antes da quantificação relativa de proteínas. Durante a separação, as amostras (2 µg de proteína digerida) foram carregadas na coluna nanoAcquity UPLC 5- µM C18 (180 µM × 20 mm) a 5 µL min⁻¹ por 3 min e depois na nanoAcquity HSS T3 1,8 µM inversão analítica coluna de fase (75 µM × 150 mm) a 400 nL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 45° C. Para a eluição dos peptídeos, foi utilizado um gradiente binário: a fase móvel A consistiu de água (Tedia) e 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich) e a fase móvel B consistiu de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e 0,1% de ácido fórmico. A eluição do gradiente foi feita da seguinte forma: 7% de B durante 3 min, subindo de 7 a 40% de B até 90,09 min; rampa de 40 a 85% B até 94,09 min; mantendo constante a 85% até 98,09 min; decrescendo para 7% B até 100,09 min; e mantendo constante em 7% B até o final da corrida em 108,09 min. O espectrômetro de

massas foi operado em modo de resolução (modo V) e positivo com mobilidade iônica; transferência de energia de colisão de 19 a 45 V, no modo de alta energia; cone de tensão e capilar de 30 V e 2800 V, respectivamente, e temperatura da fonte de 70°C. Em parâmetros TOF, o tempo de verificação foi definido para 0.5 s em modo contínuo, com um intervalo de massa de 50 a 2000 Da. A [GLu1] - fibrinopeptídeo B humana a 100 fmol.μL⁻¹ (Sigma- Aldrich) foi utilizada como calibrador externo e a aquisição de sua massa feita a cada 30s.

3.1.3.6 Análise dos dados proteômicos

O processamento espectral e a pesquisa de banco de dados foram feitos usando o ProteinLynx Global Server (PLGS; versão 3.0.2) (Waters) e o software ISOQuant workflow (Distler 2016; Distler 2014). O PLGS foi processado usando um limiar de baixa energia de 150 (contagens), um limiar de energia elevado de 50 e um limite de intensidade de 750. Além disso, a análise foi feita usando os seguintes parâmetros: duas clivagens perdidas, fragmento de íon mínimo igual a 3, fragmento de íon mínimo por proteína igual a 7, peptídeo mínimo por proteína igual a 2, modificações fixas de carbamidometil e modificações variáveis de oxidação e fosforilação. A taxa de descoberta falsa (FDR) para identificação de peptídeos e proteínas foi estabelecida para um máximo de 1%, com um comprimento peptídico mínimo de 6 aminoácidos. Os dados proteômicos foram processados no banco de dados Rio Gene para *G. diazotrophicus* (www.uniprot.org).

Após análises de dados no ISOQuant, apenas as proteínas presentes ou ausentes (para proteínas únicas) em todas as três réplicas biológicas foram consideradas para análise de abundância diferencial. Os dados foram analisados usando o teste t de Student (bicaudal). Proteínas com valores de p <0,05 foram consideradas induzidas se o log₂ da troca de vezes (FC) fosse maior que 1,5 e reprimidas se o log₂ da FC fosse menor que -1,5. A anotação funcional foi feita utilizando o software Blast2GO v3.0 PRO (Conesa *et al.*, 2005).

3.1.3.7 Análises Estatísticas

O ensaio foi feito com 9 repetições em cada condição. Os dados de taxa de crescimento de *G. diazotrophicus* PAL 5 sob os tratamentos controle e

cocultivo foram submetidos ao teste de média (Teste t) a 5% de probabilidade para mensurar a significância entre os tratamentos. As análises dos dados foram feitas pelo software GraphPad Prism v. 7.0 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3.1.4 RESULTADOS

3.1.4.1 Cocultivo com *A. thaliana* aumenta o crescimento de *G. diazotrophicus*

Com o objetivo de avaliar o efeito de exsudatos de plantas no crescimento de *G. diazotrophicus*, foram conduzidos ensaios de cocultivo de plantas-bactérias. *G. diazotrophicus* foi inoculado em meio MS contendo plântulas de *A. thaliana* previamente germinadas e cultivadas *in vitro* por 10 dias. A Figura 2 mostra que a presença de plântulas de *A. thaliana* aumenta o crescimento bacteriano em, aproximadamente, 45% após 24 horas de cocultivo. Estes dados sugerem que os metabólitos produzidos pelas plantas são benéficos para o desenvolvimento bacteriano. Análises de microscopia não comprovaram diferenças morfológicas em *G. diazotrophicus* em resposta ao cocultivo com *A. thaliana* (dados não mostrados).

3.1.4.2 Metabólitos benéficos de plantas são exsudados em resposta a *G. diazotrophicus*

Para verificar se a exsudação de metabólitos benéficos por plântulas de *A. thaliana* é constitutiva ou induzida pela presença de *G. diazotrophicus*, exsudatos do cocultivo de *G. diazotrophicus/A. thaliana* foram comparados com aqueles produzidos por plântulas não inoculadas (Figura 2B). Deste modo, os meios MS contendo exsudatos de ambas as condições foram filtrados (22 µM) e adicionados aos novos cultivos de *G. diazotrophicus*. Como controle, *G. diazotrophicus* foi cultivado na ausência de exsudatos. Como mostrado na Figura 2B, os exsudatos de plântulas não inoculadas não melhoraram o crescimento

bacteriano. Os exsudatos do cocultivo, por sua vez, resultaram em aumento do nível de multiplicação bacteriana, similar ao observado durante os ensaios de cocultivo. Esses resultados revelaram que a exsudação de metabólitos benéficos pelas plântulas de *A. thaliana* é induzida pela presença de *G. diazotrophicus*.

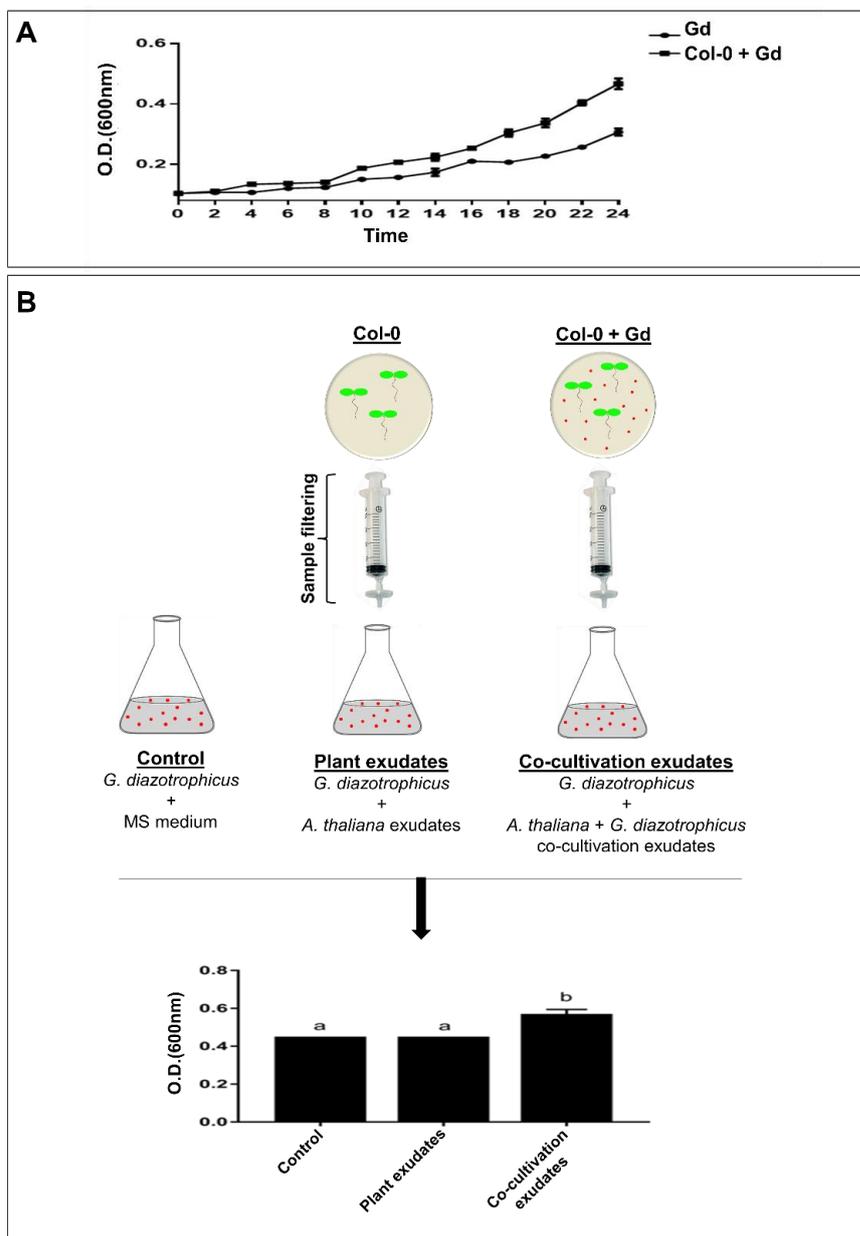


Figura 1. Cocultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 com plântulas de *Arabidopsis* (Col-0) por 24 horas. A Figura A representa uma curva de crescimento das bactérias em cocultivo ao longo de 24 horas. A Figura B mostra uma representação esquemática do ensaio de exsudatos, em que *G. diazotrophicus* é representado por manchas vermelhas. O gráfico da Figura B representa a taxa de crescimento bacteriano na presença de exsudatos de *A. thaliana* e exsudatos de cocultivo. A análise por (*) difere estatisticamente de seu controle pelo teste Tukey em 5% de probabilidade (n = 9).

3.1.4.3 Proteômica comparativa da resposta de *G. diazotrophicus* a exsudatos de plantas

As principais proteínas de *G. diazotrophicus* reguladas durante o cocultivo com mudas de *A. thaliana* foram investigadas por análise proteômica comparativa. Para este propósito, os extratos proteicos totais obtidos de bactérias expostas ao cocultivo foram comparados com bactérias cultivadas na ausência de plantas. Um total de 450 proteínas bacterianas foram identificadas (Tabela S1). Entre elas, 51 proteínas foram reguladas em resposta ao cocultivo, sendo 39 up reguladas e 12 down reguladas (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1. Lista de proteínas reguladas de *G. diazotrophicus* após 24 horas de cocultivo com plântulas de *A. thaliana*.

Accession	Description	Gene	Reported Peptides	Max Score	Fold Change
UP					
A9HSA5_GLU DA	Putative thioredoxin protein	GDI3107	4	3216,44	1,5048
RL23_GLU DA	50S ribosomal protein L23	rplW	6	8093,88	1,518
A9HIP1_GLU DA	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	frmA	4	1057,5	1,5249
A9H0G0_GLU DA	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	zwf	27	5629,12	1,5369
RS2_GLU DA	30S ribosomal protein S2	rpsB	16	11963,12	1,5648
A9HDU1_GLU DA	Oxidoreductase domain protein	GDI1200	14	6904,23	1,6272
A9HAZ8_GLU DA	Protein TolR	tolR	3	1454,51	1,6353
A9HJY0_GLU DA	Putative transcriptional Regulator, MarR family	GDI2027	4	6080,51	1,6652
A9H0W3_GLU DA	Adenylyl-sulfate kinase	cysC	21	4170,78	1,6762
A9HM86_GLU DA	Glycine--tRNA ligase beta subunit	glyrs	11	1189,1	1,6904
A9HS68_GLU DA	Signal recognition particle protein	ffh	12	2042,15	1,7458
A9HGY2_GLU DA	Putative Squalene--hopene cyclase	GDI1620	2	350,53	1,7656
A9HJS1_GLU DA	Uncharacterized protein	GDI1999	4	769,19	1,767
RS8_GLU DA	30S ribosomal protein S8	rpsH	6	4884,06	1,8092
SYH_GLU DA	Histidine--tRNA ligase	hisS	6	728,77	1,8198
A9H324_GLU DA	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	gnd	16	20323,17	1,8673
ASSY_GLU DA	Argininosuccinate synthase	argG	10	4334,52	1,8697
A9HRE6_GLU DA	Putative metallopeptidase	GDI2948	19	3042,59	1,9848
RL6_GLU DA	50S ribosomal protein L6	rplF	9	8968,96	2,0278
A9H397_GLU DA	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	gpml	11	4303,62	2,0312
A9HJB6_GLU DA	Dihydrolipoyl dehydrogenase	lpdA	8	1282,86	2,0935
A9HM48_GLU DA	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	gcvP	20	1964,67	2,1394

Tabela 1.Cont.

Accession	Description	Gene	Reported Peptides	Max Score	Fold Change
UP					
A9H7Z5_GLUDA	Glutamine synthetase	glnA	23	15678,34	2,1954
A9HII0_GLUDA	Orotate phosphoribosyltransferase	pyrE	5	3799,75	2,2882
A9H108_GLUDA	Glutamate--cysteine ligase	GDI3250	7	1745,48	2,3032
A9H459_GLUDA	30S ribosomal protein S1	rpsA	30	11955,4	2,3761
RL14_GLUDA	50S ribosomal protein L14	rplN	4	2991,02	2,378
A9H326_GLUDA	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	zwf	5	837,57	2,5286
A9H3M8_GLUDA	50S ribosomal protein L5	rplE	4	1646,31	2,5843
CLPX_GLUDA	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	clpX	11	3303,25	2,6424
ISPG_GLUDA	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (flavodoxin)	ispG	6	1571,93	3,0037
A9GZU8_GLUDA	Conservev protein	GDI0061	7	1962,62	3,0358
A9HEX0_GLUDA	Biotin carboxylase protein	accC	13	4423,06	3,5193
A9HS02_GLUDA	Elongation factor G	fusA	31	10183,21	3,9307
A9H932_GLUDA	TonB-dependent receptor	GDI0667	14	2074,37	4,1038
ILVC_GLUDA	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))	ilvC	5	2463,85	4,2107
A9H4G2_GLUDA	Energy-dependent translational throttle A protein EttA	GDI3490	5	506,79	4,2347
A9HEZ2_GLUDA	Aconitate hydratase	acnA	44	10076,64	8,488
A9HNX4_GLUDA	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	metE	38	11719,34	9,5606
DOWN					
A9HB99_GLUDA	Uncharacterized protein	GDI0843	4	10074,54	0,4441
A9HPF6_GLUDA	Porin	oprB	9	2838,53	0,4567
9H577_GLUDA	Putative periplasmic binding proteins	GDI0354	8	4390,16	0,4698

Tabela 1.Cont.

Accession	Description	Gene	Reported Peptides	Max Score	Fold Change
DOWN					
A9H073_GLUDA	NAD(P)-dependent alcohol dehydrogenase	GDI3142	4	1094,65	0,482
A9HRF1_GLUDA	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	sucD	5	2866,13	0,508
A9HPH9_GLUDA	10 kDa chaperonin	groES	5	4835,59	0,5362
A9HNP0_GLUDA	D-xylose ABC transporter, periplasmic substrate-binding	xylF	18	13607,54	0,5763
A9HK34_GLUDA	Cold-shock DNA-binding domain protein	GDI2048	5	34042,72	0,5936
A9HEI5_GLUDA	DUF3126 family protein	GDI1295	3	3273,24	0,6269
A9H9C0_GLUDA	Inosine-guanosine kinase	GDI0702	4	1497,69	0,6321
A9HL73_GLUDA	Alanine--tRNA ligase	alaS	13	1109,99	0,6447
A9HPE1_GLUDA	Sugar ABC transporter substrate-binding protein	GDI2634	13	9768,71	0,6581

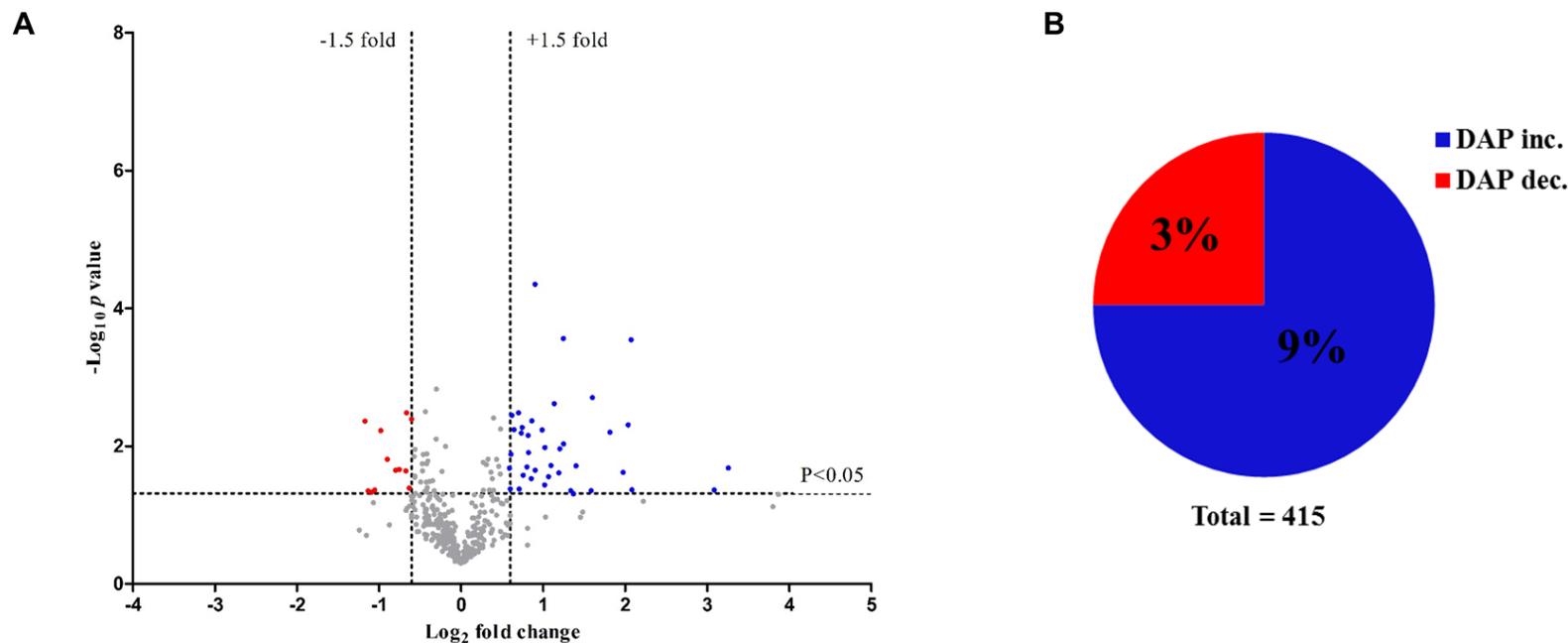


Figura 2. Análise das proteínas associadas em *Gluconacetobacter diazotrophicus* após cocultivo com plântulas de *Arabidopsis thaliana* por 24 h. Volcano plot(A) das proteínas identificadas e representação gráfica (B) das percentagens de proteínas acumuladas (DAP - Proteína Diferencialmente Acumulada). Os pontos representam as proteínas identificadas (\log_2 fold change) na análise proteômica, de acordo com o nível de significância estatística ($-\log_{10} p\text{-value}$). Os pontos vermelhos são apresentados como proteínas down reguladas, os pontos azuis como up regulada e os padrões de pontos cinzentos sem alteração no grau de acumulação, em relação ao controle. DAP inc. - Proteínas acumuladas diferencialmente. DAP dec. - Proteína reduzida acumulada de forma diferencial.

3.1.4.4 Classificação e análise das proteínas reguladas em *G. diazotrophicus* em cocultivo com *A. thaliana*

As proteínas reguladas em resposta ao cocultivo com plântulas de *A. thaliana* foram analisadas funcionalmente quanto à ontologia gênica, utilizando o software Blast2GO. A classificação utilizou três critérios: componentes celulares, processos biológicos e funções moleculares. A Figura 4 mostra, em critérios de componentes celulares, 4 subcategorias exclusivas de proteínas down reguladas e 6 subcategorias para as proteínas up reguladas. Quanto aos critérios dos processos biológicos, foram classificadas 7 subcategorias de proteínas down reguladas e 8 de proteínas up reguladas. Sobre as funções moleculares, foram observadas 7 subcategorias para as down reguladas e 9 para as proteínas up reguladas.

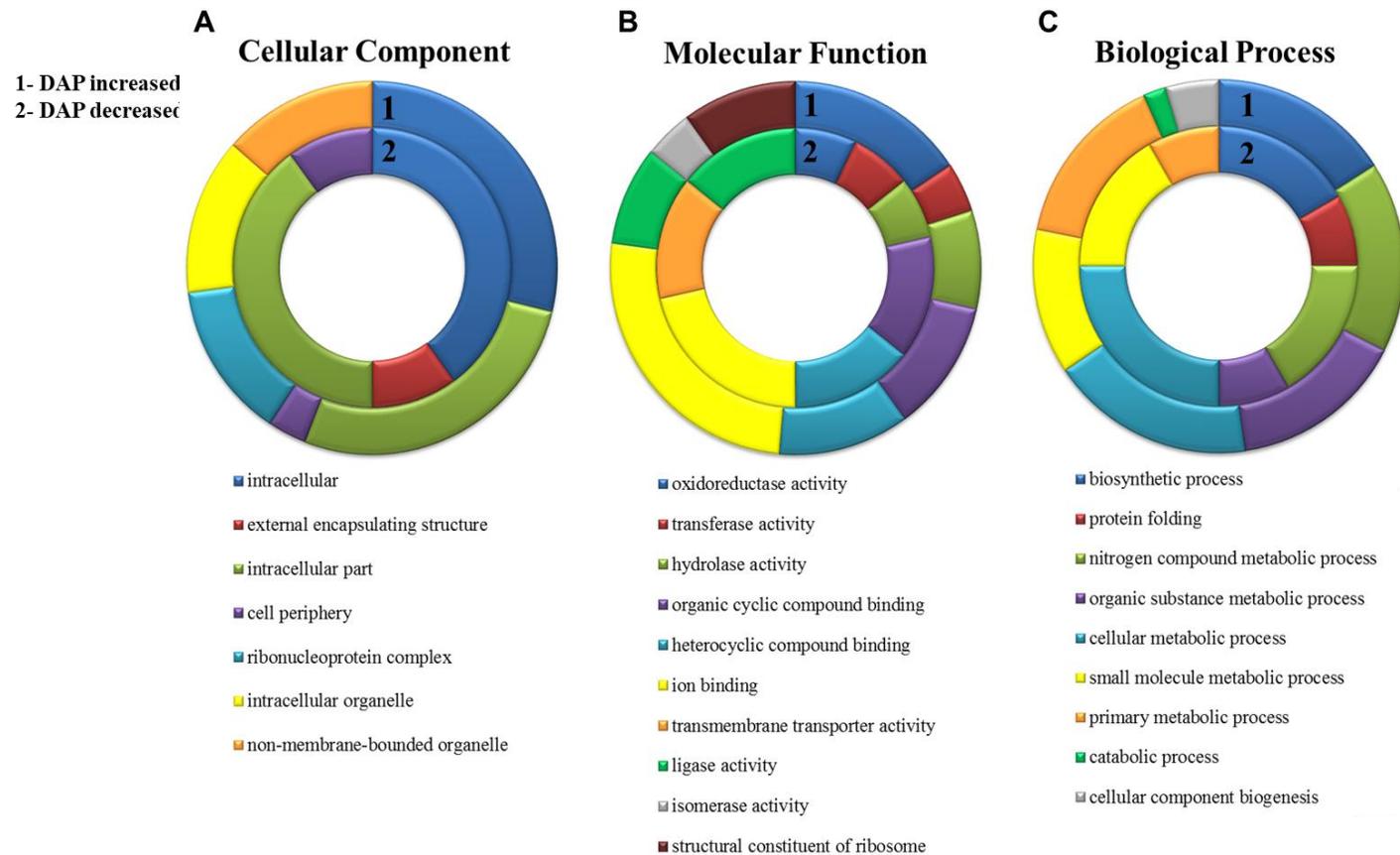


Figura 3. Classificação funcional de proteínas diferencialmente acumuladas em *Gluconacetobacter diazotrophicus* após cocultivo com plântulas de *Arabidopsis thaliana* por 24h. Proporção de proteínas envolvidas nos componentes celulares (A), funções moleculares (B) e processos biológicos (C) identificados em *Gluconacetobacter diazotrophicus* após o cocultivo com plântulas de *Arabidopsis thaliana* por 24h. DAP - Proteína Diferencialmente Acumulada.

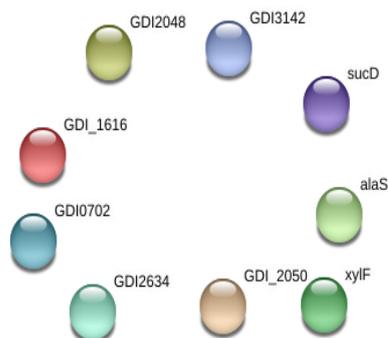


Figura 5. Análise da interação proteína-proteína, baseada em STRING, com confiança de 0,700. Interação proteína-proteína de proteínas reprimidas em tratamentos de cocultivo entre *G.diazotrophicus* e *A. thaliana*.

Proteínas up reguladas

Diversas proteínas potencialmente relevantes para a interação planta-bactéria foram up reguladas durante as primeiras 24 horas de cocultivo. Entre elas, as mais reguladas foram a 5-metiltetrahidretoiltriglutamato-homocisteína metiltransferase (*metE*), envolvida na síntese de metionina; a Aconitat hidratase (*acnA*), associada ao metabolismo dos ácidos tricarboxílicos; o Acelerador translacional dependente da energia A (*EttaA*), envolvido na regulação da atividade ribossômica; e Reductoisomerase de ácido cetol (*ilvC*), envolvida no metabolismo de aminoácidos.

Outras proteínas up reguladas foram *zwf* (Glucose-6-fosfato 1-desidrogenase) e *gnd* (6-fosfogluconato desidrogenase descarboxilante) da via pentose-fosfato. Estas proteínas são importantes para o metabolismo celular e homeostase celular, além de combater o estresse oxidativo (Figura 5). Outra proteína up regulada, *clpX* (subunidade de ligação de ATP ClpX de protease de Clp dependente de ATP), está envolvida na degradação de proteínas desdobradas e potencialmente relacionada à detecção de *quorum sensing* bacteriano (Veselova *et al.*, 2016; Zhu e Winans, 2001).

A proteína ABC-F *ettA* (*Energy-dependent translational throttle A protein*) também foi up regulada. Essa proteína atua regulando a síntese proteica de ribossomos bacterianos, sendo também importante para a proteção contra compostos antimicrobianos (Boël *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Daniel *et al.*, 2018; Sharkey *et al.*, 2016).

Proteínas down reguladas

Apenas 9 proteínas foram reguladas em resposta ao cocultivo. Entre eles, destacam-se aqueles relacionados à importação de açúcares, como xylF (A9HNP0_GLUDA) e proteína transportadora de substrato transportador D-xilose ABC (A9HPE1_GLUDA), ambos receptores periplasmáticos envolvidos na importação de açúcares.

3.1.5 DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou avaliar a resposta de *G. diazotrophicus* ao cocultivo com plântulas de *A. thaliana*, com ênfase nas principais proteínas bacterianas reguladas pela interação. Os resultados revelaram indução do crescimento bacteriano durante o cocultivo, sugerindo efeito benéfico de metabólitos exsudados pelas plantas. A produção de tais exsudatos vegetais é induzida apenas na presença das bactérias, revelando um processo sincronizado. Análises proteômicas comparativas demonstraram a regulação de várias vias proteicas da bactéria, principalmente relacionadas ao metabolismo do açúcar (pentoses) e à síntese proteica. Entre as proteínas reguladas, merecem atenção especial as proteínas *zwf*, *ABC-F-ettA*, *clpX*, *metE*, *acnA* e *ilvC*.

O cocultivo com plântulas de *A. thaliana* resultou em aumento significativo no crescimento de *G. diazotrophicus* (Figura 2). Esse achado é corroborado por estudos conduzidos com essa bactéria em cocultivo com plantas de cana-de-açúcar, em que também tem sido testada a indução de multiplicação bacteriana (Santos et al., 2010; Lery et al., 2011). Entre as substâncias exsudadas pelas raízes das plantas, estão açúcares, aminoácidos, mucilagens, flavonoides, ácidos orgânicos e compostos voláteis capazes de atrair bactérias e favorecer sua multiplicação (Sasse et al., 2018). Um papel relevante tem sido atribuído aos açúcares exsudados, que serviriam como fonte de energia para microrganismos (Sasse et al., 2018; Badri & Vivanco, 2009; Dennis et al., 2010). No entanto, o presente trabalho utilizou um meio de cultura rico em açúcar (0,5% de sacarose). Mesmo assim, a presença de exsudatos de plântulas de *A. thaliana* modulou positivamente o crescimento de *G. diazotrophicus*, sugerindo a ação de outros

metabólitos benéficos nesse processo. Jacoby *et al.* (2018) mostraram que as raízes de *A. thaliana* secretam um grande número de metabólitos secundários, que são usados pelas bactérias. Os aminoácidos valina, triptofano, treonina e glutamina, além de alguns derivados de pirimidina e purina, incluindo adenosina, citidina, guanina e uridina, são utilizados por bactérias associadas à planta quando em contato com exsudatos radiculares (Jacoby *et al.*, 2018).

A análise do crescimento de *G. diazotrophicus* na presença de meio filtrado dos exsudatos de planta e dos exsudatos do cocultivo planta-bactéria mostrou que a produção de metabólitos benéficos às plantas foi induzida somente na presença de bactérias. Estes dados sugerem a habilidade de as bactérias modularem a resposta da planta, induzindo a produção de compostos específicos. Badri e Vivanco (2009) mostraram que a composição dos exsudatos radiculares muda de acordo com a microbiota ao redor da planta. As raízes desempenham papéis importantes na interação da planta com os componentes da rizosfera. Essas funções variam de substâncias exsudadas que ajudam na defesa, como fitoalexinas (Flores *et al.*, 1999), a outras com metabólitos benéficos, como ácidos orgânicos e flavonoides (Walker *et al.*, 2003).

Nossas análises proteômicas revelaram várias mudanças no perfil proteico de *G. diazotrophicus* em resposta ao cocultivo, com 39 proteínas up reguladas e 12 down reguladas. Entre as proteínas mais induzidas, destaca-se a 5-metiltetra-hidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferase (metE), responsável pela conversão da homocisteína em metionina (Winzer, 2002). Essa proteína também pode estar envolvida no processo de detecção de *quorum sensing*, influenciando diretamente a produção da molécula AI-2, envolvida no processo de sinalização célula-célula (Winzer *et al.*, 2002). Outra proteína up regulada foi a Aconitate hidratase (acnA), presente no metabolismo dos ácidos tricarbóxicos, protegendo a célula bacteriana das espécies reativas de oxigênio (Doi e Takaya, 2015). Esta proteína pode ser importante para o auxílio do processo de interação planta-bactéria. Uma das proteínas mais induzidas, a reductoisomerase de ácido cetol (ilvC), desempenha papel importante na via da biossíntese de aminoácidos (Li *et al.*, 2017). Essas três proteínas também estão entre as mais abundantes no estudo proteômico feito por Lery *et al.* (2011), tendo as proteínas de *G. diazotrophicus* sido analisadas após o cocultivo com plantas de cana-de-açúcar. Nossos resultados destacam as proteínas metE, ilvC e acnA

como potencialmente relevantes para a associação de *G. diazotrophicus* com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Aproximadamente 23% das proteínas up reguladas são proteínas ribossômicas, indicando efeito do cocultivo na síntese de proteínas bacterianas. Entre estas proteínas up reguladas, a *rpsA* interage com a sequência líder do mRNA durante a formação do complexo de iniciação da tradução, atuando diretamente na regulação do processo de tradução (Komarova *et al.*, 2002). A proteína *rpsA* também é positivamente regulada na bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* quando exposta a extratos de cana-de-açúcar (Cordeiro *et al.*, 2013). Outra proteína ligada ao ribossomo, a proteína ribossômica 50S L23 (*rplW*), também foi regulada positivamente. Esta proteína é essencial para a multiplicação bacteriana e está associada ao *Trigger Factor* do ribossomo (Kramer *et al.*, 2002; Tischendorf *et al.*, 1974). Nossos dados sugerem, portanto, a ativação da síntese proteica como resposta chave ao cocultivo, favorecendo o aumento do crescimento bacteriano observado.

Uma proteína relacionada ao metabolismo de aminoácidos, a glutamina sintetase, foi regulada em nossas análises proteômicas. Esta proteína é essencial para a assimilação da amônia (Brown *et al.*, 1994). O consumo de metabólitos secundários correspondentes ao metabolismo central de aminoácidos, incluindo a glutamina, foi comprovado por análises exometabolômicas de cepas bacterianas cultivadas com extrato de raiz de *A. thaliana* (Jacoby *et al.*, 2018).

Proteínas da via pentose-fosfato também foram up reguladas em nossas análises. Essa via é essencial para o metabolismo celular, incluindo a manutenção da homeostase do carbono e o fornecimento de precursores para a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos (Pickl e Schönheit, 2015; Stincone *et al.*, 2015). Em nossos dados, 4 membros desta via foram up reguladas: *zwf* (Glucose-6-fosfato-desidrogenase 1), *gnd* (6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilação), *gpml* (2,3-bisfosfoglicerato-fosfoglicerato mutase independente) e *GDI_3177* (Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase). Entre estas proteínas, as proteínas *zwf* e *gnd* atuam na fase oxidativa da via das pentoses-fosfato, resultando na produção de NADPH. Na maioria dos microrganismos, o NADPH é produzido por essa via como cofator de duas enzimas: glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH), codificadas pelos genes *zwf* e *gnd*, respectivamente (Lim *et al.*, 2002). A regulação positiva

dessa via pode favorecer o melhor aproveitamento dos metabólitos exsudados pelas plântulas, mesmo na presença de sacarose.

Entre as proteínas up reguladas envolvidas na regulação da resposta de crescimento ao cocultivo, merecem atenção *clpX* e ABC-F-Etta. A proteína *clpX* atua no desdobramento e degradação de outras proteínas. O papel regulador da *clpX* foi comprovado pela sua ação na degradação da AHL (N-acil-homoserina lactona). A AHL é usada para reconhecimento de plantas no processo de infecção e pode estar potencialmente envolvida no processo de *Quorum sensing* (Komarova *et al.*, 2002; Sasse *et al.*, 2018; Veselova *et al.*, 2016). As proteínas responsáveis pela detecção do *Quorum sensing* podem ser reguladas na presença de hospedeiros (Pérez-Montañó *et al.*, 2013; Steindler *et al.*, 2009). Em razão de a *clpX* poder atuar na regulação da multiplicação celular, sua indução durante nossos ensaios sugere um papel na resposta de *G. diazotrophicus* a exsudatos de metabólitos benéficos de plântulas de *A. thaliana*.

A proteína ABC-F Etta atua na regulação da síntese proteica, modulando a atividade ribossômica bacteriana durante o processo de tradução. Nos últimos anos, foi relatada a relevância do ABC-F Etta nos mecanismos de resistência bacteriana ao antibiótico (Boël *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Daniel *et al.*, 2018). A regulação positiva desta proteína durante o cocultivo de *G. diazotrophicus* e *A. thaliana* permite especular sobre seu papel na percepção de metabólitos de plantas e subsequente ativação da síntese proteica.

Em conjunto, nossos dados comprovam a comunicação efetiva entre *G. diazotrophicus* e *A. thaliana* durante o cocultivo (Figura 6). *G. diazotrophicus* induz plântulas de plantas a exsudar metabólitos benéficos, que aumentam o crescimento bacteriano. Durante essa interação, a ativação de várias vias proteicas bacterianas revelou novas respostas específicas. Ao mesmo tempo, reforçou o papel de outras proteínas previamente relatadas como envolvidas na resposta à interação com a monocotiledônea, revelando a existência de mecanismos conservados durante a interação de *G. diazotrophicus* com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Nossos resultados abrem novas perspectivas para o entendimento da interação entre plantas e bactérias benéficas.

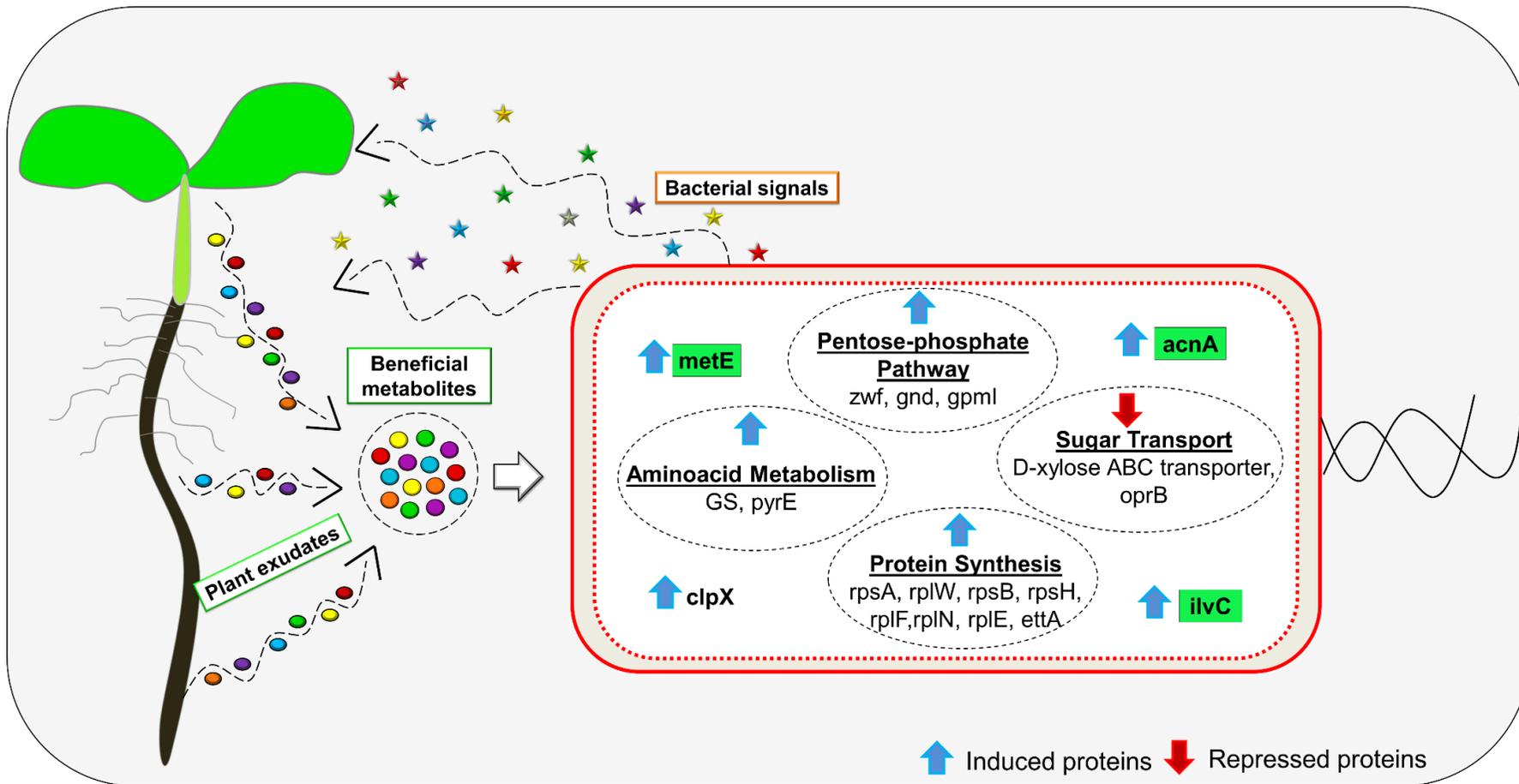


Figura 6. Esquema modelo para proteínas expressas em *G. diazotrophicus* em cocultivo com plântulas de *A. thaliana*.

3.1.6 CONCLUSÕES

✓ O cocultivo entre *G. diazotrophicus* e plantas de *A. thaliana* induz aumento da multiplicação bacteriana.

✓ *G. diazotrophicus* induz produção de exsudatos por *A. thaliana*, quando em cocultivo, sendo esses exsudatos benéficos ao crescimento bacteriano.

✓ O cocultivo entre *G. diazotrophicus* e *A. thaliana* promove alterações no perfil proteômico da bactéria, resultando na indução de diversas proteínas de diferentes vias, com ênfase ao metabolismo de açúcares (pentoses) e síntese proteica. A indução das proteínas metE, ilvC e acnA de *G. diazotrophicus*, previamente identificadas como reguladas na presença de exsudatos de cana-de-açúcar, revela seu potencial papel na resposta bacteriana a exsudatos, tanto de plantas monocotiledôneas quanto dicotiledôneas.

✓ A indução das proteínas clpX e ABC-F Etta sugere o papel destas proteínas na regulação do crescimento bacteriano em resposta aos exsudatos vegetais, modulando mecanismos de “*quorum sensing*” e os processos de síntese proteica.

3.1.7 PERSPECTIVAS

✓ O efeito dos exsudatos vegetais sobre o crescimento bacteriano permite vislumbrar estratégias para a futura caracterização do perfil metabólico dos exsudatos vegetais quando em cocultivo com *G. diazotrophicus*, visando a identificar os metabólitos responsáveis pelo crescimento da bactéria.

✓ A obtenção de mutantes bacterianos para as principais proteínas reguladas durante a interação permitirá caracterizar as principais proteínas bacterianas envolvidas na resposta a exsudatos vegetais.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA ABC-F ETTA DE *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS* PAL5 NA RESPOSTA A ANTIBIÓTICOS, ESTRESSES AMBIENTAIS E NA INTERAÇÃO INICIAL BACTÉRIA-PLANTA

3.2.1 INTRODUÇÃO

Espécies bacterianas são capazes de ocupar enorme número de nichos, adaptando-se a uma vasta gama de condições ambientais (Stubbendieck *et al.*, 2016). Para tanto, ao longo do processo evolutivo, elas desenvolveram mecanismos de adaptação e resposta a variáveis condições físico-químicas (Persat *et al.*, 2015). Esses seres vivos são capazes de detectar e responder a estímulos químicos, bioquímicos, físicos, térmicos, mecânicos, assim como a campos elétricos e magnéticos (Persat *et al.*, 2015). Adicionalmente, muitas bactérias são capazes de colonizar hospedeiros animais ou vegetais, influenciando seu desenvolvimento. Enquanto a maioria das espécies bacterianas que colonizam tecidos animais ou vegetais não tenha efeitos conhecidos para seus hospedeiros, algumas espécies são patogênicas, e outras podem ser benéficas (Bäumler e Sperandio, 2016; Glick, 2012).

Plantas e animais produzem substâncias capazes de influenciar a multiplicação de microrganismos, através de sofisticados mecanismos de percepção e resposta. Entre tais compostos, está uma enorme variedade de

substâncias antibacterianas (Balouiri *et al.*, 2016). As plantas, por exemplo, sintetizam substâncias com alto poder antimicrobiano, em sua maioria metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos, quinonas, flavonoides e lecitinas (Cowan, 1999; Toda *et al.*, 1989; Treutter, 2006). Algumas espécies de animais também são capazes de produzir substâncias antimicrobianas como uma grande gama de peptídeos, proteínas e outras substâncias (Harman *et al.*, 2017; Jakowska e Nigrelli, 1960; Lehrer e Ganz, 2002; Maróti *et al.*, 2011).

Apesar dos mecanismos de defesa presentes nos hospedeiros, algumas espécies bacterianas são capazes de vencer tais barreiras, colonizando o interior dos tecidos e estabelecendo relações patogênicas. No caso de animais e humanos, a utilização de medicamentos antibióticos representa a ação mais efetiva no combate a doenças causadas por bactérias. Existem vários tipos de antibióticos, com diversos mecanismos de ação sobre as bactérias, com ênfase nos β -lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, entre outros (Kapoor *et al.*, 2017). Tais mecanismos de ação incluem a atuação sobre a síntese de polissacarídeos da parede celular bacteriana, inibição de síntese de DNA e inibição da síntese de proteínas (Kapoor *et al.*, 2017; Vannuffel e Cocito, 1996; Yoneyama e Katsumata, 2006)

As bactérias, por sua vez, desenvolveram mecanismos de resistência a diversos antibióticos que podem envolver a produção de substâncias que se ligam aos antibióticos anulando sua eficácia, a formação de biofilme, ativação de bombas de efluxo desses antibióticos e até mesmo mecanismos de proteção da maquinaria de tradução (Alcalde-Rico *et al.*, 2016; Kapoor *et al.*, 2017; Levin-Reisman *et al.*, 2017b; Lin *et al.*, 2015; Mah e O'Toole, 2001).

Entre os mecanismos de proteção da tradução, recentemente tem sido demonstrada a importância das proteínas ABC-F para a resistência a antibióticos, atuando nos ribossomos (Ero *et al.*, 2019; Sharkey e O'Neill, 2018; Sharkey *et al.*, 2016). Proteínas ABC-F agem de forma homóloga a proteínas de proteção ao ribossomo TetM/TetO, conferindo resistência a antibióticos como tetraciclina (Lenart *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2014).

Apesar dos avanços nos estudos sobre ABC-F *ettA* no âmbito da resistência a antibióticos em bactérias patogênicas humanas (Arenz *et al.*, 2015; Daniel *et al.*, 2018; Lenart *et al.*, 2015; Sharkey *et al.*, 2016), nada é conhecido acerca do papel desta proteína em bactérias que colonizam plantas e sua

relevância para a resposta bacteriana aos metabólitos exsudados pelos tecidos vegetais. Entre as bactérias benéficas que formam associações com plantas, destaca-se *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante e Dobereiner, 1988; Rangel de Souza, 2016; Reis, 1994), bactéria endofítica capaz de promover crescimento vegetal, através da fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de nutrientes, além de apresentar resistências a diversos tipos de estresse abióticos como metais pesados, sacarose e sais (Cavalcante e Dobereiner, 1988; Intorne *et al.*, 2012; Tejera *et al.*, 2003). Vários estudos de mutagêneses insercionais têm sido conduzidos com genes específicos de *G. diazotrophicus* (Intorne *et al.*, 2009; Intorne *et al.*, 2012; Meneses *et al.*, 2011).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o papel da proteína ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* na resistência a antibióticos, na resposta a estresses ambientais e na percepção de exsudatos vegetais durante a interação bactéria-planta.

3.2.2 REVISÃO

3.2.2.1 Proteínas ABC-F em bactérias

As proteínas de ligação de ATP (ABC) são uma numerosa superfamília encontrada em todos os domínios da vida, com uma variedade considerável delas dedicadas ao transporte dependente de energia de moléculas através de membranas biológicas (Davidson *et al.*, 2008; Sharkey e O'Neill, 2018). Os sistemas ABC acoplam a energia da hidrólise do ATP a uma variedade enorme de fenômenos biológicos essenciais, não estando apenas ligados ao transporte transmembrana, função pela qual as bactérias são mais conhecidas, mas também estão envolvidos em vários processos não relacionados ao transporte, como o alongamento da tradução (Chakraborty, 2001) e reparo de DNA (Goosen e Moolenaar, 2001).

Os sistemas ABC merecem atenção por estarem envolvidos em doenças hereditárias humanas graves (Dean *et al.*, 2001). Essas proteínas foram

descobertas e caracterizados com detalhes em diversos procariontes já na década de 1970 (Ames e Lever, 1970; Kellermann and Szmelcan, 1974; Ferenci *et al.*, 1977).

Esta superfamília pode ser subdividida em oito subfamílias, de acordo com um esquema de classificação originalmente derivado da análise filogenética de proteínas ABC humanas (Davidson *et al.*, 2008; Sharkey e O'Neill, 2018).

Entre as oito subfamílias de proteínas ABC, as proteínas ABC-F compreendem numa subfamília com somente um único polipetídeo contendo dois domínios de proteína de ligação de ATP (*ATP-binding cassette*). Ao contrário das proteínas ABC transportadoras, as ABC-F não estão fundidas nos domínios transmembrana nem geneticamente associadas a domínios de transmembrana (Kerr, 2004). Essa proteína tem notável conservação na sequência primária ou nas subunidades constitutivas (Holland e A. Blight, 1999).

As proteínas ABC-F são importantes mediadores da proteção bacteriana contra antibióticos, principalmente em bactérias gram-positivas, embora também relatada em espécies gram-negativas (Kadlec *et al.*, 2011). Essas proteínas exercem ação direta sobre o ribossomo (Boël *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014), sendo encontradas em diversas espécies de bactérias, sejam elas produtoras de antibióticos (estreptomicetos) ou bactérias patogênicas, em que se incluem estafilococos, estreptococos e enterococos (Kerr, 2004). Recentemente, o papel de ABC-F Etta vem sendo elucidado, revelando sua ação na modulação da subunidade 50S ribossomal, regulando a primeira ligação peptídica da tradução e o início do ciclo de alongação da cadeia polipeptídica (Boel *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014).

Os mecanismos pelos quais ABC-F atua na resistência de antibióticos ainda é objeto de grandes discussões, havendo duas hipóteses principais que têm mais apoio (Chesneau *et al.*, 2005; Kerr *et al.*, 2005; Kerr, 2004; Lenart *et al.*, 2015; Reynolds *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 1990). A primeira hipótese de efluxo define que as proteínas ABC-F se associam a domínios transmembranares ainda não identificados para formar um complexo de efluxo funcional, que é capaz de exportar os antibióticos para fora da célula (Chesneau *et al.*, 2005). A segunda hipótese diz respeito à proteção ribossomal, que sugere que essas proteínas atuam na redução do acesso ou afinidade dos sítios de ligação dos antibióticos na

subunidade 50S do ribossomo, protegendo, assim, diretamente o mecanismo traducional do ribossomo (Reynolds *et al.*, 2003).

Estudos mais aprofundados em torno das proteínas ABC-F podem não apenas elucidar seu mecanismo, mas também o desenvolvimento da compreensão do funcionamento na resistência a antibióticos em bactérias gram-positivas e gram-negativas.

3.2.2.2 Reposta bacteriana aos antibióticos

Antibióticos são substâncias produzidas por diversos organismos que impedem o desenvolvimento de outros microrganismos. Assim, começou-se a associar essas substâncias com o tratamento tanto para doenças em animais quanto em vegetais (Goodman e Gildman, 2006).

Para que um antibiótico seja eficaz, é sempre importante levar em consideração sua concentração, seu alvo e o tipo de infecção. Os antibióticos podem apresentar funções distintas, seja na inibição do crescimento ou na destruição da população bacteriana (Kapoor *et al.*, 2017; Wright, 2011). Uma ação bacterioestática atua impedindo o crescimento bacteriano, mantendo a população na fase estacionária, e a ação bactericida visa à destruição total de todas as células bacterianas, atuando sobre alguns dos processos vitais (Goodman e Gildman, 2006; Wright, 2011; Wright, 2003).

Ao longo dos anos, foram descobertos diversos tipos de antibióticos, que foram sendo agrupados em consonância com o mecanismo de ação sobre as células bacterianas. Neste cenário, são descritos três mecanismos básicos de ação dos antibióticos: inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese proteica nos ribossomos e alteração na síntese de ácidos nucleicos (Goodman e Gildman, 2006; Kapoor *et al.*, 2017).

3.2.2.2.1 Antibióticos com ação na parede celular

Sabe-se que as células bacterianas são cercadas por uma parede celular constituída de peptidoglicano, que são longos polímeros de açúcar que formam ligações cruzadas, sendo esta parede responsável por uma proteção maior à célula (Kahne *et al.*, 2005). A porção D-alanil-alanina dessa cadeia peptídica é composta por resíduos de glicina na presença de proteínas de ligação à penicilina

(Kapoor *et al.*, 2017). Os antibióticos do tipo β -lactâmicos e os glicopeptídeos inibem a síntese da parede celular, levando a célula bacteriana à morte. Os principais alvos desse tipo de antibiótico são as proteínas de ligação à penicilina. Essas proteínas interagem diretamente com os anéis de β -lactama que imitam a D-alanil-alanina, inibindo, assim, a síntese de novos peptidoglicanos, levando ao rompimento da camada de peptidoglicano da célula e, conseqüentemente, à lise celular (Džidić *et al.*, 2008; Tenover, 2006).

São exemplos de antibióticos com ação na síntese de peptidoglicano os antibióticos β -lactâmicos, que são, por sua vez, a penicilina e seus derivados, como a ampicilina, amoxicilina, flucloxacilina, penicilinas antipseudomonas, entre outras. Todos esses antibióticos têm ação na síntese de peptidoglicano da parede celular bacteriana com ação em bactérias gram-positivas e gram-negativas (Goodman e Gildman, 2006).

3.2.2.2 Antibióticos com ação na síntese de proteínas

Os ribossomos bacterianos são organelas constituídas de duas subunidades, 30S e 50S, responsáveis pelo processo de tradução das moléculas de RNAm em proteínas (Weisblum e Davies, 1968). Os antibióticos que atuam sobre essas organelas, seja a porção 30S ou 50S do ribossomo, inibem a biossíntese de proteínas, visando a uma das unidades formadoras do ribossomo bacteriano (Kapoor *et al.*, 2017; Vannuffel e Cocito, 1996).

Os antibióticos que atuam na porção 30S do ribossomo são conhecidos por aminoglicosídeos, sendo utilizados contra bactérias gram-negativas aeróbicas. São moléculas carregadas positivamente que se ligam à membrana externa e levam à formação de grandes poros, permitindo, assim, a entrada de antibióticos para dentro da célula. Para a entrada desse antibiótico, é necessário transporte ativo bacteriano dependente de energia, além de requerer oxigênio e força motriz ativa por próton, por esse motivo, esse tipo de antibiótico é muito mais eficaz em bactérias aeróbicas do que em anaeróbicas (Goodman e Gildman, 2006). Os aminoglicosídeos funcionam melhor quando combinados com antibióticos β -lactâmicos, pois permitem a melhor entrada na célula. Os aminoglicosídeos interagem com a porção RNA-16S da subunidade 30S por pontes de hidrogênio. Um exemplo desses antibióticos são as tetraciclina, que atuam na sequência conservada da porção RNA-16S da subunidade 30S,

evitando a ligação do RNAt ao sítio A do ribossomo (Yoneyama e Katsumata, 2006). Outros mecanismos de ação também podem ocorrer, caso da estreptomicina, que inibe a ligação da aminoacil-RNAt aos ribossomos 70S, mais precisamente na subunidade 30S isolada (Weisblum e Davies, 1968).

Na subunidade 50S, a atuação geral desse tipo de antibióticos ocorre de outra forma. Eles interagem com as sequências conservadas da cavidade da peptidiltransferase do RNA-23S da subunidade 50S, inibindo, assim, a síntese de proteínas, impedindo a ligação do t-RNA ao sítio A do ribossomo (Vannuffel e Cocito, 1996; Yoneyama e Katsumata, 2006).

3.2.2.2.3 Antibióticos inibidores da replicação do DNA

Uma outra classe de antibióticos compreende aqueles que atuam na inibição da replicação do DNA, as fluoroquinolonas, que inibem a ação da girase bacteriana. Esses antibióticos se ligam à girase e interferem na função de corte e resselamento da fita. Em bactérias gram-positivas, o principal alvo de ação são as topoisomerasas IV e, em gram-negativas, são as DNA girases (Yoneyama e Katsumata, 2006; Kapoor et al. 2017).

Outra classe desse tipo de antibióticos compreende as rifampicinas, uma classe de antibióticos que inibe a RNA-polimerase. As cadeias peptídicas da RNA-polimerase se ligam a um fator que confere especificidade para o reconhecimento ao sítio do promotor, onde se inicia a transcrição do DNA. A rifampicina atua ligando-se às cadeias peptídicas de forma não covalente e interfere especificamente no início do processo de transcrição (Goodman & Gilman's, 2008).

3.2.2.3 Exsudatos vegetais e sua influência na microbiota do solo

As raízes das plantas têm grande capacidade de alterar bioquimicamente o solo à sua volta através de substâncias secretadas, com isso, influenciando toda a microbiota do solo à sua volta (Knudson, 1920; Oleghe *et al.*, 2017; Sasse *et al.*, 2018).

Os exsudatos produzidos pelas raízes podem ser considerados um lubrificante que auxilia as raízes a penetrar no solo, funcionando como fator de diminuição da resistência de contato da raiz com o próprio solo (Oleghe *et al.*,

2017). Além disso, essa rizodeposição inclui a perda de células radiculares e a exsudação de diversas substâncias, como, por exemplo, açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos (Bais *et al.*, 2006). A exsudação desses compostos pode aumentar o gasto de 30 a 40% a mais de todo o carbono liberado no solo, fixado pelas plantas jovens. (Badri e Vivanco, 2009).

Desde o começo de seu desenvolvimento, as raízes sempre estão em contato com o solo, e a primeira parte do corpo radicular a entrar em contato com o solo é a ponta da raiz. Elas estão diretamente associadas a um maior número de bactérias quando em comparação com outros tecidos radiculares, provavelmente selecionando os microrganismos de maneira ativa (DeAngelis *et al.*, 2005). Zonas de raízes maduras apresentam uma comunidade microbiana distinta das pontas das raízes (Massalha *et al.*, 2017). Sua comunidade inclui decompositores (DeAngelis *et al.*, 2005), que poderiam estar envolvidos na degradação de células mortas que se desprendem de antigas partes da raiz (Jones *et al.*, 2009).

Os exsudatos têm o papel de mediação entre as interações positivas e negativas na rizosfera. O microambiente rico em nutrientes, criado pelos exsudatos das raízes, leva a uma forte competição entre os microrganismos do solo ali existentes. Os microrganismos podem usar estes compostos como substrato, resultando em um aumento da biomassa microbiana e da atividade ao redor das raízes, o chamado efeito rizosfera (Doornbos *et al.*, 2012), caso das micorrizas *Rhizobium* sp. e de outras rizobactérias promotoras de crescimento. Outro caso interessante se refere ao aumento da motilidade necessária de *Pseudomonas fluorescens* para colonizar raízes de tomate, aumento esse estimulado por quimiotaxia, influenciado diretamente por exsudatos radiculares (de Weert *et al.*, 2002).

Este tipo de interação é de particular importância quando se considera a multiplicação do microbioma da rizosfera por patógenos radiculares (Massalha *et al.*, 2017). Os exsudatos radiculares também podem ter qualidades defensivas diretas. Quando as defesas das plantas são ativadas por patógenos, elas podem resultar na secreção da raiz de compostos antimicrobianos que podem proteger as plantas contra infecções (Doornbos *et al.*, 2012). Alguns estudos já têm mostrado que as plantas são capazes de secretar ácido rosmarínico, um composto derivado do ácido cafeico com atividade antimicrobiana contra

múltiplos microrganismos do solo (Bais *et al.*, 2002). Em outro estudo, compostos antimicrobianos secretados por raízes de *Arabidopsis thaliana* conferem resistência a diversas estirpes de *Pseudomonas syringae*. Além disso, esses exsudatos com atividades antimicrobianas são capazes de regular a população de microrganismos da rizosfera (Bais *et al.*, 2005; Glandorf *et al.*, 1997).

A disponibilidade e a composição dos exsudatos radiculares, bem como a dieta nutricional dos microrganismos na rizosfera, são altamente dinâmicas à planta. A secreção de exsudatos pelas raízes é uma forma importante de as plantas responderem e alterarem seu ambiente a seu favor. Pesquisas tem proporcionado um melhor entendimento de como esses exsudatos radiculares medeiam a comunicação entre plantas e outros organismos no solo.

3.2.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1 Microrganismo e condições de cultura

A linhagem selvagem de *G. diazotrophicus* PA15 foi cultivada em meio DYGS, composto de glicose (g.L⁻¹) 2,0, 1,5 peptona bacteriológica, 2,0 extrato de levedura, 0,5 K₂HPO₄, 0,5 MgSO₄.7H₂O, 3,75 ácido glutâmico, com o pH do meio ajustado para 6,0 (Dobereiner *et al.*, 1999). A cultura das células bacterianas estava sob constante agitação e temperatura (250 rpm/min⁻¹ e 30° C) em shaker (Incubadora C25, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA) até atingir densidade óptica no comprimento de onda de 600nm (D.O.₆₀₀) igual a 1,0 (~ 10⁸ células mL⁻¹).

O mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ de *G. diazotrophicus* PAL5 foi obtido da coleção de mutantes de inserção de *G. diazotrophicus* PAL5, do laboratório de Biotecnologia da UENF (Intorne *et al.*, 2009). Tal biblioteca foi gerada por mutagênese insercional, utilizando o kit EZ-Tn5 <R6Kyor/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre, Madison, WI, USA). Ao fazer um *screening* desta biblioteca na presença de diferentes estressores, foi selecionado um conjunto de 267 mutantes que tiveram crescimento afetado por pelo menos um desses

agentes, compondo uma subcoleção de mutantes sensíveis a estresses (de Oliveira, 2012; Intorne, 2012).

3.2.3.2 Organização genômica e análises *in silico* do mutante GDI_3490 em *G. diazotrophicus* PAL 5

A identificação do sítio de inserção do transposon Tn5 foi previamente determinada por Oliveira (2012), e a sequência do gene, compreendendo o gene interrompido RefSeq NC_010125, foi obtida na base de dados do NCBI.

As sequências de aminoácidos de proteínas homólogas foram obtidas no banco de dados UniprotKB (<http://www.uniprot.org>) e JGI somente para *G. diazotrophicus* pelo alinhamento feito pela ferramenta BLAST, segundo sequência de aminoácidos da proteína correspondente ao gene GDI_3490, que codifica proteína ABC-F *ettA* (WP_041249545.1) com os parâmetros padrões da ferramenta (E-Threshold 10, Matrix automático, Sem filtro e Gapped permitido). Foram selecionadas proteínas homólogas à proteína do gene GDI_3490 de *G. diazotrophicus*: *Escherichia coli* (P0A9W3), *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 (D8IY51), *Mycobacterium leprae* (A0A197SB78), *Mycobacterium tuberculosis* (P9WQK3), *Staphylococcus aureus* (A0A2X2KYM9), *Streptococcus pneumoniae* (A0A387KLR9), *Pseudomonas syringae* (A0A2V0QQB7), *Pseudomonas aeruginosa* (A0A069PXD9) e *Rhizobium leguminosarum* (A0A2Z4YCC5),

Os alinhamentos das sequências selecionadas de aminoácidos foram feitos pelo algoritmo EMBOOLS Needle (Li *et al.*, 2015). A análise de domínios transmembrana (TMH) das proteínas selecionadas foi feita pela ferramenta TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) (Krogh *et al.*, 2001).

3.2.3.3 Análises filogenéticas das proteínas ABC-F *ettA*

As sequências que codificam a proteína ABC-F *ettA* para *G. diazotrophicus* e de mais 9 espécies (*Escherichia coli*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhizobium leguminosarum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) foram obtidas da base de dados UniProt (UniProt, 2019). Os alinhamentos destas proteínas foram feitos utilizando o programa ClustalX2 (parâmetro *default*) (Larkin *et al.*, 2007).

Os resultados dos alinhamentos foram submetidos ao programa MEGA, versão 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), para gerar as árvores filogenéticas utilizando o método *Neighbor-joining* (NJ). Os parâmetros utilizados foram os modelos de substituição Dayhoff, para os conjuntos proteicos contendo os domínios ABC-F etA, e os de Poisson (Zuckerandl e Pauling, 1965). Os modelos de substituição aplicados foram definidos tendo como base os melhores valores de *bootstrap* obtidos para cada árvore. Os resultados foram visualizados usando o programa MEGA, versão 7.0 (Kumar *et al.*, 2016).

3.2.3.4 Ensaio para análise de resistência a antibióticos em *G. diazotrophicus* e mutante ΔGDI_{3490}

O inóculo foi cultivado em frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de cultivo em meio DYGS (composição em g.L⁻¹: 2,0 glicose; 1,5 peptona bacteriológica; 2,0 extrato de levedura; 0,5 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄.7H₂O; 1,5 ácido glutâmico) com pH ajustado para 6,0 (Dobereiner *et al.*, 1999), a partir de 5,0 mL (10% v/v) de pré-inóculo de cada estirpe bacteriana. As curvas de inibição do crescimento de *G. diazotrophicus* selvagem e do mutante ΔGDI_{3490} foram feitas em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 5 mL de meio DYGS cada, onde foram acrescidas as concentrações de antibióticos. Foram utilizadas três concentrações para três tipos de antibióticos: Ampicilina (175 µg/mL, 200 µg/mL e 250 µg/mL), Estreptomicina (25 µg/mL, 50 µg/mL e 75 µg/mL) e Tetraciclina (5 µg/mL, 15 µg/mL e 30 µg/mL). Após avaliar os resultados para a bactéria selvagem e mutante, o experimento foi repetido utilizando apenas a concentração mínima inibitória definida nas mesmas condições de crescimento descritas acima. O ensaio foi repetido ao menos três vezes.

3.2.3.5 Análise de morte celular

O ensaio para verificar a viabilidade de população bacteriana exposta aos estresses por antibióticos foi feito pelo kit live/dead® bacLight™ (Molecular Probes, 2004). O ensaio foi conduzido conforme o item anterior. Em seguida, foram centrifugados 2mL do cultivo bacteriano a 10,000xg por 4 min e ressuspensos em 2mL de solução salina (0,85% de NaCl) por 2 vezes. Para a coloração da população bacteriana, foram adicionados os reagentes SYTO® 9 e iodeto de

propídeo em proporções iguais. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente e ausência de luz por 15 minutos. A coloração SYTO® 9 foi usada com excitação de 480 nm e emissão de 500 nm para corar de verde as células bacterianas vivas. A coloração com iodeto de propídio (excitação de 490 nm e emissão de 635 nm) foi usada para corar de vermelho as células bacterianas mortas.

3.2.3.6 Ensaio para análise de sensibilidade a estresse osmótico em *G. diazotrophicus* e mutante ΔGDI_{3490}

A estirpe selvagem e a mutante foram crescidas até alcançar $D.O_{600nm} = 1,0$ em frascos Erlenmeyer (1.000 mL) com 100 mL de meio LGI modificado (composição em gL^{-1} : glicose 10, K_2HPO_4 0,2; KH_2PO_4 0,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2; $(NH_4)_2SO_4$ 1,32; $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ 0,02; $NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$ 0,002 e $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ 0,018) (Cavalcante e Dobereiner, 1988). As culturas em $D.O_{600nm} = 1,0$ (10^8 células. mL^{-1}) foram diluídas para concentração de 10^6 células. mL^{-1} e plaqueadas em meio sólido LGI contendo duas concentrações de NaCl (80mM e 105mM), PEG (100mM e 300mM) e Sacarose (300mM e 600mM) esterilizados anteriormente por filtração (NaCl e PEG) e por autoclavagem (Sacarose). O ensaio permaneceu em estufa por 5 dias, a 30°C, posteriormente, fotografado para registrar o efeito do estresse sobre o crescimento bacteriano, tendo sido repetido ao menos três vezes.

3.2.3.7 Ensaio de solubilização de fósforo e zinco

Para o ensaio de solubilização dos nutrientes fósforo e zinco, os inóculos da estirpe selvagem e mutante $\Delta ABC-F$ *ettA* foram cultivados conforme item 3.2.3.6., e a $D.O_{600}$ ajustada para 1,0. Gotas de 10 μL de cada cultura foram dispostas no centro de placas de Petri contendo meio LGI modificado, suplementado com 0,54% de $Ca_5(PO_4)_3OH$ (concentração final de fósforo de 0,1%) e meio DYGS suplementado com 0,12% de ZnO (concentração final de zinco de 0,1%). Em ambos os meios, foram adicionados 5 $mL \cdot L^{-1}$ de azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2 M. As placas foram incubadas em estufa a 30° C, por 3 dias, quando foi mensurado o halo de solubilização nas diferentes

condições testadas. Cada ensaio foi composto por 3 repetições, tendo sido repetidos três vezes.

3.2.3.8 Obtenção das plantas

Sementes de *A. thaliana* (Col-0) foram submetidas à desinfestação superficial em fluxo laminar. As sementes foram lavadas com etanol a 95% por 1 min, em seguida, colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, sob agitação por 10 min. Foram então lavados seis vezes em água ultrapura estéril e transferidos para tubos estéreis. Todas as sementes foram mantidas por 2 dias a 4° C na ausência de luz para quebrar a dormência. As sementes foram germinadas em placas de Petri em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) ½ F, com 0,5% de sacarose e 0,05% de tampão MES e pH 5,7, e mantidas em B.O.D. por 10 dias a 23° C, sob irradiância de 120 mol/fótons m⁻²s⁻¹ por 12 horas diárias.

3.2.3.9 Crescimento das plântulas e cocultivo de bactérias

Plântulas de *A. thaliana* foram obtidas de germinação *in vitro* em meio líquido. Aproximadamente 10 plântulas foram cultivadas em placas de Petri contendo 18 ml de meio de cultura MS ½ força (Murashige, T.; Skoog, 1962), sem adição de hormônios por 10 dias. No décimo dia a partir da data da semeadura, 9 placas de Petri foram inoculadas com *G. diazotrophicus* na concentração de 10⁷ células. mL⁻¹ (item anterior). O cocultivo foi mantido em B.O.D. sob temperatura de 23° C e irradiância de 120 mol/fótons m⁻² s⁻¹ por 12 horas. Vinte e quatro horas após a inoculação, foi medida a Densidade Óptica do cocultivo, e as bactérias foram coletadas do meio líquido e centrifugadas 12.000 g por 10 min em temperatura ambiente. As células colhidas foram armazenadas a -80° C. O controle, isto é, bactérias cultivadas na ausência de plântulas foram preparadas de maneira similar. Ao final do ensaio de cocultivo, foram extraídos, por filtração com filtros de seringa (20µm), os exsudatos das plantas crescidas em meio MS e também os exsudatos resultantes do cocultivo em plantas de *A. thaliana* e *G. diazotrophicus* para ensaio de resposta aos compostos dos exsudatos vegetais e de cocultivo. Foram feitas três repetições biológicas.

3.2.3.10 Análises estatísticas

Os dados de taxa de solubilização de fósforo e zinco e ensaio de cocultivo da estirpe selvagem e do mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ de *G. diazotrophicus* PAL5 em meio LGI foram submetidos ao teste t a 5% de probabilidade para mensurar a significância entre os tratamentos. As análises dos dados obtidos foram feitas pelo software GraphPad Prism v7.01 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Os dados obtidos para os ensaios de estresse osmótico e ensaio com antibióticos foram testados pela análise de variância (ANOVA). O teste Tukey foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos ao nível de 5% de significância, utilizando o software GraphPad Prism v7.01 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3.2.4 RESULTADOS

3.2.4.1 Organização genômica do gene GDI-3490 em *G. diazotrophicus* PAL5

Visando a caracterizar o papel da proteína ABC-F ettA (Energy-dependent translational throttle protein EttA) de *G. diazotrophicus*, foi obtido um mutante defectivo para a produção de tal proteína. Para tanto, foi acessada uma biblioteca de mutantes de inserção contendo o transposon Tn5. Assim, foi isolado o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$, previamente identificado com inserção do transposon no gene GDI_3490. Tal gene codifica uma proteína com elevada homologia à proteína ABC-F ettA já caracterizada em outras espécies bacterianas. A análise do contexto genômico foi feita mostrando que os genes cowN (locus tag GDI_3488), que codificam a proteína de sustentação da fixação N₂, e o gene GDI_3489, que codifica a proteína N-acetyltransferase, são imediatamente anteriores ao gene GDI_3490 (Figura 1).

A análise de contexto genômico ainda permitiu identificar mais 6 genes próximos à ABC-F ettA: GDI_3486, que codifica a proteína UPF0301; GDI_3487,

que codifica uma proteína regulatória putativa; o gene *ppa* (locus tag: GDI_3491), que codifica uma pirofosfatase inorgânica; o gene GDI_3492, que codifica uma proteína de membrana; o gene GDI_3493, que codifica uma glicosil-transferase; e o gene GDI_3494, que codifica uma proteína conservada (Figura 1).

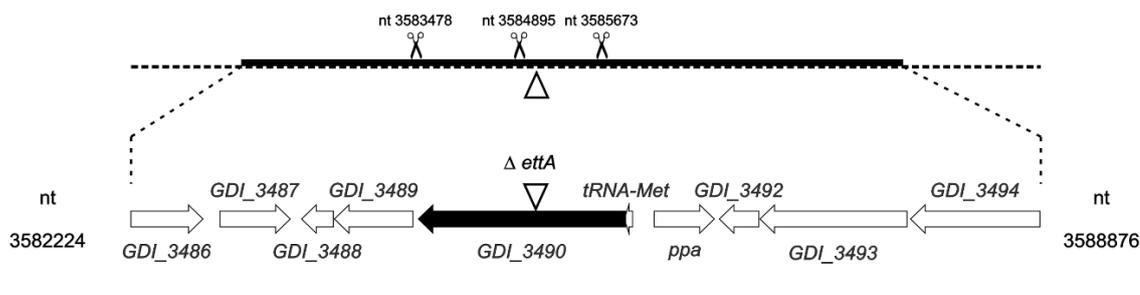


Figura 1. Localização genômica do mutante ΔGDI_{3490} . Organização genômica dos genes flanqueando a inserção do transposon Tn5 em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Grupo gênico flanqueando *GDI_3490* de acordo com a base de dados do NCBI. As setas indicam a orientação da fase de leitura aberta. Seta preta: gene *GDI_3490*, interrompido neste estudo; setas brancas, genes não interrompidos; nt; nucleotídeo; tesouras pretas, sítios de restrição de *EcoRI* imediatamente antes e após o local de inserção de Tn5 no gene *GDI_3490*; triângulo branco, sítio de inserção de Tn5 na região *upstream* do gene *GDI_3490*. Barra de escala: 500 pb.

3.2.4.2 Análise filogenética da proteína ABC-f *ettA*

Com o intuito de avaliar a similaridade entre a proteína ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* e outras espécies de bactérias, foram feitos o alinhamento e a análise de filogenia dessa proteína. A proteína ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* apresentou alta similaridade com ABC-F *ettA* de *Rhizobium leguminosarum*, uma bactéria também promotora de crescimento vegetal. A análise indica que ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* exibe similaridade com bactérias patogênicas em humanos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* e *Staphylococcus aureus*, situação em ABC-F *ettA* tem sido mais intensamente estudada (Figura 2).

A análise filogenética levou, ainda, à formação de um segundo grupo contendo bactérias patogênicas de plantas (*Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas aeruginosa*), uma bactéria do trato digestivo de humanos

(*Escherichia coli*) e uma bactéria benéfica para plantas (*Herbaspirillum seropedicae*). Este grupo está filogeneticamente mais distante de ABC-F ettA de *G. diazotrophicus* (Figura 2).

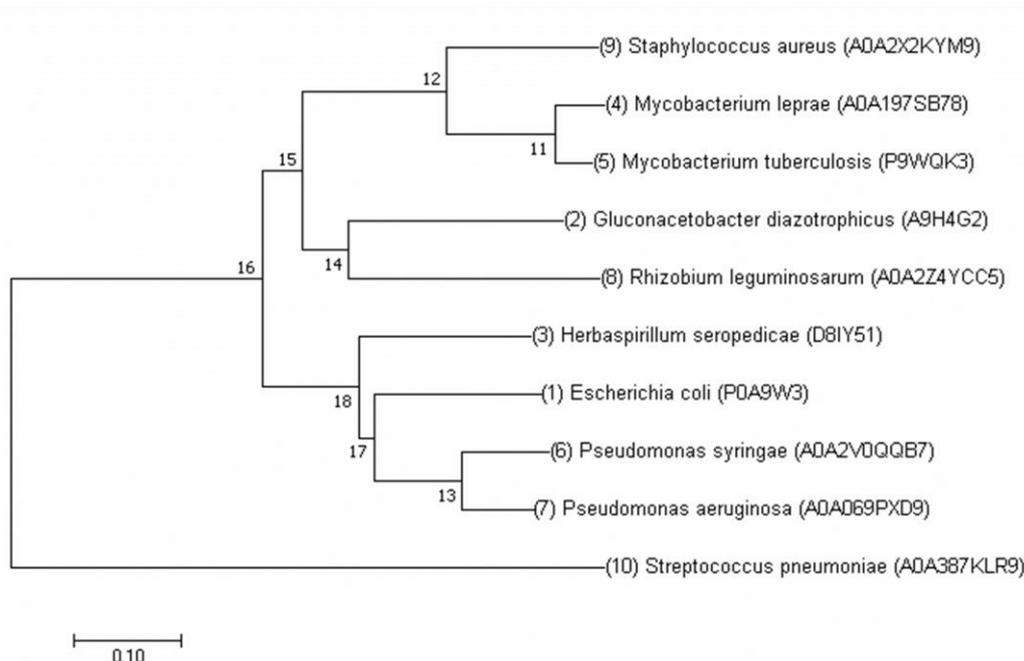


Figura 2. Relações evolutivas de proteínas homólogas à ABC-F ettA em outras espécies em relação à *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 2.43827942 é mostrada. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson (Zuckerandl e Pauling, 1965) e estão nas unidades do número de substituições de aminoácidos por local. A análise envolveu 10 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminadas. Houve um total de 541 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

3.2.4.3 Importância da proteína ABC-F ettA na resistência a antibióticos em *G. diazotrophicus*

Com o objetivo de avaliar a importância de ABC-F ettA na resistência a diferentes antibióticos, a bactéria *G. diazotrophicus* selvagem e o mutante Δ ABC-

F ettA foram cultivados em meio DYGS, suplementado com 175µg/mL de ampicilina, 50µg/mL de estreptomicina ou 5µg/mL de tetraciclina.

Em condições de controle, foi observado crescimento similar entre as estirpes de *G. diazotrophicus* selvagem e o mutante (Figura 3A), mas a exposição das estirpes ao antibiótico ampicilina levou a padrões de resposta distintos. Enquanto *G. diazotrophicus* selvagem sofreu mais de 76% de inibição do crescimento, o mutante apresentou apenas 7% de inibição em seu crescimento (Figura 4A).

Quando analisamos o comportamento da estirpe selvagem e da mutante na presença do antibiótico estreptomicina, mais uma vez a bactéria selvagem se mostrou sensível, porém o grau de tolerância do mutante $\Delta ABC-F ettA$ se mostrou menor que o observado em ampicilina (Figura 3B). *G. diazotrophicus* apresentou 82% de inibição do crescimento, enquanto o mutante $\Delta ABC-F ettA$ apresentou 47,2% de inibição do crescimento em 24 horas (Figura 4B).

A exposição das estirpes bacterianas ao antibiótico tetraciclina levou a um padrão de resposta inverso em relação aos outros antibióticos. A estirpe mutante foi mais sensível que a bactéria selvagem (Figura 3C). Embora a bactéria selvagem tenha apresentado uma sensibilidade, que inibiu seu crescimento em 48%, a bactéria mutante apresentou quase 70% de inibição de crescimento (Figura 3C).

Adicionalmente, com o intuito de avaliar o efeito dos antibióticos sobre a viabilidade das células bacterianas, foram feitas análises de microscopia de fluorescência para detecção de morte celular. Os resultados mostram que no tratamento controle não há diferença significativa nos números de células vivas e mortas entre as estirpes selvagem e mutante. Para a estirpe selvagem, foi observado 85,6% de células vivas e 14,4% de células mortas, enquanto para a estirpe mutante, foi observado 85,4% de células vivas e 14,6% de células mortas (Figuras 3B-A1 e A2, Figura 3C)

No tratamento com 175µg/ml de ampicilina, observou-se 82,8% de células mortas na estirpe selvagem e apenas 17,2% de células vivas. Para a mutante, a proporção de bactérias vivas e mortas foi oposta à selvagem, pois 73,84% das células estavam vivas e 26,16% das células estavam mortas (Figuras 3B- B1 e B2, Figura 3C).

Para o tratamento com 50 µg/mL de estreptomicina, pôde ser observada a sensibilidade da bactéria selvagem a este antibiótico, pois 77,3% das células estavam mortas e 22,7% vivas. Quando analisadas as células da estirpe mutante $\Delta ABC-F ettA$, é possível observar sua tolerância ao antibiótico, pois 85,3% das células estavam vivas e 14,7%, mortas (Figuras 3B-C1 e C2, Figura 3C).

O tratamento antibiótico tetraciclina (5 µg/mL) mostrou que a bactéria selvagem apresentou 78% de células vivas e 22% de células mortas. Em relação à bactéria mutante $\Delta ABC-F ettA$, 84,6% das células estavam vivas e 15,4%, mortas (Figura 3B-D1 e D2, Figura.3C).

Nossos dados mostram que a proteína ABC-F ettA de *G. diazotrophicus* está envolvida com a resistência a antibióticos, tendo sido obtidos resultados contrastantes para diferentes antibióticos, sugerindo especificidades nos mecanismos de resposta.

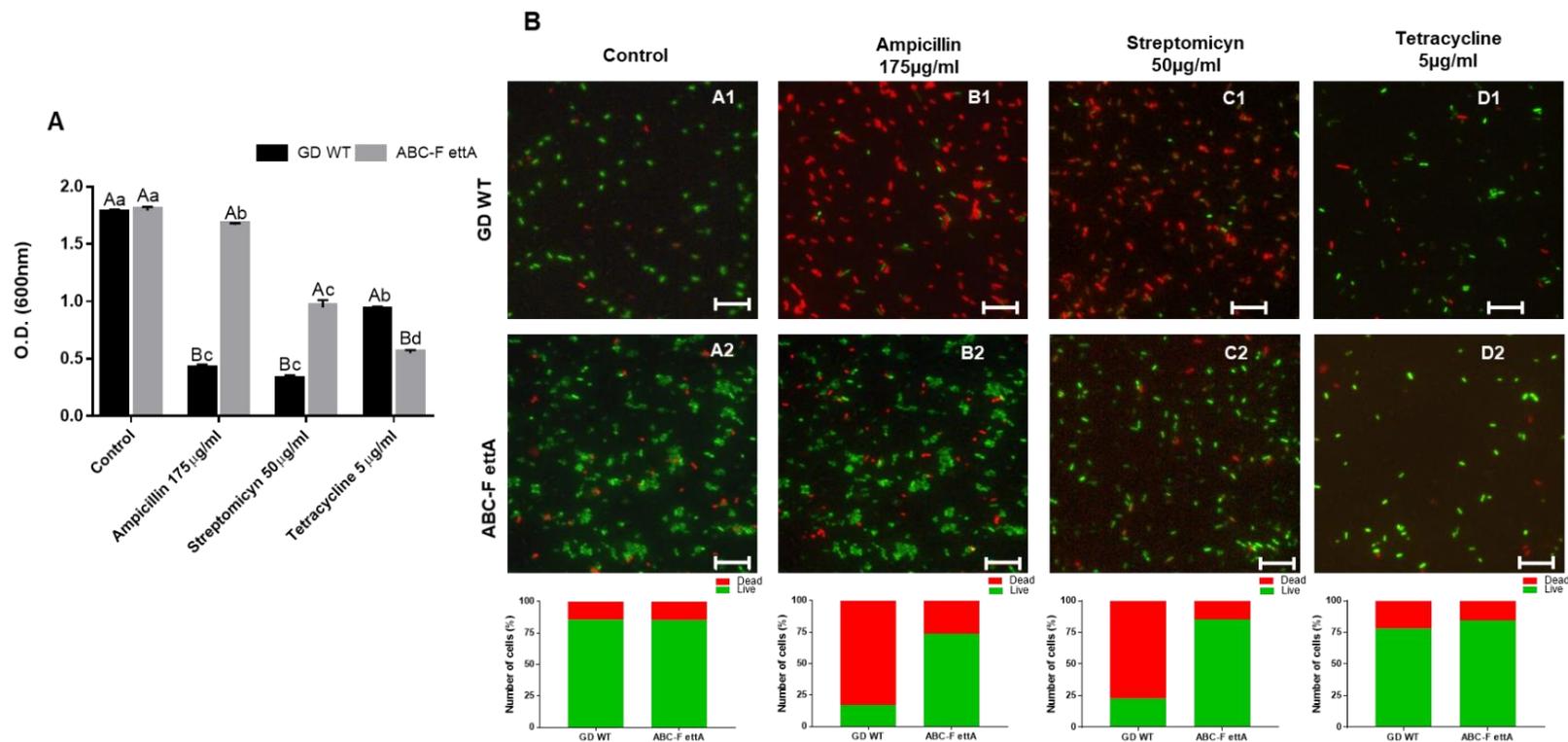


Figura 3. Resposta de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutantes *ABC-F ettA* a diferentes antibióticos. A representa a bactéria selvagem (WT) e mutantes crescidos em meio líquido DYGS, a 30°C, suplementado com Ampicilina (175µg/mL), Estreptomicina (50µg/mL) e Tetraciclina (5µg/mL). Os resultados foram coletados após 24 horas de crescimento. A figura A representa o resultado de, no mínimo, três experimentos independentes. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A figura B representa Microscopia de fluorescência (Kit de Viabilidade Bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™; Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) da população bacteriana após tratamento com antibióticos. A1, B1, C1, D1 representam a bactéria selvagem nas concentrações: controle, 175 µg/mL de Ampicilina, 50 µg/mL de Estreptomicina e 5 µg/mL de Tetraciclina, respectivamente. A2, B2, C2 e D2 representam o mutante $\Delta ABC-F ettA$ nas concentrações: controle, 175 µg/mL de Ampicilina, 50 µg/mL de Estreptomicina e 5 µg/mL de Tetraciclina, respectivamente, após 24 horas de cultivo. As imagens mescladas representam a superposição de bactérias mortas (em vermelho) e vivas (em verde). A barra de escala representa 10 µm. Os gráficos logo abaixo das imagens representam a porcentagem de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) nos tratamentos controle, Ampicilina (175 µg/mL), Estreptomicina (50 µg/mL) e Tetraciclina (5µg/mL).

3.2.4.4 A mutação no gene GDI_3490 afeta a tolerância de *G. diazotrophicus* PAI 5 aos estresses salino e osmótico

Para verificar a importância da proteína ABC-F *ettA* na tolerância aos estresses salino e osmótico, a estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* e o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ foram cultivados na presença de três agentes estressores diferentes: NaCl, PEG e Sacarose. Cada agente foi avaliado em duas concentrações.

Para o NaCl, a estirpe selvagem se mostrou tolerante nas duas concentrações testadas (80 mM e 105 mM), mas o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ foi fortemente afetado sob concentração de 105 mM NaCl (Figura 4A).

O ensaio com PEG utilizou as concentrações de 100 e 300 mM. Novamente a estirpe selvagem se mostrou tolerante em todas as concentrações testadas, enquanto o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ se mostrou significativamente mais sensível na concentração de 300 mM (Figura 4B).

Com relação à sacarose, foram utilizadas as concentrações de 300mM e 600 mM. A estirpe selvagem se mostrou tolerante em relação às duas concentrações. O mesmo não ocorreu para o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$, que mostrou sensibilidade às duas concentrações (Figura 4C). Esses resultados mostram que a falta de ABC-F *ettA* torna a bactéria susceptível aos estresses salino e osmótico.

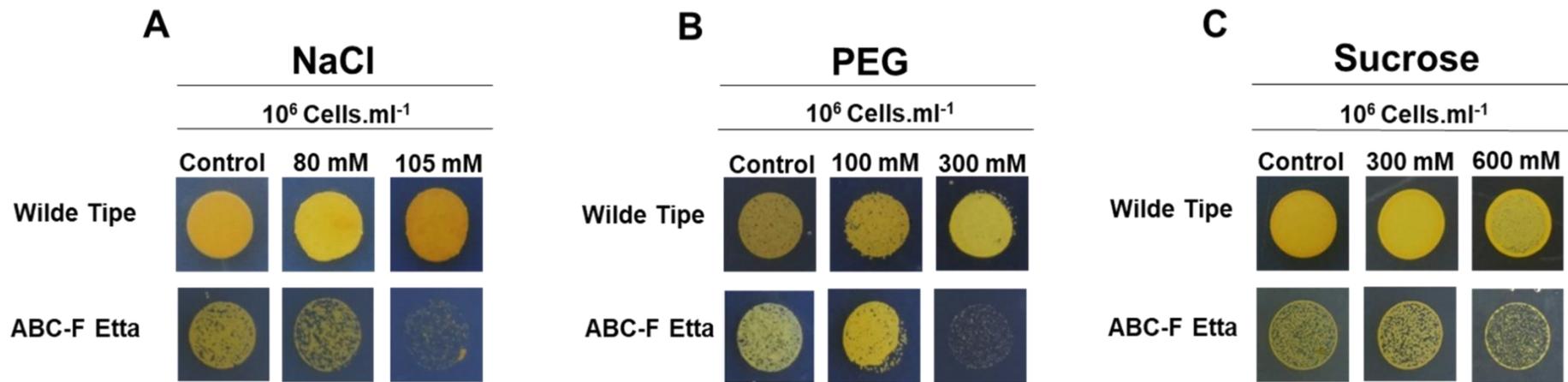


Figura 4. Ensaio de sensibilidade do mutante ABC-F *ettaA* a estresse osmótico. Ensaio de sensibilidade do mutante ABC-F Etta em comparação entre a estirpe selvagem (Wilde Tipe) quanto à sensibilidade de 80 mM e 105 mM de NaCl (A), de 100 mM e 300 mM de PEG (B) e de 300 mM e 600 mM de sacarose.

3.2.4.5 ABC-F *ettA* não participa da solubilização de fosfato e zinco em *G. diazotrophicus*.

Com o objetivo de avaliar a importância do gene $\Delta ABC-F \text{ ettA}$ na solubilização de nutrientes (fosfato e zinco) em *G. diazotrophicus* PAL 5, a estirpe selvagem e o mutante $\Delta ABC-F \text{ ettA}$ foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de $(Ca_5(PO_3)_4OH)$ e do zinco (ZnO) em meios sólido LGI modificado e DYGS, respectivamente.

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que a solubilização de fósforo ($Ca_5(PO_3)_4OH$) e do zinco (ZnO) não foi afetada pela mutação no gene $\Delta ABC-F \text{ ettA}$.

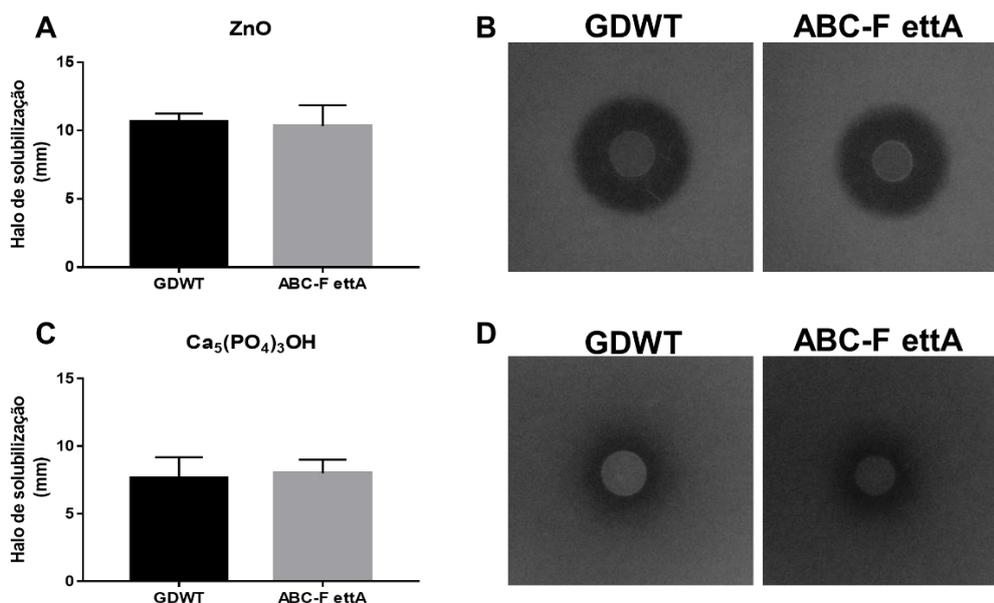


Figura 5. Comparação da capacidade de solubilização de fósforo e zinco entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 selvagem e o mutante $\Delta ABC-F \text{ ettA}$. A estirpe selvagem e o mutante $\Delta ABC-F \text{ ettA}$ foram inoculados em meio sólido LGI modificado e DYGS, respectivamente, suplementado com $Ca_5(PO_3)_4OH$ e ZnO. (A e C) mensuração dos halos e (B e D) registro fotográfico das placas de ensaio de solubilização de fósforo e zinco, respectivamente, após 5 dias de cultivo em estufa, a 30° C. Barras do gráfico representam o erro padrão da média. (n=3).

3.2.4.6 ABC-F *ettA* é essencial para a resposta de *G. diazotrophicus* a exsudatos vegetais

Para avaliar a importância da proteína ABC-F *ettA* na interação bactéria planta, o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ e a estirpe selvagem foram colocados em cocultivo com plantas de *A. thaliana* por 24 horas. *G. diazotrophicus* selvagem apresentou ganho de crescimento em cerca de 50% em relação ao cultivo na ausência de plantas. Em contrapartida, a multiplicação bacteriana do mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ em cocultivo foi reduzida em comparação ao cultivo na ausência de plantas (Figura 6A).

Um novo ensaio de cultivo bacteriano foi conduzido visando a testar se a mutação em *ABC-F ettA* afeta a percepção de metabólitos presentes nos exsudatos vegetais. Para tanto, foram obtidos filtrados de meios de cultivo (MS 50%) de cocultivo bactéria-planta e de plantas cultivadas na ausência de bactérias. Tais filtrados foram adicionados a novos cultivos bacterianos em meio MS 50%, inoculados com a *G. diazotrophicus* selvagem e o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$. Conforme apresentado na Figura 6B, ambas as bactérias apresentaram crescimento similar quando crescidas em meio MS 50%. Quando as bactérias foram cultivadas em meio suplementado com exsudatos provenientes de plantas cultivadas *in vitro*, não houve resposta de crescimento bacteriano. Entretanto, o filtrado proveniente de cocultivo entre *Arabidopsis* e *G. diazotrophicus* promoveu indução da multiplicação de *G. diazotrophicus* selvagem, enquanto o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ não apresentou indução de crescimento bacteriano (Figura 6B). Os resultados mostram que a presença da bactéria *G. diazotrophicus* induz alterações no perfil de exsudatos em *A. thaliana*, gerando produção de metabólitos benéficos à multiplicação bacteriana. A mutação no gene $\Delta ABC-F\ ettA$ elimina a resposta bacteriana a tais metabólitos no âmbito do crescimento bacteriano.

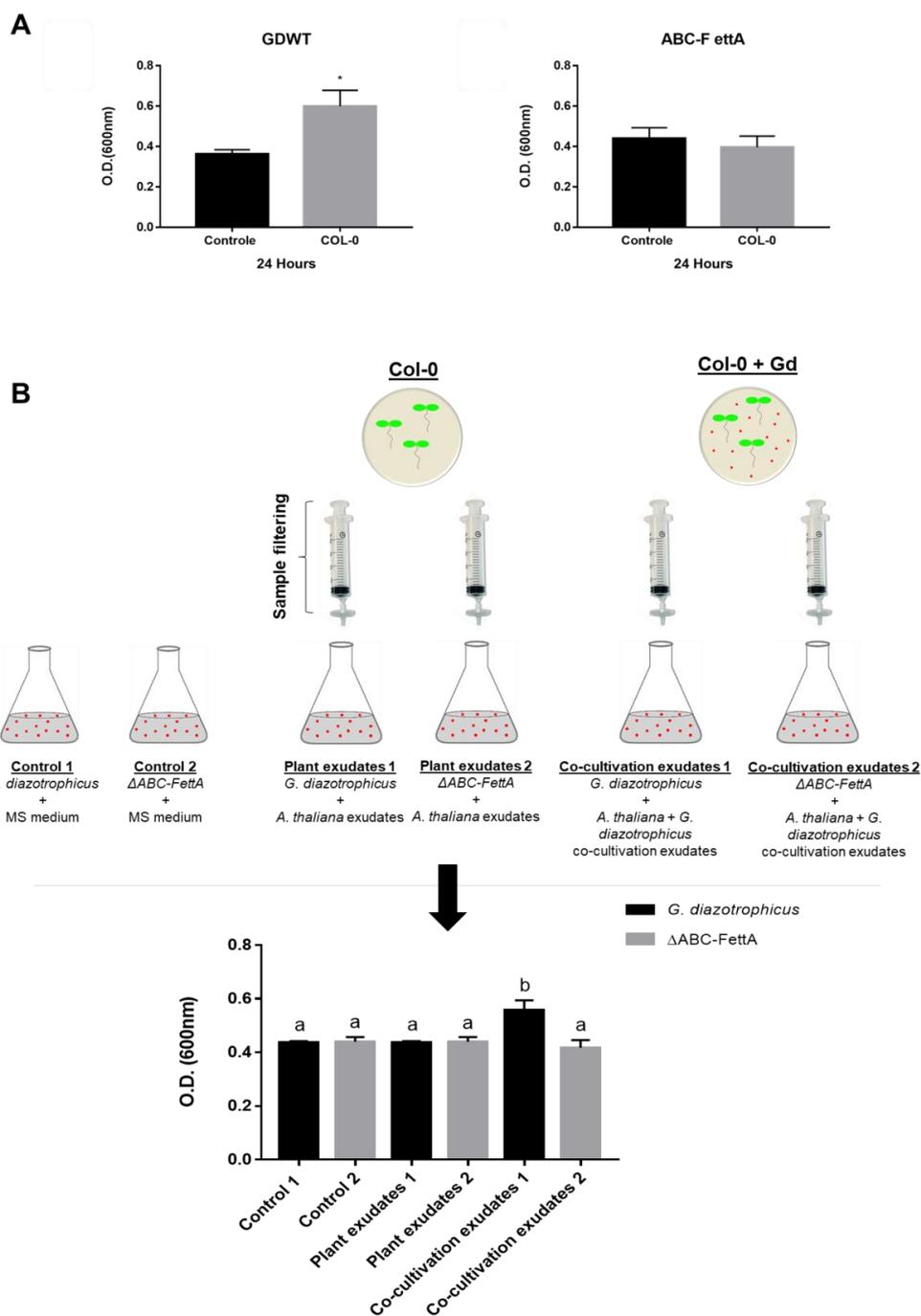


Figura 6. Ensaio de cocultivo e efeito dos exsudatos vegetais no crescimento de *G. diazotrophicus* selvagem e do mutante $\Delta ABC-F ettA$. A Figura A representa a média da D.O._{600nm} em *G. diazotrophicus* selvagem e o mutante $\Delta ABC-F ettA$ depois de 24 horas de cocultivo. Médias seguidas por (*) diferem estatisticamente do seu controle pelo Teste t a 5% de probabilidade (n=6). A Figura B representa o esquema de obtenção e filtragem dos exsudatos vegetais, tendo a estirpe selvagem e o mutante $\Delta ABC-F ettA$ crescido em meio líquido MS 1/4F, a 30° C, suplementado com exsudatos de plantas de *A. thaliana* crescidas em meio MS 1/4F por 10 dias (Plant exudates 1 e 2) e exsudatos do cocultivo entre *A. thaliana* e *G. diazotrophicus* (co-cultivation exudates 1 e 2). Os resultados foram coletados após 24 horas de crescimento. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.5 DISCUSSÃO

G. diazotrophicus é uma bactéria diazotrófica endofítica, inicialmente isolada de tecidos de plantas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Dobereiner, 1988). Tem a capacidade de colonizar espécies vegetais monocotiledôneas e dicotiledôneas, como milho (Mehnaz e Lazarovits, 2006), sorgo (M. F. Luna *et al.*, 2010), tomate (Luna *et al.*, 2012) e *Arabidopsis* (Rangel de Souza *et al.*, 2016). Além disso, outras particularidades fazem de *G. diazotrophicus* um interessante microrganismo modelo de estudo.

Entre essas particularidades, destaca-se a de tolerar diversos estresses ambientais, como os decorrentes da exposição a metais, a altas concentrações de sacarose e a ambientes salinos (Cavalcante e Dobereiner, 1988; Intorne *et al.*, 2012; De Oliveira *et al.*, 2016). Contudo, os mecanismos moleculares reguladores-chave envolvidos nos processos de tolerância a estresses ambientais, bem como na interação *G. diazotrophicus*/hospedeiro, ainda são pouco conhecidos. Diante do exposto, no presente trabalho, um mutante de inserção de *G. diazotrophicus* defectivo na produção de uma proteína de interação ribossomal e resistência a antibióticos, ABC-F *ettA*, foi analisado com ênfase no seu papel na tolerância a três tipos de antibióticos, a estresses ambientais e na resposta a compostos vegetais exsudatos durante o processo de interação bactéria-planta.

A análise de contexto genômico mostrou que os genes GDI_3488, GDI_3489 e GDI_3490 estão no mesmo sentido de transcrição do gene GDI_3490 (Figura 1). O gene GDI_3490 codifica a proteína ABC-F *ettA*, comumente encontrada em diversas espécies bacterianas, sejam estas espécies patogênicas para humanos ou plantas até bactérias benéficas de plantas (Davidson *et al.*, 2008).

A família das proteínas ABC consiste em proteínas transportadoras que compartilham uma arquitetura molecular utilizada para acoplar o transportador transmembrana à hidrólise de ATP (Chakraborty, 2001; Dean *et al.*, 2001). Entre os diversos tipos de proteínas ABC, as proteínas ABC-F se destacam por apresentarem atividades distintas em relação às demais proteínas transportadoras. Elas desempenham diversas funções bioquímicas nas células bacterianas, como a atividade de reparo do DNA e a tradução do RNAm, além de

estarem envolvidas na resistência a antibióticos, principalmente aqueles com ação direta no ribossomo bacteriano (Chen *et al.*, 2014; Daniel *et al.*, 2018; Ero *et al.*, 2019; Sharkey e O'Neill, 2018).

Com o intuito de verificar se a proteína ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* está envolvida na proteção celular contra efeitos danosos de antibióticos, a estirpe selvagem e a estirpe mutante Δ ABC-F *ettA* foram expostas aos antibióticos ampicilina, estreptomicina e tetraciclina. Os resultados mostram que a exposição ao antibiótico tetraciclina levou a uma redução de 69,3% da taxa de crescimento do mutante Δ ABC-F *ettA* em comparação ao crescimento da estirpe selvagem. Tetraciclina tem ação direta sobre o ribossomo, local onde a proteína ABC-F *ettA* interage diretamente. Essa proteína parece interagir fisicamente com os antibióticos, afastando-os do ribossomo por uma mudança em sua conformação (Murina *et al.*, 2018; Sharkey e O'Neill, 2018; Sharkey *et al.*, 2016; Wilson, 2016). Resultado semelhante de redução de taxa de crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* em resposta à exposição a tetraciclina foi encontrado por Daniel *et al.* (2018) em trabalho com o mutante para a mesma proteína. Adicionalmente, estudos mostram que a proteína ABC-F *ettA* medeia a resistência a antibióticos por meio da proteção de seu alvo, o ribossomo, cujo mecanismo principal é a associação física da proteína para proteger a função ribossômica de modo a inibir a ação do antibiótico (Sharkey *et al.*, 2016).

Embora os antibióticos estreptomicina e tetraciclina atuem no ribossomo, os alvos e os mecanismos de ação são diferentes. Enquanto a tetraciclina atua se ligando diretamente ao ribossomo (Porção 30S), assim, inibindo a síntese proteica, a estreptomicina atua sobre o complexo de iniciação da síntese e leva a uma leitura errônea ou à incorporação de nucleotídeos errados, resultando em proteínas sem função (Li *et al.*, 2013; Spotts e Stainer, 1961). Em sinergia com os dados da literatura, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a proteína ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* é importante para proteção da bactéria contra o antibiótico tetraciclina.

A exposição das estirpes selvagem e mutante ao antibiótico ampicilina revelou maior tolerância do mutante Δ ABC-F *ettA*. A ampicilina é um antibiótico do tipo β -lactâmico, que atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana (Bizzarro *et al.*, 2008; Thornsberry e Kirven, 1974). Este mecanismo de ação é distinto dos outros antibióticos testados, que atuam nos ribossomos. Mutações no

genoma bacteriano que causam resistência a antibióticos são bem conhecidos (Thornsberry e Kirven, 1974; Levin-Reisman *et al.*, 2017), porém ainda são escassos estudos que associam a proteína ABC-F a essa resistência. Na literatura existem algumas controvérsias em relação à função da proteína ABC-F *ettA*. Alguns estudos relatam, por exemplo, que esta proteína pode ter atividade do tipo transportadora (Chesneau *et al.*, 2005; Jacquet *et al.*, 2008; Reynolds, 2003). Porém novos estudos ainda são necessários acerca da resistência adquirida por *G. diazotrophicus* quando mutada na proteína ABC-F *ettA*, de modo a conhecer os mecanismos responsáveis por tal resistência.

G. diazotrophicus é capaz de tolerar elevadas concentrações de sacarose (30%) além de ser tolerante a alguns tipos de sais, indicando existência de mecanismos eficientes de osmotolerância (Cavalcante e Dobereiner, 1988; de Oliveira *et al.*, 2016). No presente trabalho, o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ foi exposto aos agentes estressores osmóticos NaCl, PEG e sacarose em concentrações nas quais a estirpe selvagem não tem seu crescimento afetado. Como resultado, o mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ apresentou sensibilidade a todos os agentes estressores testados. Apesar de a literatura sugerir em alguns trabalhos a atividade de transporte na proteína ABC-F *ettA* em algumas espécies de bactérias (Chesneau *et al.*, 2005; Jaquet *et al.*, 2008), estudos de localização mostraram que a proteína ABC-F se encontra no citoplasma e não tem domínio transmembrana (Kerr, 2004).

O aumento da sensibilidade do mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ aos estresses osmóticos revela um novo papel para a proteína ABC-F *ettA* em bactérias. A inativação da atividade ribossomal é uma das respostas gerais de bactérias sob estresses ambientais, tais como calor, acidez ou estresse osmótico (El-Sharoud, 2004). Neste contexto, podemos especular que ABC-F *ettA* seria capaz de atuar na proteção da atividade ribossomal também sob condições de estresses ambientais. Futuros estudos que investiguem os mecanismos associados a tal proteção poderão trazer importantes informações sobre este novo papel de ABC-F *ettA*.

Plantas exsudam compostos específicos que são reconhecidos por microrganismos, como ácidos orgânicos, metabólitos secundários, aminoácidos e flavonoides (Sasse *et al.*, 2018; Jacoby *et al.*, 2018). Adicionalmente, sabe-se que os exsudatos vegetais são a chave para o processo de interação bactéria-planta,

além de apresentarem forte influência na composição da comunidade microbiana da rizosfera (Dennis *et al.*, 2010). No presente trabalho, observamos que a mutação no gene *ABC-F ettA* eliminou a capacidade de *G. diazotrophicus* de responder aos exsudatos vegetais no âmbito da indução da multiplicação bacteriana. O mutante $\Delta ABC-F ettA$ não apresentou diferença significativa na multiplicação bacteriana em resposta ao cocultivo com plântulas de *A. thaliana* e aos exsudatos provenientes da associação. O papel da proteína ABC-F ettA foi recentemente proposto por Boël *et al.* (2014), que demonstraram a ação da proteína ABC-F ettA na regulação da síntese proteica, tendo como base sua ligação ao sítio ribossomal de saída de RNAt (sítio E), interagindo com fatores reguladores da tradução. Os resultados do presente trabalho permitem hipotetizar que a ausência da proteína ABC-F ettA na estirpe mutante afetaria o processo de tradução de proteínas essenciais para a percepção dos exsudatos benéficos. Os dados do presente trabalho demonstram, pela primeira vez, o papel essencial de ABC ettA na interação entre bactérias e plantas.

Tomados em conjunto, os resultados deste trabalho permitiram caracterizar o papel essencial de ABC-F ettA de *G. diazotrophicus* na resposta a antibióticos e a estresses osmóticos, assim como na resposta bacteriana a exsudatos vegetais (Figura 7). Tais achados contribuem para maior entendimento dos mecanismos de resposta a estresses em *G. diazotrophicus* e de interação entre a bactéria e plantas. Tais resultados abrem portas para estudos futuros do papel destes mecanismos na modulação da associação entre outras bactérias e plantas.

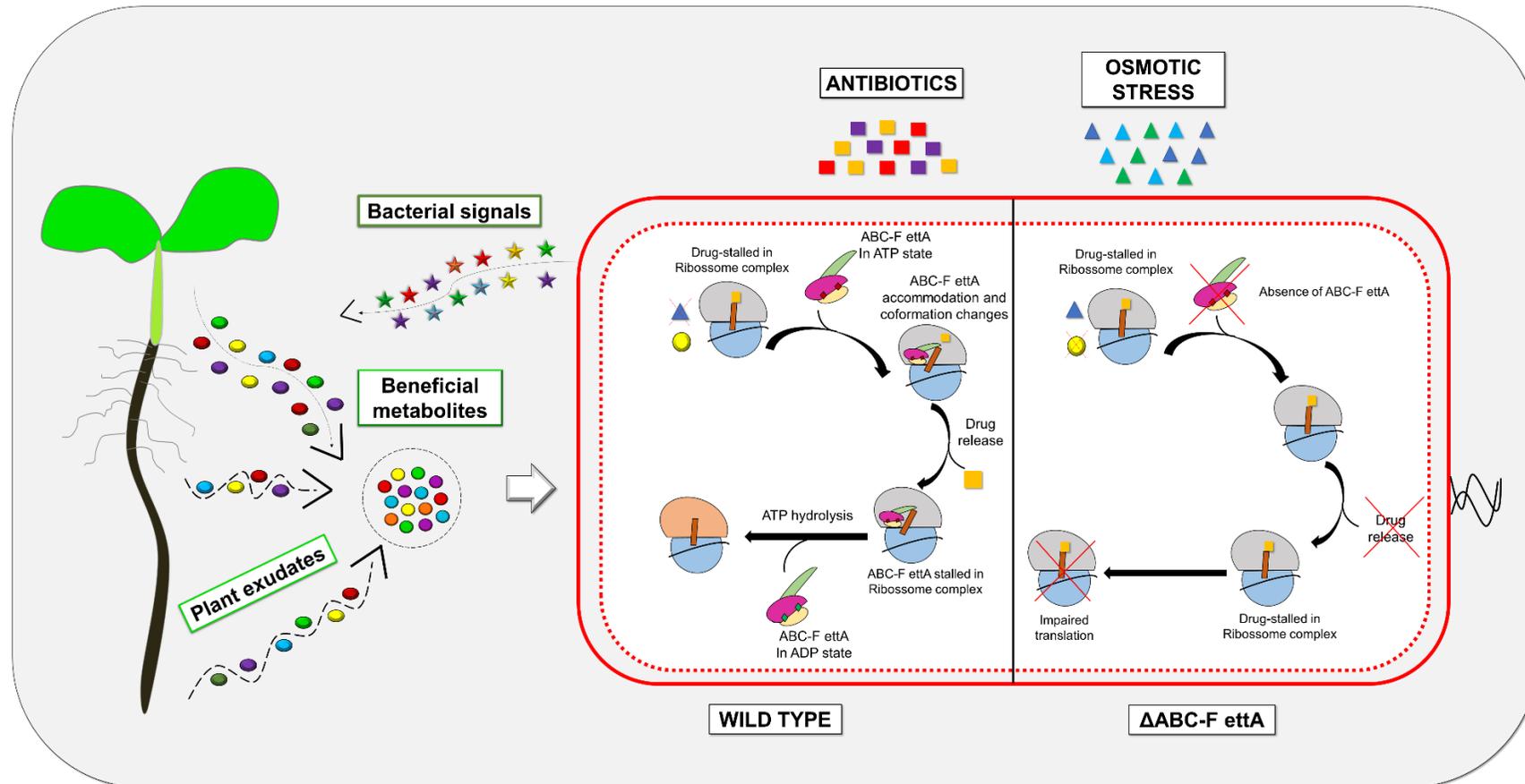


Figura 7. Esquema modelo para o mecanismo de funcionamento da proteína ABC-F ettA em *G. diazotrophicus* na resposta a antibióticos, estresse osmótico e cocultivo com plantas de *A. thaliana*.

3.2.6 CONCLUSÕES

- ✓ A proteína ABC-F *ettA* de *G. diazotrophicus* PAL5 apresenta elevada similaridade com proteínas homólogas já caracterizadas em outras espécies bacterianas.
- ✓ A sensibilidade do mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ ao antibiótico tetraciclina, juntamente com sua maior resistência aos antibióticos ampicilina e estreptomicina, sugere que a proteína ABC-F *ettA* atua em alvos específicos do ribossomo e do envoltório celular, gerando resposta distintas para os diferentes estímulos. A sensibilidade do mutante $\Delta ABC-F\ ettA$ aos estresses osmóticos revela um novo papel para a proteína ABC-F *ettA* em bactérias, sugerindo sua atuação na proteção da atividade ribossomal também sob condições de estresses ambientais.
- ✓ A proteína ABC-F *ettA* é essencial para a resposta de *G. diazotrophicus* a exsudatos de *A. thaliana*, sugerindo seu papel relevante nos processos iniciais de interação bactéria-planta.

3.2.7 PERSPECTIVAS

- ✓ Os efeitos contrastantes da mutação em *ABC-F ettA* na resposta de *G. diazotrophicus* a diferentes antibióticos abrem perspectivas para novos estudos sobre os mecanismos regulados pela proteína na proteção ribossomal e na síntese da parede celular bacteriana;
- ✓ A descoberta da essencialidade da proteína ABC-F *ettA* para a resistência a estresses osmóticos em bactérias permite vislumbrar novas análises dos mecanismos regulados pela proteína sob tais condições, bem como seu papel na resposta a outros estresses ambientais, como temperatura, metais pesados e agentes oxidativos.
- ✓ A importância de ABC-F *ettA* para a percepção de exsudatos vegetais justifica futuros ensaios de inoculação em plantas visando a avaliar a relevância dessa proteína para os processos de colonização e promoção do crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Shehbaz, I.A., O’Kane, S.L., Jr (2002) Taxonomy and phylogeny of Arabidopsis (brassicaceae). *Arab B* **1**: e0001.
- Alcalde-Rico, M., Hernando-Amado, S., Blanco, P., Martínez, J.L. (2016) Multidrug Efflux Pumps at the Crossroad between Antibiotic Resistance and Bacterial Virulence. *Front Microbiol* **7**: 1483.
- Ames, G.F., Lever, J. (1970) Components of histidine transport: histidine-binding proteins and hisP protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**: 1096–103.
- Arenz, S., Nguyen, F., Beckmann, R., Wilson, D.N. (2015) Cryo-EM structure of the tetracycline resistance protein TetM in complex with a translating ribosome at 3.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 5401–6.
- Badri, D. V., Vivanco, J.M. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* **32**: 666–681.
- Baginsky, S. (2009) Plant proteomics: Concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrom Rev* **28**: 93–120.
- Bais, H.P., Prithviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M., Vivanco, J.M. (2005) Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* **434**: 217–221.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Schweizer, H.P., Vivanco, J.M. (2002) Root specific

elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol Biochem* **40**: 983–995.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. (2006a) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 233–266.

Baldani, J., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Döbereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* **29**: 911–922.

Baldani, J.I., Baldani, V.L.D. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in gramminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An Acad Bras Cienc* **77**: 549–579.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* **6**: 71–79.

Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini*, R., Baraldi, R., Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* **24**: 7–11.

Bäumler, A.J., Sperandio, V. (2016) Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* **535**: 85–93.

Bergersen, F.J. (1971) Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes. *Annu Rev Plant Physiol* **22**: 121–140.

Bertalan, M., Albano, R., Pádua, V. de, Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K., Schwab, S., Araujo, J., Oliveira, A., França, L., Magalhães, V., Alquéres, S., Cardoso, A., Almeida, W., Loureiro, M.M., Nogueira, E., Cidade, D., Oliveira, D., Simão, T., Macedo, Jacyara, Valadão, A., Dreschsel, M., Freitas, F., Vidal, M., Guedes, H., Rodrigues, E., Meneses, C., Brioso, P., Pozzer, L., Figueiredo, D., Montano, H., Junior, J., Souza Filho, G. de, Martin Quintana Flores, V., Ferreira, B., Branco, A., Gonzalez, P., Guillobel, H., Lemos, M., Seibel, L., Macedo, José, Alves-Ferreira, M., Sachetto-Martins, G., Coelho, A., Santos, E., Amaral, G., Neves, A., Pacheco, A.B., Carvalho, D., Lery, L., Bisch, P., Rössle, S.C., Ürményi, T., Rael Pereira, A., Silva, R.,

- Rondinelli, E., Krüger, W. von, Martins, O., Baldani, J.I., Ferreira, P.C.G. (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* **10**: 450.
- Bizzarro, M.J., Dembry, L.-M., Baltimore, R.S., Gallagher, P.G. (2008) Changing patterns in neonatal *Escherichia coli* sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* **121**: 689–96.
- Blanco, Y., Blanch, M., Piñón, D., Legaz, M.-E., Vicente, C. (2005) Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J Biosci Bioeng* **99**: 366–371.
- Boël, G., Smith, P.C., Ning, W., Englander, M.T., Chen, B., Hashem, Y., Testa, A.J., Fischer, J.J., Wieden, H.-J., Frank, J., Gonzalez, R.L., Hunt, J.F. (2014) The ABC-F protein EttA gates ribosome entry into the translation elongation cycle. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 143–151.
- Broothaerts, W., Mitchell, H.J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L.M.A., Yang, W., Mayer, J.E., Roa-Rodríguez, C., Jefferson, R.A. (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* **433**: 629–633.
- Brown, J.R., Masuchi, Y., Robb, F.T., Doolittle, W.F. (1994) Evolutionary relationships of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes. *J Mol Evol* **38**: 566–576.
- Bruijn, F.J. de (2015) Biological Nitrogen Fixation. In *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing, Cham. pp. 215–224.
- Carvalhais, L.C., Dennis, P.G., Badri, D. V., Kidd, B.N., Vivanco, J.M., Schenk, P.M. (2015) Linking Jasmonic Acid Signaling, Root Exudates, and Rhizosphere Microbiomes. *Mol Plant-Microbe Interact* **28**: 1049–1058.
- Cavalcante, V.A., Dobereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**: 23–31.
- Chakraborty, K. (2001) Translational regulation by ABC systems. *Res Microbiol* **152**: 391–399.

- Chen, B., Boël, G., Hashem, Y., Ning, W., Fei, J., Wang, C., Gonzalez, R.L., Hunt, J.F., Frank, J. (2014) EttA regulates translation by binding the ribosomal E site and restricting ribosome-tRNA dynamics. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 152–159.
- Chesneau, O., Ligeret, H., Hosan-Aghaie, N., Morvan, A., Dassa, E. (2005) Molecular Analysis of Resistance to Streptogramin A Compounds Conferred by the Vga Proteins of Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 973–980.
- Chung, E.J., Hossain, M.T., Khan, A., Kim, K.H., Jeon, C.O., Chung, Y.R. (2015) *Bacillus oryzicola* sp. nov., an Endophytic Bacterium Isolated from the Roots of Rice with Antimicrobial, Plant Growth Promoting, and Systemic Resistance Inducing Activities in Rice. *plant Pathol J* **31**: 152–64.
- Cocking, E.C., Stone, P.J., Davey, M.R. (2006) Intracellular colonization of roots of *Arabidopsis* and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* **42**: 74–82.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**: 3674–3676.
- Cordeiro, F.A., Tadra-Sfeir, M.Z., Huergo, L.F., Oliveira Pedrosa, F. de, Monteiro, R.A., Souza, E.M. de (2013) Proteomic Analysis of *Herbaspirillum seropedicae* Cultivated in the Presence of Sugar Cane Extract. *J Proteome Res* **12**: 1142–1150.
- Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**: 564–82.
- Daniel, J., Abraham, L., Martin, A., Pablo, X., Reyes, S. (2018) Rv2477c is an antibiotic-sensitive manganese-dependent ABC-F ATPase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* **495**: 35–40.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 317–64, table of contents.

- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* **42**: 1007–17.
- DeAngelis, K.M., Ji, P., Firestone, M.K., Lindow, S.E. (2005) Two novel bacterial biosensors for detection of nitrate availability in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8537–47.
- Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R. (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 313–327.
- DÖBEREINER, J., ANDRADE, V. de O., BALDANI, V.L.D. (1999) *Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia*. EMBRAPA Agrobiologia, Seropedica.
- Doi, Y., Takaya, N. (2015) A novel A3 group aconitase tolerates oxidation and nitric oxide. *J Biol Chem* **290**: 1412–21.
- Dong, Z., Canny, M.J., McCully, M.E., Roboredo, M.R., Cabadilla, C.F., Ortega, E., Rodes, R. (1994) A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). *Plant Physiol* **105**: 1139–1147.
- Doornbos, R.F., Loon, L.C. van, Bakker, P.A.H.M. (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agron Sustain Dev* **32**: 227–243.
- Džidić, S., Šušković, J., Kos, B. (2008) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol* **46**: 11–21.
- El-Sharoud, W.M. (2004) Ribosome inactivation for preservation: concepts and reservations. *Sci Prog* **87**: 137–152.
- Ero, R., Kumar, V., Su, W., Gao, Y. (2019) Ribosome protection by ABC-F proteins—Molecular mechanism and potential drug design. *Protein Sci* **28**: 684–693.
- Eskin, N. (2012) Colonization of Zea mays by the nitrogen fixing bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Electron Thesis Diss Repos* .

- Farrar, K., Bryant, D., Cope-Selby, N. (2014) Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnol J* **12**: 1193–1206.
- Ferenci, T., Boss, W., Schwartz, M., Szmelcman, S. (1977) Energy-Coupling of the Transport System of *Escherichia coli* Dependent on Maltose-Binding Protein. *Eur J Biochem* **75**: 187–193.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D.E., Gresshoff, P.M. (2010) Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *J Integr Plant Biol* **52**: 61–76.
- Flores, H.E., Vivanco, J.M., Loyola-Vargas, V.M. (1999) ‘Radicle’ biochemistry: the biology of root-specific metabolism.’ *Trends Plant Sci* **4**: 220–226.
- Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C. (2008) Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annu Rev Genet* **42**: 413–441.
- Glandorf, D.C.M., Bakker, P.A.H.M., Loon, L.C. Van (1997) Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. .
- Glick, B.R. (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica (Cairo)* **2012**: 1–15.
- Glick, B.R. (2015) Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. In *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer International Publishing, Cham. pp. 1–28.
- Gómez-Manzo, S., Contreras-Zentella, M., González-Valdez, A., Sosa-Torres, M., Arreguín-Espinoza, R., Escamilla-Marván, E. (2008) The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Int J Food Microbiol* **125**: 71–8.
- Gómez-Manzo, S., Solano-Peralta, A., Saucedo-Vázquez, J.P., Escamilla-Marván, J.E., Kroneck, P.M.H., Sosa-Torres, M.E. (2010) The Membrane-Bound Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Carries a [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry* **49**: 2409–2415.

- Goodman, L.S., Gildman, A. (2006) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed., McGraw-Hill, .
- Goosen, N., Moolenaar, G.F. (2001) Role of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during nucleotide excision repair. *Res Microbiol* **152**: 401–409.
- Haichar, F. el Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W. (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J* **2**: 1221–1230.
- Hardoim, P.R., Overbeek, L.S. van, Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A. (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 293–320.
- Harman, R.M., Yang, S., He, M.K., Walle, G.R. Van de (2017) Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds. *Stem Cell Res Ther* **8**: 157.
- Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M. (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* **312**: 7–14.
- Herder, G. Den, Parniske, M. (2009) The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 491–499.
- Holland, I.B., A. Blight, M. (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* **293**: 381–399.
- Intorne, A.C., Oliveira, M.V. V. de, Pereira, L. de M., Souza Filho, G.A. (2012) Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *Int Microbiol* **15**: 69–78.
- Intorne, A.C., Oliveira, M.V. V De, Lima, M.L., Silva, J.F. Da, Olivares, F.L., Souza Filho, G. a. De (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* **191**: 477–483.

- Jacoby, R.P., Martyn, A., Kopriva, S. (2018) Exometabolomic Profiling of Bacterial Strains as Cultivated Using *Arabidopsis* Root Extract as the Sole Carbon Source. *Mol Plant-Microbe Interact* **31**: 803–813.
- Jacquet, E., Girard, J.-M., Ramaen, O., Pamlard, O., Lévaïque, H., Betton, J.-M., Dassa, E., Chesneau, O. (2008) ATP hydrolysis and pristinamycin IIA inhibition of the *Staphylococcus aureus* Vga(A), a dual ABC protein involved in streptogramin A resistance. *J Biol Chem* **283**: 25332–9.
- Jakowska, S., Nigrelli, R.F. (1960) ANTIMICROBIAL SUBSTANCES FROM SPONGES. *Ann N Y Acad Sci* **90**: 913–916.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L.E., Tapia-Hernandez, a, Mascarua-Esparza, M. a, Martinez-Romero, E., Caballero-Mellado, J. (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3676–3683.
- Jones, D.L., Nguyen, C., Finlay, R.D. (2009) Carbon flow in the rhizosphere: Carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil* **321**: 5–33.
- Kadlec, K., Brenner Michael, G., Sweeney, M.T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., Watts, J.L., Schwarz, S. (2011) Molecular Basis of Macrolide, Triamylide, and Lincosamide Resistance in *Pasteurella multocida* from Bovine Respiratory Disease. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 2475–2477.
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., Walsh, C. (2005) Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics. *Chem Rev* **105**: 425–448.
- Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* **33**: 300–305.
- Kellermann, O., Szmelcan, S. (1974) Active Transport of Maltose in *Escherichia coli* K12. Involvement of a ‘Periplasmic’ Maltose Binding Protein. *Eur J Biochem* **47**: 139–149.
- Kerr, I.D. (2004) Sequence analysis of twin ATP binding cassette proteins involved in translational control, antibiotic resistance, and ribonuclease L inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 166–173.

- Kerr, I.D., Reynolds, E.D., Cove, J.H. (2005) ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport? *Biochem Soc Trans* **33**: 1000–2.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., Swings, J. (2006) The Family Acetobacteraceae: The Genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia. In *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds). Springer New York, New York, NY. pp. 163–200.
- Knudson, L. (1920) THE SECRETION OF INVERTASE BY PLANT ROOTS. *Am J Bot* **7**: 371–379.
- Komarova, A. V, Tchufistova, L.S., Supina, E. V, Boni, I. V (2002) Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation. *RNA* **8**: 1137–47.
- Koornneef, M., Meinke, D. (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J* **61**: 909–921.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T., Renaut, J. (2011) Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J Proteomics* **74**: 1301–22.
- Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwülbecke, S., Patzelt, H., Schulze-Specking, A., Ban, N., Deuerling, E., Bukau, B. (2002) L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* **419**: 171–174.
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G. von, Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**: 567–580.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* **33**: 1870–1874.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0.

Bioinformatics **23**: 2947–2948.

- Lehrer, R.I., Ganz, T. (2002) Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* **14**: 96–102.
- Lenart, J., Vimberg, V., Vesela, L., Janata, J., Balikova Novotna, G. (2015) Detailed mutational analysis of Vga(A) interdomain linker: implication for antibiotic resistance specificity and mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 1360–4.
- Lery, L.M.S., Hemerly, A.S., Nogueira, E.M., Krüger, W.M.A. von, Bisch, P.M. (2011) Quantitative Proteomic Analysis of the Interaction Between the Endophytic Plant-Growth-Promoting Bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane. *Mol Plant-Microbe Interact* **24**: 562–576.
- Lery, L.M.S., Krüger, W.M.A. von, Viana, F.C., Teixeira, K.R.S., Bisch, P.M. (2008) A comparative proteomic analysis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic nitrogen compound. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* **1784**: 1578–1589.
- Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shores, N., Balaban, N.Q. (2017) Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science* **355**: 826–830.
- Li, K.-H., Yu, Y.-H., Dong, H.-J., Zhang, W.-B., Ma, J.-C., Wang, H.-H. (2017) Biological Functions of *ilvC* in Branched-Chain Fatty Acid Synthesis and Diffusible Signal Factor Family Production in *Xanthomonas campestris*. *Front Microbiol* **8**: 2486.
- Li, W., Atkinson, G.C., Thakor, N.S., Allas, Ü., Lu, C., Chan, K.-Y., Tenson, T., Schulten, K., Wilson, K.S., Haurlyuk, V., Frank, J. (2013) Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nat Commun* **4**: 1477.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Lopez, R. (2015) The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* **43**: W580–W584.

- Lin, J., Gagnon, M.G., Bulkley, D., Steitz, T.A. (2015) Conformational Changes of Elongation Factor G on the Ribosome during tRNA Translocation. *Cell* **160**: 219–227.
- Lopes, R.B.M., Oliveira Costa, L.E. de, Vanetti, M.C.D., Araújo, E.F. de, Queiroz, M.V. de (2015) Endophytic Bacteria Isolated from Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Exhibiting High Variability Showed Antimicrobial Activity and Quorum Sensing Inhibition. *Curr Microbiol* **71**: 509–516.
- López-Fernández, S., Compant, S., Vrhovsek, U., Bianchedi, P.L., Sessitsch, A., Pertot, I., Campisano, A. (2016) Grapevine colonization by endophytic bacteria shifts secondary metabolism and suggests activation of defense pathways. *Plant Soil* **405**: 155–175.
- Luna, M.F., Aprea, J., Crespo, J.M., Boiardi, J.L. (2012) Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl Soil Ecol* **61**: 225–229.
- Luna, M. F., Galar, M.L., Aprea, J., Molinari, M.L., Boiardi, J.L. (2010) Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnol Lett* **32**: 1071–1076.
- Mah, T.-F.C., O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**: 34–39.
- Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, É., Mergaert, P. (2011) Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol* **162**: 363–374.
- Massalha, H., Korenblum, E., Malitsky, S., Shapiro, O.H., Aharoni, A. (2017) Live imaging of root-bacteria interactions in a microfluidics setup. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 4549–4554.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**: 458–466.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., Swift, M.J. (1997) Agricultural

- Intensification and Ecosystem Properties. *Science (80-)* **277**: 504–509.
- Mehnaz, S., Lazarovits, G. (2006) Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* **51**: 326–35.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., Koornneef, M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science (80-)* **282**: 662,679-682.
- Meneses, C., Gonçalves, T., Alquéres, S., Rouws, L., Serrato, R., Vidal, M., Baldani, J.I. (2017) *Gluconacetobacter diazotrophicus* exopolysaccharide protects bacterial cells against oxidative stress in vitro and during rice plant colonization. *Plant Soil* **416**: 133–147.
- Meneses, C.H., M Rouws, L.F., Simões-Araújo, J.L., Vidal, M.S., Baldani, J.I. (2011) Exopolysaccharide Production Is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **24**: 1448–1458.
- Micallef, S.A., Shiaris, M.P., Colón-Carmona, A. (2009) Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J Exp Bot* **60**: 1729–1742.
- Mitchell, K., Brown, I., Knox, P., Mansfield, J. (2015) The role of cell wall-based defences in the early restriction of non-pathogenic hrp mutant bacteria in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* **112**: 139–50.
- Mönchgesang, S., Strehmel, N., Schmidt, S., Westphal, L., Taruttis, F., Müller, E., Herklotz, S., Neumann, S., Scheel, D. (2016) Natural variation of root exudates in *Arabidopsis thaliana*-linking metabolomic and genomic data. *Sci Rep* **6**: 29033.
- Mukherjee, A.K., Carp, M.-J., Zuchman, R., Ziv, T., Horwitz, B.A., Gepstein, S. (2010) Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *J Proteomics* **73**: 709–720.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio

Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497.

Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Hinnu, M., Saha, C.K., Grimshaw, J.W., Seki, T., Reith, M., Putrinš, M., Tenson, T., Strahl, H., Hauryliuk, V., Atkinson, G.C. (2018) ABCF ATPases Involved in Protein Synthesis, Ribosome Assembly and Antibiotic Resistance: Structural and Functional Diversification across the Tree of Life. *J Mol Biol* .

Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vadivelu, M., Janssens, D., Hoste, B., Ui Gum, K., Park, K.-D., Young Son, C., Sa, T., Caballero-Mellado, J. (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst Appl Microbiol* **28**: 277–286.

Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Vadivelu, M. (2000) *Antagonistic potential of N₂-fixing Acetobacter diazotrophicus against Colletotrichum falcatum Went., a causal organism of red-rot of sugarcane.* Current Science Association, .

Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D.N., Center, G. (2014) Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol Chem* **395**.

Nishimura, M.T., Dangl, J.L. (2010) Arabidopsis and the plant immune system. *Plant J* **61**: 1053–1066.

Oleghe, E., Naveed, M., Baggs, E.M., Hallett, P.D. (2017) Plant exudates improve the mechanical conditions for root penetration through compacted soils. *Plant Soil* **421**: 19–30.

Oliveira, M.V. V. De, Intorne, A.C., Vespoli, L. de S., Madureira, H.C., Leandro, M.R., Pereira, T.N.S., Olivares, F.L., Berbert-Molina, M.A., Souza Filho, G.A. De (2016) Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Arch Microbiol* **198**: 287–294.

Oliveira, M.V.V. de (2012) Análise da resposta de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 ao estresses osmótico e iônico: aspectos fisiológico e moleculares. .

- Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J., Dowling, D.N. (2015) Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front Microbiol* **6**: 745.
- Paula Soares, C. de, Rodrigues, E.P., Paula Ferreira, J. de, Simões Araújo, J.L., Rouws, L.F.M., Baldani, J.I., Vidal, M.S. (2015) Tn5 insertion in the tonB gene promoter affects iron-related phenotypes and increases extracellular siderophore levels in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* **197**: 223–233.
- Pérez-Montaño, F., Jiménez-Guerrero, I., Contreras Sánchez-Matamoros, R., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Rodríguez-Carvajal, M.A., Bellogín, R.A., Espuny, M.R. (2013) Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Res Microbiol* **164**: 749–760.
- Pérez-Pantoja, D., Nickel, P.I., Chavarría, M., Lorenzo, V. de (2013) Endogenous Stress Caused by Faulty Oxidation Reactions Fosters Evolution of 2,4-Dinitrotoluene-Degrading Bacteria. *PLoS Genet* **9**: e1003764.
- Persat, A., Nadell, C.D., Kim, M.K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N.S., Bassler, B.L., Gitai, Z., Stone, H.A. (2015) The Mechanical World of Bacteria. *Cell* **161**: 988–997.
- Pickl, A., Schönheit, P. (2015) The oxidative pentose phosphate pathway in the haloarchaeon *Haloferox volcanii* involves a novel type of glucose-6-phosphate dehydrogenase - The archaeal Zwischenferment. *FEBS Lett* **589**: 1105–1111.
- Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., Crecchio, C. (2015) Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils* **51**: 403–415.
- Rado, R., Andrianarisoa, B., Ravelomanantsoa, S., Rakotoarimanga, N., Rahetlah, V., Fienena, F.R., Andriambelason, O. (2015) *African journal of food, agriculture, nutrition, and development*. AFRICAN SCHOLARLY SCIENCE COMMUNICATIONS TRUST (ASSCAT), .

- Rangel de Souza, A.L.S. et al. (2016) Endophyt colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant Soil* **399**: 257–270.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 435–443.
- Reis, V.M. et al. (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J Microbiol Biotechnol* **10**: 401–5.
- Reynolds, E. (2003) Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int J Antimicrob Agents* **22**: 228–236.
- Reynolds, E., Ross, J.I., Cove, J.H. (2003) Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int J Antimicrob Agents* **22**: 228–236.
- Rhijn, P. Van, Vanderleyden, J. (1995) The Rhizobium-Plant Symbiosis. .
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M., Triplett, E.W. (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Funct Plant Biol* **28**: 829–836.
- Robinson, R.J., Fraaije, B.A., Clark, I.M., Jackson, R.W., Hirsch, P.R., Mauchline, T.H. (2016) Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant Soil* **405**: 381–396.
- Ross, J.I., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Baumberg, S., Wootton, J.C. (1990) Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* **4**: 1207–1214.
- Rovira, A.D. (1969) Plant root exudates. *Bot Rev* **35**: 35–57.
- Rudrappa, T., Quinn, W.J., Stanley-Wall, N.R., Bais, H.P. (2007) A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in

- down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **226**: 283–297.
- Santos, M.F. dos, Muniz de Pádua, V.L., Matos Nogueira, E. de, Hemerly, A.S., Domont, G.B. (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* **73**: 917–931.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Carmen Orozco-Mosqueda, M. del, Glick, B.R. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* **183**: 92–99.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., Thangaraju, M. (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere* **66**: 1794–1798.
- Sasse, J., Martinoia, E., Northen, T. (2018) Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends Plant Sci* **23**: 25–41.
- Sévin, D.C., Stählin, J.N., Pollak, G.R., Kuehne, A., Sauer, U. (2016) Global Metabolic Responses to Salt Stress in Fifteen Species. *PLoS One* **11**: e0148888.
- Sharkey, L.K.R., Edwards, T.A., O'Neill, A.J. (2016) ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. *MBio* **7**: e01975.
- Sharkey, L.K.R., O'Neill, A.J. (2018) Antibiotic Resistance ABC-F Proteins: Bringing Target Protection into the Limelight. *ACS Infect Dis* **4**: 239–246.
- Spotts, C.R., Stainer, R.Y. (1961) Mechanism of Streptomycin Action on Bacteria: A Unitary Hypothesis. *Nature* **192**: 633–637.
- Steindler, L., Bertani, I., Sordi, L. De, Schwager, S., Eberl, L., Venturi, V. (2009) LasI/R and RhII/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5131–40.
- Stincon, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M.A., Breitenbach, M., Brindle, K.M., Rabinowitz, J.D., Ralser, M. (2015) The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate

pathway. *Biol Rev* **90**: 927–963.

Stubbendieck, R.M., Vargas-Bautista, C., Straight, P.D. (2016) Bacterial Communities: Interactions to Scale. *Front Microbiol* **7**: 1234.

Tejera, N. a., Ortega, E., Gonzalez-Lopez, J., Lluch, C. (2003) Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Appl Microbiol* **95**: 528–535.

Tenover, F.C. (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med* **119**: S3–S10.

Thornsberry, C., Kirven, L.A. (1974) Ampicillin Resistance in *Haemophilus influenzae* as Determined by a Rapid Test for Beta-Lactamase Production A rapid capillary tube method was used to demonstrate beta-lactamase production by ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae*. .

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**: 671–677.

Tischendorf, G.W., Zeichhardt, H., Stöffler, G. (1974) Determination of the location of proteins L14, L17, L18, L19, L22 and L23 on the surface of the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli* by immune electron microscopy. *MGG Mol Gen Genet* **134**: 187–208.

Toda, M., Okubo, S., Ohnishi, R., Shimamura, T. (1989) [Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea]. *Nihon Saikingaku Zasshi* **44**: 669–72.

Treutter, D. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ Chem Lett* **4**: 147–157.

Vanderschuren, H., Lentz, E., Zainuddin, I., Gruissem, W. (2013) Proteomics of model and crop plant species: status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *J Proteomics* **93**: 5–19.

Vannuffel, P., Cocito, C. (1996) Mechanism of Action of Streptogramins and Macrolides. *Drugs* **51**: 20–30.

- Veselova, M.A., Romanova, Y.M., Lipasova, V.A., Koksharova, O.A., Zaitseva, Y. V., Chernukha, M.U., Gintsburg, A.L., Khmel, I.A. (2016) The effect of mutation in the *clpX* gene on the synthesis of N-acyl-homoserine lactones and other properties of *Burkholderia cenocepacia* 370. *Microbiol Res* **186–187**: 90–98.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. (2003) Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol* **132**: 44–51.
- Wang, Y., Gupta, R., Song, W., Huh, H.-H., Lee, S.E., Wu, J., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Kang, K.Y., Park, S.-R., Kim, S.T. (2017) Label-free quantitative secretome analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* highlights the involvement of a novel cysteine protease in its pathogenicity. *J Proteomics* **169**: 202–214.
- Weert, S. de, Vermeiren, H., Mulders, I.H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., Mot, R. De, Lugtenberg, B.J.J. (2002) Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**: 1173–1180.
- Weisblum, B., Davies, J. (1968) Antibiotic Inhibitors of the Bacterial Ribosome.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.-C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. (1996) Progress with Proteome Projects: Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**: 19–50.
- Wilmes, P., Bond, P.L. (2006) Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol* **14**: 92–97.
- Wilson, D.N. (2016) The ABC of Ribosome-Related Antibiotic Resistance. *MBio* **7**: e00598-16.
- Winzer, K. (2002) Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now — gone to lunch! *Curr Opin Microbiol* **5**: 216–222.
- Witzel, K., Strehmel, N., Baldermann, S., Neugart, S., Becker, Y., Becker, M.,

- Berger, B., Scheel, D., Grosch, R., Schreiner, M., Ruppel, S. (2017) *Arabidopsis thaliana* root and root exudate metabolism is altered by the growth-promoting bacterium *Kosakonia radicincitans* DSM 16656T. *Plant Soil* **419**: 557–573.
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., Heide, T. van der, Smith, L.T. (2001) Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* **130**: 437–460.
- Wright, G.D. (2003) Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 563–569.
- Wright, G.D. (2011) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun* **47**: 4055.
- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D., Williams, M.A. (2015) Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Front Plant Sci* **6**: 490.
- Yoneyama, H., Katsumata, R. (2006) Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 1060–1075.
- Zamioudis, C., Korteland, J., Pelt, J.A. Van, Hamersveld, M. van, Dombrowski, N., Bai, Y., Hanson, J., Verk, M.C. Van, Ling, H.-Q., Schulze-Lefert, P., Pieterse, C.M.J. (2015) Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 in *Arabidopsis* roots during onset of induced systemic resistance and iron deficiency responses. *Plant J* 309–322.
- Zhang, F., Shen, J., Zhang, J., Zuo, Y., Li, L., Chen, X. (2010) Rhizosphere Processes and Management for Improving Nutrient Use Efficiency and Crop Productivity: Implications for China. *Adv Agron* **107**: 1–32.
- Zhu, J., Winans, S.C. (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1507–12.

Zuckerandl, E., Pauling, L. (1965) Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. *Evol Genes Proteins* 97–166.

Zúñiga, A., Donoso, R.A., Ruiz, D., Ruz, G.A., González, B. (2017) Quorum-Sensing Systems in the Plant Growth-Promoting Bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN Exhibit Cross-Regulation and Are Involved in Biofilm Formation. *Mol Plant-Microbe Interact* **30**: 557–565.

APÊNDICE

Apêndice A. Tabela das proteínas diferencialmente acumuladas em *G. diazotrophicus* em co-cultivo com plantas de *A. thaliana*.

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HSA5_GLU DA	3216,44	4	33751	30658	24268	37284	50837	45318	0,020959	29559	44480	1,50477
RL23_GLU DA	8093,88	6	139687	131733	81037	169607	214910	150527	0,041646	117486	178348	1,518038
A9HIP1_GLU DA	1057,50	4	20030	29121	23621	39279	35962	35730	0,013096	24257	36990	1,524913
A9H0G0_GLU DA	5629,12	27	103430	103637	109496	164855	171322	150346	0,003559	105521	162174	1,536892
RS2_GLU DA	11963,12	16	145855	162126	201375	246785	287118	263141	0,00578	169785	265681	1,564808
A9HDU1_GLU DA	6904,23	14	96699	86520	88299	134062	150014	157743	0,00327	90506	147273	1,627219
A9HAZ8_GLU DA	1454,51	3	17609	27104	28875	46987	29408	43945	0,042063	24529	40113	1,635314
A9HJY0_GLU DA	6080,51	4	78448	77952	72891	121449	140808	119568	0,006466	76430	127275	1,66524
A9H0W3_GLU DA	4170,78	21	49644	53251	63662	103585	81955	93644	0,005323	55519	93062	1,676208
A9HM86_GLU DA	1189,10	11	15017	14252	16064	30672	23946	22012	0,026442	15111	25543	1,690385
A9HS68_GLU DA	2042,15	12	29441	24941	34073	47852	62335	44235	0,019961	29485	51474	1,745766
A9HG Y2_GLU DA	350,53	2	10423	12796	16207	25729	23981	19901	0,006983	13142	23204	1,765599
A9HJS1_GLU DA	769,19	4	16233	24033	19039	41545	32276	30970	0,01234	19768	34930	1,766994
RS8_GLU DA	4884,06	6	40983	56085	52886	99327	104670	67306	0,029438	49985	90434	1,809246
SYH_GLU DA	728,77	6	17239	15922	19311	31650	35415	28424	0,004306	17491	31830	1,81982
A9H324_GLU DA	20323,17	16	206490	201421	227186	389591	384713	411606	4,45E-05	211699	395303	1,86729
ASSY_GLU DA	4334,52	10	47604	48757	77560	116747	81851	126581	0,022283	57974	108393	1,869695
A9HRE6_GLU DA	3042,59	19	57605	49931	60178	104745	126733	101394	0,005821	55905	110957	1,984754

Apêndice A. Cont.

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
RL6_GLU DA	8968,96	9	100504	141566	110728	198537	313664	203194	0,036383	117599	238465	2,027775
A9H397_GLU DA	4303,62	11	54425	55289	60939	132555	99988	114086	0,010449	56884	115543	2,031186
A9HJB6_GLU DA	1282,86	8	35286	29728	27015	68110	77359	47192	0,027681	30676	64220	2,093489
A9HM48_GLU DA	1964,67	20	31255	32070	30820	78349	53647	69424	0,019074	31382	67140	2,139447
A9H7Z5_GLU DA	15678,34	23	142897	156448	150399	299111	349136	339121	0,002422	149915	329123	2,195401
A9HII0_GLU DA	3799,75	5	21302	27185	33254	57053	80297	49686	0,024418	27247	62345	2,288154
A9H108_GLU DA	1745,48	7	20233	20632	16606	36041	50926	45398	0,010891	19157	44122	2,303189
A9H459_GLU DA	11955,40	30	124656	116459	141975	312926	317139	280187	0,000273	127697	303417	2,376073
RL14_GLU DA	2991,02	4	35846	61657	47033	111224	138476	94010	0,009254	48179	114570	2,378015
A9H326_GLU DA	837,57	5	13672	9440	7282	26139	34610	16104	0,044192	10131	25618	2,528567
A9H3M8_GLU DA	1646,31	4	24126	20713	18220	70814	59954	32190	0,04918	21019	54319	2,58425
CLPX_GLU DA	3303,25	11	22460	28007	28501	79673	78050	50943	0,019316	26323	69556	2,642387
ISPG_GLU DA	1571,93	6	15664	14456	18308	40359	69158	35947	0,044092	16143	48488	3,003682
A9GZU8_GLU DA	1962,62	7	22135	15534	23859	64219	69227	53338	0,001978	20509	62262	3,035772
A9HEX0_GLU DA	4423,06	13	17624	25964	32133	99028	98256	69205	0,006275	25240	88829	3,51933
A9HS02_GLU DA	10183,21	31	52378	49494	61013	217005	275051	148193	0,024036	54295	213416	3,930687
A9HCQ6_GLU DA	1087,26	7	15659	13947	1	38277	59074	22590	0,043228	9869	39980	4,051092
A9H932_GLU DA	2074,37	14	22953	23750	18618	101893	90411	75760	0,004907	21774	89355	4,1038
ILVC_GLU DA	2463,85	5	34296	27772	14132	108051	114221	98585	0,000284	25400	106952	4,210741

Apêndice A. Cont.

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9H4G2_GLU DA	506,79	5	7890	7804	8980	41279	44986	18219	0,043057	8225	34828	4,234678
A9HGZ6_GLU DA	908,81	3	1	15642	6990	33897	58341	26102	0,031594	7544	39447	5,228663
ACCD_GLU DA	606,46	2	10275	1	1	22261	27395	14992	0,010947	3426	21549	6,290503
A9HEZ2_GLU DA	10076,64	44	35900	39113	51106	384691	513512	172286	0,043359	42040	356830	8,487956
A9H8N9_GLU DA	550,48	2	4017	1	4924	27687	36679	13266	0,036038	2981	25877	8,682156
A9HNX4_GLU DA	11719,34	38	24032	25433	27299	302511	153657	277740	0,020706	25588	244636	9,560575
A9HFG6_GLU DA	484,38	3	3132	1	1	34093	33410	9295	0,046268	1045	25599	24,50463
A9H DU3_GLU DA	645,33	3	1	1	8847	16303	18456	6203	0,046591	2950	13654	4,62896
A9H3B5_GLU DA	843,70	2	19702	13961	15624	1	1	12058	0,037097	16429	4020	0,244679
A9H9B8_GLU DA	1309,88	2	17970	17088	30873	10146	1	9661	0,027506	21977	6603	0,300438
A5YJ14_GLU DA	38029,39	3	206394	210724	344955	134666	122269	1	0,027394	254025	85645	0,337153
A9HB99_GLU DA	10074,54	4	239019	213334	197292	114853	58842	114840	0,004333	216548	96178	0,444143
A9HPF6_GLU DA	2838,53	9	102858	83279	51665	26322	40505	41768	0,044899	79267	36198	0,456659
A9H577_GLU DA	4390,16	8	103326	117164	61770	41852	49136	41619	0,046283	94087	44202	0,469805
A9H073_GLU DA	1094,65	4	35485	38427	21563	15381	15695	14945	0,043259	31825	15340	0,48202
A9HRF1_GLU DA	2866,13	5	92502	77862	104364	48643	34085	56833	0,005925	91576	46520	0,507997
A9HPH9_GLU DA	4835,59	5	114740	111393	103259	74452	38617	63537	0,015541	109797	58869	0,536159
A9HNPO_GLU DA	13607,54	18	414442	428026	295712	197710	257442	200834	0,022211	379393	218662	0,576346
A9HK34_GLU DA	34042,72	5	458365	439645	340025	293334	158056	283508	0,021856	412678	244966	0,5936

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HEI5_GLU DA	3273,24	3	48100	41192	34436	27585	27184	22797	0,022752	41243	25855	0,626907
A9H9C0_GLU DA	1497,69	4	45122	46068	47903	33247	27948	26722	0,003277	46364	29305	0,632067
A9HL73_GLU DA	1109,99	13	48410	41792	41805	34662	17908	32540	0,040489	44002	28370	0,644739
A9HPE1_GLU DA	9768,71	13	343361	368298	345479	249603	247211	198858	0,004055	352380	231891	0,65807
A9HFE6_GLU DA	7891,91	26	176755	178263	156326	115743	92127	135829	0,014137	170448	114566	0,672148
PLSX_GLU DA	463,72	2	47133	43365	33894	30287	22300	31539	0,028332	41464	28042	0,676298
A9HK54_GLU DA	1479,33	2	20777	20996	15611	13807	13681	11367	0,027412	19128	12951	0,677094
A9HBZ3_GLU DA	2961,53	9	78132	67514	78994	45995	45330	60981	0,011116	74880	50769	0,677999
A9HK01_GLU DA	6600,33	10	189249	240518	278541	178424	114423	188880	0,048261	236103	160576	0,680109
A9HM21_GLU DA	1561,34	5	31935	26627	30216	16952	26127	20040	0,032958	29593	21040	0,710978
A9HP05_GLU DA	660,24	2	48541	43465	41694	38278	29777	28269	0,017948	44567	32108	0,720451
A9HC06_GLU DA	1777,67	10	44472	48725	46152	34965	27275	38384	0,022672	46450	33541	0,722098
A9HHL8_GLU DA	727,45	5	37287	31321	38045	27281	23560	26626	0,013155	35551	25822	0,726348
A9HGX6_GLU DA	1503,62	8	28993	30626	26543	23734	15747	23959	0,045198	28721	21147	0,736285
A9HKV5_GLU DA	1739,65	11	36294	34772	38081	26387	27357	27003	0,003163	36383	26915	0,73979
A9HM18_GLU DA	3481,89	18	73623	73121	63941	50642	43547	62903	0,033407	70229	52364	0,745623
A9HRF0_GLU DA	2692,44	15	102939	112896	82350	69130	81484	72428	0,046398	99395	74347	0,747997
A9H0A5_GLU DA	1845,80	3	55971	53628	64985	49917	40592	40145	0,018059	58194	43551	0,748378
MTND_GLU DA	2348,02	5	26915	30694	32611	21318	21659	24572	0,012891	30073	22516	0,748711

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HEP2_GLU DA	2595,20	23	121561	112504	101008	83395	67815	100586	0,039897	111691	83932	0,751466
A9HHG0_GLU DA	2383,93	9	56836	58539	66531	48054	38988	50394	0,016472	60635	45812	0,755528
A9H806_GLU DA	685,32	2	17820	15353	16122	10197	13333	14184	0,032643	16432	12571	0,765075
A9HFH1_GLU DA	11018,17	24	365307	371505	300442	255307	255231	304458	0,03163	345752	271665	0,785724
A9HNA5_GLU DA	7602,50	10	194012	170693	196081	167004	122228	157469	0,044532	186929	148900	0,796561
A9H4L1_GLU DA	747,73	9	63404	59442	68280	54392	41691	56363	0,044041	63709	50815	0,797622
A9HHE0_GLU DA	3933,34	16	93341	104680	100014	86501	74995	80007	0,007903	99345	80501	0,810318
A9HRT6_GLU DA	2663,88	6	53159	56422	56907	43346	47123	44590	0,001484	55496	45020	0,811225
A9HL77_GLU DA	9831,35	10	142605	142415	147231	122515	131873	113473	0,023287	144084	122620	0,851036
A9HK15_GLU DA	8024,58	14	274060	266113	289220	240619	237080	249917	0,010037	276464	242539	0,877287
PURA_GLU DA	4591,50	18	72026	74481	80982	98015	84760	91428	0,01713	75830	91401	1,205346
A9HMK2_GLU DA	1039,00	6	22518	19208	20381	24268	27876	22779	0,043766	20703	24975	1,206351
A9HAE9_GLU DA	5482,68	5	47920	57072	56326	63177	64112	72450	0,018477	53772	66580	1,238179
RL1_GLU DA	19995,57	16	298299	290743	281757	350997	395409	347912	0,015383	290266	364773	1,256683
A9HF12_GLU DA	3257,57	13	84859	79194	79509	115118	90053	103982	0,043305	81187	103051	1,269297
KAD_GLU DA	7274,62	11	69215	68726	85017	98821	94235	94277	0,023961	74319	95778	1,28873
A9HCQ4_GLU DA	1184,46	8	30061	34649	40743	50587	41626	45203	0,029814	35151	45805	1,303113
EFTU_GLU DA	24595,95	23	622181	640780	579046	805589	758519	858390	0,003902	614002	807500	1,315141
A9HMA2_GLU DA	4022,12	24	72789	65537	54825	98718	76565	78767	0,043584	64384	84683	1,31529

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
RL4_GLU DA	8650,71	9	129007	125541	126849	164352	187755	162100	0,015522	127132	171402	1,34822
A9HRW6_GLU DA	2091,10	16	37563	32758	33104	44771	53917	43712	0,019533	34475	47467	1,37684
A9H0A8_GLU DA	4735,42	11	93743	69468	102528	123995	112777	133586	0,025226	88580	123452	1,39369
A9HA48_GLU DA	3710,43	10	42404	33778	40091	56505	50990	54798	0,005658	38758	54097	1,395779
A9HNC1_GLU DA	1258,06	10	35479	31582	31377	31449	25846	27159	0,050124	32813	28151	0,857931
A9H9C1_GLU DA	1447,02	10	3779	4256	3457	62602	82986	22175	0,050132	3830	55921	14,59939
RL25_GLU DA	16126,46	13	359967	350061	346563	401365	416224	365072	0,050577	352197	394220	1,119317
A9HB05_GLU DA	31018,29	12	630651	676438	685677	627894	603531	627484	0,051454	664255	619636	0,932829
A9H6E0_GLU DA	2674,33	6	49713	44242	56444	61561	57332	76013	0,051531	50133	64969	1,295933
A9HJ89_GLU DA	2478,14	21	60650	57646	66605	53232	36691	52558	0,051591	61634	47494	0,770579
A9HPB9_GLU DA	15517,36	14	400155	404665	349297	266749	363655	301850	0,052117	384706	310751	0,807764
A9HRV4_GLU DA	4160,24	9	91944	93343	127060	69412	80776	69943	0,052205	104116	73377	0,704765
A9HFJ7_GLU DA	6815,86	18	142522	150524	118531	173619	148185	167797	0,052768	137192	163200	1,189571
A9HJT7_GLU DA	548,58	2	77857	74627	52645	28782	51167	54671	0,053429	68376	44873	0,65627
A9HIR3_GLU DA	1389,50	3	65044	47308	44440	41857	24646	38219	0,053847	52264	34907	0,667903
A9H381_GLU DA	1071,30	9	35363	33268	25725	21948	27505	22779	0,055863	31452	24078	0,765533
A9HB04_GLU DA	9168,71	17	221509	212741	176807	149251	128409	190980	0,056436	203686	156214	0,766934
A9HIQ1_GLU DA	6425,66	6	132892	134994	126516	90487	121307	111824	0,056686	131467	107873	0,820531
A9HSY7_GLU DA	498,34	2	28127	28110	24712	13824	1	20313	0,058229	26983	11379	0,421728

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
RS19_GLUDA	11013,64	4	91210	95760	131423	159272	118078	145867	0,058914	106131	141072	1,329226
A9HSC5_GLUDA	7172,32	9	55182	50922	76205	79153	71228	97568	0,05931	60770	82650	1,360046
A9HRD5_GLUDA	3655,27	8	73755	73765	54400	43243	49900	60080	0,060352	67306	51074	0,758836
A9HFX5_GLUDA	3025,13	9	40226	38564	47845	36790	32160	36969	0,060655	42212	35306	0,83641
A9H0U0_GLUDA	4229,53	3	113993	139775	84690	61062	90483	72050	0,061151	112819	74532	0,660629
A9HBU3_GLUDA	2345,21	8	33578	31589	24895	47067	32851	52562	0,061422	30021	44160	1,470979
A9HQQ2_GLUDA	937,88	5	22951	23254	15248	27135	25092	28282	0,062052	20484	26836	1,310085
A9HLE8_GLUDA	710,82	8	9901	7541	8650	58054	16176	47555	0,063122	8697	40595	4,667565
A9H1P7_GLUDA	2084,48	27	57518	57615	81051	52500	28294	51506	0,064103	65395	44100	0,674365
RL31_GLUDA	19562,45	5	130407	163602	261511	84584	34590	145954	0,066245	185174	88376	0,477262
ATPD_GLUDA	5526,72	8	51161	46837	52826	51740	57953	55473	0,066416	50275	55055	1,095084
A9H8C0_GLUDA	7769,63	15	119641	113851	125351	160553	137379	205566	0,067051	119614	167833	1,403116
A9HA51_GLUDA	611,21	3	26281	23586	1	29329	51379	30878	0,067804	16623	37195	2,237627
A9H8C2_GLUDA	465,03	2	10611	12338	13269	14273	15688	21555	0,069133	12073	17172	1,422406
A9HKL6_GLUDA	2449,25	9	35347	36138	35447	28277	29515	34871	0,070557	35644	30887	0,866548
A9HEU1_GLUDA	1370,26	10	61433	62961	42894	38717	32444	50237	0,070972	55763	40466	0,725681
A9HK29_GLUDA	575,15	5	30765	28264	26590	37582	35279	29264	0,071595	28539	34042	1,192795
A9HSH5_GLUDA	3966,23	20	115236	114673	110625	101832	68080	97662	0,073437	113511	89191	0,785749
A9HAM5_GLUDA	1072,61	5	25302	29601	42426	19180	16293	27582	0,074115	32443	21018	0,647846

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HDE6_GLU DA	8397,64	15	102180	100714	93399	104347	107130	123452	0,075282	98764	111643	1,130397
A9H320_GLU DA	3087,37	19	5674	5999	3724	79376	117764	17391	0,075578	5133	71510	13,93239
A9H8M9_GLU DA	1315,99	13	32834	36379	32869	15550	19925	32623	0,075775	34028	22699	0,667077
A9HKF2_GLU DA	564,51	7	30349	29754	21883	21907	18044	24297	0,078133	27329	21416	0,783644
A9HHF0_GLU DA	1318,51	11	46204	54519	65069	48856	16332	39649	0,080185	55264	34946	0,632341
A9HEE6_GLU DA	7167,35	12	101488	113986	151994	82590	96803	92594	0,081847	122489	90662	0,740165
A9H5B4_GLU DA	720,52	3	33446	35361	7114	1	11320	8162	0,082404	25307	6494	0,256621
A9H801_GLU DA	607,02	4	24877	22023	16069	13415	17556	16007	0,082503	20990	15660	0,746064
A9HE94_GLU DA	619,00	4	1	1	1	8855	21278	3507	0,08345	1	11213	11213,44
A9HSE9_GLU DA	10404,64	16	222741	200745	198129	158334	144009	205537	0,083671	207205	169293	0,817032
A9HHY3_GLU DA	15683,53	26	322138	345411	244989	248508	251364	224706	0,083868	304179	241526	0,794026
A9HJG8_GLU DA	32036,04	7	223277	246375	254128	206198	146041	225400	0,084045	241260	192546	0,798086
CH602_GLU DA	14463,91	32	181619	278431	318279	191702	153238	182925	0,084175	259443	175955	0,678203
DNAK_GLU DA	25569,58	42	562851	574974	538962	555559	486871	513578	0,085973	558929	518669	0,92797
A9H4T2_GLU DA	2810,37	6	27950	38016	52538	25595	22291	26532	0,086062	39501	24806	0,627982
A9HIP8_GLU DA	1190,14	6	12730	15270	9532	14853	19299	14547	0,087762	12511	16233	1,297519
A9GZZ4_GLU DA	5533,55	13	45783	45791	43201	117540	198064	60920	0,09003	44925	125508	2,793718
A9HLY3_GLU DA	9094,36	14	169141	183269	153469	145844	159978	149580	0,090167	168626	151801	0,900219
MURC_GLU DA	469,23	2	27329	35136	28261	43260	32311	35291	0,090827	30242	36954	1,22195

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HLF6_GLU DA	3163,08	10	69544	72610	92025	92819	84799	97836	0,090836	78060	91818	1,176254
A9HAQ3_GLU DA	1367,20	5	64207	59183	89583	49288	48942	59975	0,091305	70991	52735	0,74284
A9HBK9_GLU DA	1069,42	10	31696	31841	46338	26522	25832	28839	0,092131	36625	27064	0,738959
A9HF70_GLU DA	8050,85	8	378848	437917	400346	272246	355287	391689	0,097596	405704	339740	0,837411
A9H3X9_GLU DA	5674,24	8	140269	147078	146587	120964	111593	145058	0,097973	144645	125872	0,870212
A9H165_GLU DA	1119,71	13	31757	45774	43774	34550	27361	34816	0,098365	40435	32242	0,797379
A9GZJ1_GLU DA	1098,25	2	27577	26160	29719	20455	1	22377	0,098508	27819	14278	0,513238
A9HPD7_GLU DA	2768,19	12	171106	138785	88571	81889	94623	86234	0,098914	132820	87582	0,659403
A9HK81_GLU DA	1228,86	5	13363	24406	23452	25256	23910	33420	0,099912	20407	27529	1,348971
A9HLJ4_GLU DA	3349,50	18	49859	32339	79063	87402	58349	98270	0,101727	53754	81340	1,51321
A9HB78_GLU DA	2548,52	8	78954	91901	87586	86933	69892	68716	0,102221	86147	75180	0,872699
A9HIX3_GLU DA	4796,64	8	89337	93212	134151	83820	68769	86546	0,102775	105566	79712	0,755086
A9HLQ7_GLU DA	734,26	6	26569	27955	32805	23332	14964	28181	0,103568	29110	22159	0,761215
FABZ_GLU DA	348,16	2	1	6308	8585	8686	7902	20272	0,105109	4965	12287	2,474789
A9HAF3_GLU DA	1356,02	6	18343	16843	22455	24395	20461	22040	0,106227	19214	22299	1,160568
A9H988_GLU DA	1170,49	4	19088	18110	23298	31676	64440	27279	0,106941	20165	41132	2,039722
A9HB14_GLU DA	851,88	11	52925	51414	28602	36199	23304	31823	0,107047	44314	30442	0,686964
A9H246_GLU DA	1686,22	9	29802	27189	33209	102302	24675	120250	0,107945	30067	82409	2,740867
A9HRY4_GLU DA	385,36	2	21375	24875	29764	21820	11194	22949	0,110055	25338	18654	0,736224

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HET1_GLUDA	2526,34	17	124101	91742	61155	53750	68658	59859	0,110116	92333	60755	0,658004
A9HRP5_GLUDA	5294,72	15	113963	100739	123507	123179	124610	125125	0,110525	112736	124305	1,102613
A9HJX0_GLUDA	591,17	3	20912	20610	24254	19898	10119	19378	0,110752	21925	16465	0,750967
A9HM70_GLUDA	22006,13	6	306780	355297	316425	348641	337782	404392	0,11108	326167	363605	1,114779
A9HLJ9_GLUDA	3224,06	20	98336	89580	113002	95782	63248	89270	0,114133	100306	82766	0,825137
A9HH12_GLUDA	1311,00	7	37177	31299	43396	33413	31660	29152	0,114205	37291	31408	0,842246
A9HPC3_GLUDA	1883,00	9	81816	73340	49080	53281	47176	55167	0,118268	68079	51875	0,76198
A9H0C0_GLUDA	20576,23	9	122440	122214	176908	147911	192290	175285	0,120292	140521	171829	1,222798
A9HMM0_GLUDA	1031,12	6	45838	52325	57885	53053	37798	41081	0,121504	52016	43977	0,845453
A9HFD5_GLUDA	9088,36	11	146948	132625	189238	101854	140982	138024	0,121765	156270	126953	0,812395
A9HRU1_GLUDA	1598,77	3	28533	32745	35646	49138	31555	40367	0,124968	32308	40353	1,249019
A9H3E8_GLUDA	609,47	2	50604	55532	39962	48069	34789	39020	0,126887	48699	40626	0,834221
A9HKU8_GLUDA	19141,05	12	199965	211034	249272	254697	218318	286148	0,128284	220090	253054	1,149775
A9HJ15_GLUDA	6071,02	13	96187	83199	86464	91117	72517	72121	0,129248	88617	78585	0,886797
RL18_GLUDA	1127,63	2	16109	16452	35961	25353	40327	34553	0,130273	22841	33411	1,462789
A9HI15_GLUDA	4328,02	4	94445	68653	52418	55059	44982	59155	0,130541	71839	53065	0,738677
TRPA_GLUDA	1913,15	4	29146	26341	25771	25323	26704	24128	0,130917	27086	25385	0,937186
A9HEQ4_GLUDA	570,22	2	7901	8062	14409	8946	17137	19891	0,133115	10124	15324	1,513647

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HEF9_GLU DA	855,82	6	27533	26630	29595	26051	27855	22309	0,133126	27919	25405	0,909939
ACCA_GLU DA	3577,23	9	110153	99712	116404	104900	84016	104250	0,133343	108756	97722	0,898543
A9HF65_GLU DA	2364,26	7	38218	48852	57412	34004	28205	49555	0,133865	48160	37255	0,773553
A9HS56_GLU DA	1926,34	9	51698	38384	48965	41376	38998	40344	0,134831	46349	40239	0,868181
A9HKV0_GLU DA	1865,93	14	50887	39407	41837	41464	57631	68956	0,1354	44044	56017	1,271852
A9HPK6_GLU DA	2025,44	5	34645	35677	55196	39250	25025	30187	0,135695	41840	31488	0,752579
A9HAE5_GLU DA	5520,68	15	79258	96504	100420	78917	48081	91165	0,136027	92061	72721	0,789924
A9H9X2_GLU DA	3472,17	10	93725	94205	123413	79636	62960	106802	0,136743	103781	83133	0,801039
A9HHS9_GLU DA	1178,41	4	58768	33234	31654	26382	23686	34513	0,136923	41219	28194	0,684001
A9HHD1_GLU DA	4498,17	4	63413	44447	74231	53392	33793	53126	0,137027	60697	46770	0,770544
A9HBK6_GLU DA	2665,82	4	36619	34351	34377	24005	29509	36223	0,138297	35116	29912	0,851823
A9H338_GLU DA	4440,82	7	117131	43380	58250	38760	32471	48191	0,138641	72921	39807	0,545895
A9H3Z8_GLU DA	1578,02	2	9894	10549	13952	8748	9007	10997	0,139847	11465	9584	0,835948
A9H5P1_GLU DA	2718,53	8	71020	71164	23266	78636	58610	108683	0,141159	55150	81976	1,486425
A9H282_GLU DA	625,20	4	22044	18841	25111	22588	25231	26192	0,143865	21999	24670	1,121448
A9H0V0_GLU DA	557,72	2	36449	1	17141	35012	36338	27181	0,144266	17864	32843	1,838555
AZOR_GLU DA	2467,58	4	39644	23973	48356	24812	25676	31131	0,144838	37324	27206	0,728917
A9HRT3_GLU DA	3560,35	17	86238	107577	66053	102538	90374	123323	0,145789	86623	105411	1,216901
RPOA_GLU DA	25067,62	20	395405	376923	422140	380902	377097	380990	0,146866	398156	379663	0,953553

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HA92_GLU DA	30565,09	4	240178	244681	301280	308521	288944	272661	0,148019	262046	290042	1,106833
ATPB_GLU DA	23125,04	28	358640	341367	436313	367765	304454	336833	0,148666	378773	336351	0,888
A9HD05_GLU DA	1301,21	5	27503	26557	38359	28101	27355	20926	0,153123	30806	25460	0,826466
A9HH94_GLU DA	10008,33	5	49815	50132	21376	60305	38260	114421	0,155402	40441	70995	1,755531
A9HCQ2_GLU DA	5516,58	11	191127	155735	162697	152269	119924	172007	0,156923	169853	148067	0,871735
A9HHE7_GLU DA	8308,48	6	60407	58312	56885	69262	55001	74806	0,157555	58534	66356	1,133629
A9H1Q0_GLU DA	7080,98	7	91235	89519	128171	141341	112901	110033	0,159227	102975	121425	1,179171
PSD_GLU DA	721,36	2	29068	31079	1	34843	39755	25355	0,159653	20049	33318	1,661798
A9HIN7_GLU DA	816,34	3	1	6915	4314	15460	1	17646	0,159892	3743	11036	2,948041
A9HAA2_GLU DA	2136,61	5	55347	44907	42405	42575	62602	80796	0,160588	47553	61991	1,303624
A9HEH3_GLU DA	11224,30	20	338979	320850	279290	262595	284107	314438	0,163384	313040	287047	0,916966
A9H1J4_GLU DA	2101,75	10	70987	75029	58080	61896	51842	67455	0,164292	68032	60398	0,887786
A9H599_GLU DA	308,57	2	19542	32941	3607	6838	9225	7697	0,165669	18697	7920	0,423605
A9H0K4_GLU DA	7135,35	18	147346	150883	166495	125705	115996	165606	0,168256	154908	135769	0,876451
A9HJA0_GLU DA	2300,52	6	36285	32684	37783	35710	32537	32322	0,168709	35584	33523	0,94209
A9H8H8_GLU DA	4482,90	4	46996	51320	59625	51628	80308	58587	0,169714	52647	63508	1,206299
A9HT61_GLU DA	2547,46	3	42608	37961	55112	41001	36535	39098	0,170195	45227	38878	0,859625
TIG_GLU DA	27767,47	32	431991	434234	596591	459325	355861	438401	0,172123	487605	417863	0,856969
A9H9T7_GLU DA	1024,28	5	32712	44863	12600	44400	31951	49558	0,173082	30058	41970	1,396283

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HM56_GLU DA	3545,62	7	63579	67812	79759	62635	14623	70330	0,174096	70383	49196	0,69897
A9H6Y6_GLU DA	493,31	2	20517	20906	8472	13240	6937	14290	0,174456	16631	11489	0,690801
A9HM62_GLU DA	2665,89	5	38712	85068	68490	64074	103813	80712	0,176159	64090	82866	1,29297
A9HM30_GLU DA	12815,05	19	306230	270244	311164	304508	301784	332481	0,17804	295879	312924	1,057609
A9H7E6_GLU DA	3457,55	6	78793	80298	70759	67523	66362	79598	0,178399	76617	71161	0,92879
RL15_GLU DA	11325,63	4	133343	141819	147571	185293	148208	139338	0,178929	140911	157613	1,118531
A9HDN9_GLU DA	3713,72	12	122411	97393	103598	90112	73728	114697	0,179111	107801	92846	0,861274
A9H435_GLU DA	891,47	3	14356	10567	12687	13376	15230	13063	0,181905	12537	13889	1,107898
A9HPE7_GLU DA	4001,29	9	36944	43875	73311	63198	51996	83471	0,182284	51377	66222	1,288944
PNP_GLU DA	13286,82	34	216122	217657	196974	266854	184034	295123	0,184109	210251	248670	1,182732
A9HKX7_GLU DA	589,38	2	20093	17317	15246	16959	15233	15570	0,184342	17552	15921	0,907056
A9HSH2_GLU DA	6029,52	6	96608	101835	79780	71217	68077	100875	0,186616	92741	80057	0,863229
A9HRD7_GLU DA	3715,98	9	98780	87807	89695	71752	43477	102776	0,187191	92094	72668	0,789066
A9HJ42_GLU DA	1033,18	5	22342	18036	38236	23269	15242	19347	0,190601	26205	19286	0,735981
A9H4V7_GLU DA	3398,42	16	71292	70604	103866	94766	92615	94732	0,192295	81921	94038	1,147913
A9HPG2_GLU DA	6879,68	10	139493	144095	125212	114561	147674	95977	0,192533	136267	119404	0,87625
A9HH55_GLU DA	7125,60	7	84131	93069	97724	101800	89464	206967	0,192587	91641	132744	1,44851
A9HJR7_GLU DA	1333,14	5	44702	49606	58032	53931	36807	42983	0,193153	50780	44574	0,877785
RPOZ_GLU DA	6377,02	2	94230	142817	212232	97091	106876	132483	0,19437	149759	112150	0,748869

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
DAPA_GLU DA	4996,53	13	74428	82967	84137	84711	68121	70923	0,194379	80510	74585	0,9264
A9HM79_GLU DA	5601,80	2	98549	102191	140118	115210	130441	140784	0,194481	113619	128811	1,133711
A9HA40_GLU DA	1431,00	12	40648	39839	166366	38655	20747	51734	0,197535	82284	37045	0,450211
A9HRE0_GLU DA	2263,69	7	75044	64892	104773	75079	50842	76640	0,198078	81569	67520	0,827761
A9H549_GLU DA	12088,71	27	288394	279662	257723	347820	294640	263383	0,198367	275260	301948	1,096956
A9HB09_GLU DA	2532,82	5	44999	49036	61846	48566	24655	52979	0,198935	51960	42067	0,809595
A9HFV9_GLU DA	543,85	2	23275	17184	20982	36867	42404	12011	0,199563	20480	30427	1,485685
A9HKF0_GLU DA	1172,59	5	64326	52675	34891	38103	35076	50510	0,20237	50631	41230	0,814322
A9HL14_GLU DA	12063,78	11	339882	336240	332234	354068	323852	398935	0,202561	336118	358952	1,067932
A9HBG7_GLU DA	587,90	2	13447	11920	1	54265	1	20846	0,202964	8456	25037	2,960876
A9HM51_GLU DA	3855,60	14	76869	88258	73043	60298	56023	88853	0,203436	79390	68391	0,861463
A9GZP4_GLU DA	6138,00	9	176491	451732	175038	227989	388289	525308	0,210573	267753	380529	1,42119
A9H134_GLU DA	1676,08	6	64895	60506	34177	56167	63609	69204	0,210679	53193	62993	1,184248
A9HL93_GLU DA	977,92	2	1	1	24552	1	1	1	0,211325	8185	1	0,000122
A9H070_GLU DA	2112,95	12	67131	64597	62039	62302	47293	66654	0,213081	64589	58750	0,909594
A9HLJ6_GLU DA	816,50	4	52812	53267	37020	33408	51863	37314	0,213778	47699	40862	0,856651
A9HBE7_GLU DA	1251,16	4	23467	25949	17291	19954	31175	26604	0,214266	22236	25911	1,165296
A9HK46_GLU DA	43950,11	9	624357	602612	601471	624022	505530	594300	0,215908	609480	574617	0,942799

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HHP7_GLU DA	2617,27	11	83345	79782	93742	65178	81816	88316	0,216476	85623	78437	0,916072
RIMP_GLU DA	7672,37	8	57247	48549	77033	49171	54316	54807	0,217765	60943	52765	0,865802
A9H4A8_GLU DA	987,96	4	19890	13574	18667	13790	17036	15551	0,220125	17377	15459	0,889632
A9HFN2_GLU DA	4442,71	6	32174	39138	73962	42014	31918	34197	0,220531	48424	36043	0,744315
A9HJB2_GLU DA	2747,81	14	101643	94002	68681	95013	44618	78276	0,220755	88109	72636	0,824389
A9HKE7_GLU DA	1238,35	8	27083	26766	28645	23708	15305	30788	0,222316	27498	23267	0,846134
A9HRI9_GLU DA	2989,28	15	55258	54327	95325	60111	32857	68073	0,222932	68303	53680	0,785911
A9H332_GLU DA	5334,91	10	111391	114024	109499	90634	100482	119841	0,225444	111638	103653	0,928469
A9HIG8_GLU DA	1345,01	5	21893	23943	26307	24310	15028	24085	0,225927	24047	21141	0,879128
A9HIK8_GLU DA	3159,34	7	50209	44263	28422	64362	34423	50643	0,231494	40965	49810	1,215918
A9HM98_GLU DA	2297,89	9	51641	53615	44340	86271	30547	80597	0,231926	49866	65805	1,319641
A9HI27_GLU DA	3501,06	9	62859	46945	64294	50284	18993	66515	0,232843	58033	45264	0,779977
A9HF00_GLU DA	705,89	2	41044	35965	40880	38077	41483	24914	0,237588	39296	34825	0,886202
A9HIS0_GLU DA	8096,97	8	108683	104707	125308	93423	86359	125641	0,237669	112899	101808	0,901759
A9H4P1_GLU DA	3205,68	9	56232	59189	52998	50511	37518	61995	0,240102	56139	50008	0,89078
A9H MV6_GLU DA	1050,99	8	65517	64457	52926	58174	57001	57389	0,241555	60967	57521	0,943486
A9H2N2_GLU DA	1287,51	5	50481	53668	53905	55759	31757	51614	0,242498	52685	46376	0,880265
A9H7L9_GLU DA	1896,47	10	36865	63308	73865	53692	45032	47461	0,245131	58013	48728	0,839959
A9HJC5_GLU DA	38203,03	5	327655	334916	331201	355925	317582	350172	0,246443	331257	341227	1,030095

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
RS6_GLU DA	6463,84	4	58201	62040	77564	86918	55074	82467	0,247419	65935	74820	1,134745
FOLD_GLU DA	1842,54	6	30911	28968	36532	29530	30166	31112	0,249392	32137	30269	0,941891
A9HI24_GLU DA	838,35	2	37714	30536	53721	31840	42539	29602	0,250557	40657	34660	0,852509
A9HMD4_GLU DA	4289,21	5	58554	54698	80733	84257	82783	54753	0,251385	64662	73931	1,143351
ATPG_GLU DA	2738,09	9	40289	42868	53603	44008	60458	46746	0,251418	45587	50404	1,105679
A9H3U2_GLU DA	1896,41	9	65793	59546	57058	55526	48580	65674	0,253517	60799	56593	0,930828
A9HBZ6_GLU DA	5180,77	3	57762	41856	46473	54553	38643	36918	0,254582	48697	43371	0,890632
A9H4E8_GLU DA	2695,91	5	74467	73096	106795	85421	63112	77431	0,254718	84786	75321	0,888368
A9HKW8_GLU DA	3916,06	6	69598	62173	97078	60230	46030	87590	0,255616	76283	64617	0,847064
A9HCX4_GLU DA	3241,62	5	31300	34772	48013	35651	48047	44004	0,256375	38029	42567	1,119352
A9HDF5_GLU DA	3493,53	4	33884	43834	25032	35918	22135	30229	0,258669	34250	29427	0,859195
A9HJ44_GLU DA	1560,40	11	57017	38613	68246	44450	27715	63223	0,259487	54625	45129	0,826163
A9H983_GLU DA	337,99	2	1	12369	17645	17697	12986	11705	0,260289	10005	14129	1,412251
A9H3A3_GLU DA	6976,38	16	121575	137790	161782	116419	82924	164386	0,260848	140382	121243	0,86366
ARGB_GLU DA	2148,18	8	27506	40292	46016	36488	37996	57774	0,261921	37938	44086	1,16206
A9HRR8_GLU DA	4754,68	16	115001	120573	152241	129844	122623	181765	0,26333	129272	144744	1,119686
A9HKR5_GLU DA	5734,64	12	63409	61658	94659	70720	44137	75238	0,266193	73242	63365	0,865141
A9HEL6_GLU DA	2557,20	15	59601	59283	52463	67369	44364	86538	0,270141	57116	66090	1,157131
A9HFC1_GLU DA	3301,82	4	67762	65755	67057	63363	117527	60053	0,27261	66858	80314	1,201267

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9H466_GLU DA	2287,07	14	88705	83047	43921	55865	47210	274532	0,272711	71891	125869	1,750825
A9H2M9_GLU DA	2775,37	7	57192	43555	30833	53887	27955	89870	0,273487	43860	57237	1,304999
A9HM16_GLU DA	4068,10	13	93693	97071	99653	88214	101343	92429	0,279128	96806	93995	0,970967
A9H995_GLU DA	10920,20	12	151593	169085	200631	158318	163691	169284	0,280347	173770	163764	0,942423
A9HFV5_GLU DA	7995,05	31	323266	352993	312331	308021	271967	355737	0,281572	329530	311908	0,946525
A9HIA3_GLU DA	1083,92	8	22566	32707	43111	24230	25944	35236	0,284939	32795	28470	0,868132
RL11_GLU DA	22286,92	13	395200	409272	439990	417170	394835	498204	0,285362	414820	436736	1,052832
A9HE22_GLU DA	675,51	3	22928	27363	18169	10851	13728	30933	0,287895	22820	18504	0,810853
A9HPF0_GLU DA	10580,89	11	241875	237682	175938	195955	197329	218943	0,288478	218498	204075	0,933992
ENO_GLU DA	24885,39	22	432612	413535	372060	413558	393747	458547	0,288711	406069	421951	1,039111
A9HHL5_GLU DA	1129,53	4	30833	24765	24191	21665	28191	24938	0,294777	26596	24931	0,937397
RL7_GLU DA	38265,37	5	256415	393855	427085	423275	245294	623030	0,299085	359118	430533	1,198862
A9HFLO_GLU DA	941,16	11	32357	43836	47849	40973	33243	40669	0,301513	41347	38295	0,926184
A9HEX3_GLU DA	6297,88	5	120126	119386	47442	94165	146913	96040	0,30296	95651	112373	1,174814
EFP_GLU DA	5501,27	2	192885	103996	114463	114543	124749	121653	0,305358	137114	120315	0,877478
A9HH48_GLU DA	361,79	2	17035	15944	15909	17558	1	20038	0,305693	16296	12532	0,769033
A9H181_GLU DA	470,50	5	24492	25462	20554	18970	16955	28159	0,306257	23503	21361	0,90889
A9H7G6_GLU DA	8036,52	10	78278	81691	95806	72843	92802	110833	0,306362	85258	92159	1,080941
A9HK12_GLU DA	7714,38	26	257303	267135	255961	257096	248036	309728	0,306526	260133	271620	1,044159

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
HFQ_GLU DA	12983,29	7	104009	95897	113405	98898	93922	109322	0,306624	104437	100714	0,964352
METK_GLU DA	12607,16	22	232507	280358	294901	284093	234572	356092	0,307477	269255	291586	1,082934
A9HFT8_GLU DA	6138,89	16	91361	95759	89119	85104	86217	131908	0,30979	92079	101076	1,097708
A9HMZ5_GLU DA	725,41	2	13508	15199	23570	20950	16971	19781	0,315221	17426	19234	1,103765
A9HC31_GLU DA	1762,23	5	11550	13488	13543	12590	11652	17398	0,317268	12860	13880	1,079257
A9HHP4_GLU DA	1381,95	7	56320	64283	40990	70189	60267	45759	0,32337	53864	58738	1,090487
A9HBM4_GLU DA	2836,84	13	44760	42897	65255	59114	39333	72212	0,324125	50970	56886	1,116065
A9HI52_GLU DA	3138,46	7	33719	56394	60008	59792	34030	78608	0,328489	50040	57477	1,14861
A9H9W2_GLU DA	1008,04	5	24668	17830	18925	15872	22286	19217	0,328618	20474	19125	0,934106
A9H317_GLU DA	19952,19	36	434869	478454	504160	477153	353669	510049	0,32941	472494	446957	0,945953
A9H1K4_GLU DA	565,49	2	27108	12527	14064	17410	19668	8793	0,336334	17899	15290	0,854231
RL10_GLU DA	34011,68	11	388594	382673	340055	359721	389907	386297	0,338394	370441	378641	1,022137
A9HH05_GLU DA	1539,15	7	38764	50378	30964	26631	41960	41452	0,340171	40035	36681	0,916219
THIG_GLU DA	1412,08	6	14076	15133	23886	15249	14843	31355	0,342616	17698	20482	1,157291
A9HI07_GLU DA	5076,88	7	118233	85697	93665	85165	96226	101594	0,343306	99198	94328	0,950905
A9H4G5_GLU DA	8866,39	6	207963	235440	232226	232953	184375	309777	0,344133	225210	242369	1,076191
A9H3Y4_GLU DA	1233,72	6	31167	29388	39606	34021	35473	35001	0,346409	33387	34832	1,043267
A9HAP4_GLU DA	5233,49	5	167378	172943	127759	147932	167888	173087	0,347921	156027	162969	1,044494
A9HT68_GLU DA	9616,33	8	72606	73413	94985	78099	69097	83034	0,348156	80335	76743	0,955297

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9H3C6_GLU DA	922,45	4	19375	17316	16001	17093	1	25516	0,349623	17564	14203	0,808678
A9HDC8_GLU DA	872,30	7	24076	20544	23810	23251	14971	25778	0,351779	22810	21333	0,935274
ATPA_GLU DA	22091,75	30	354971	372014	344930	348809	322778	378084	0,353022	357305	349890	0,979248
A9H2A4_GLU DA	3990,63	8	67592	63852	75379	68780	79160	65371	0,353977	68941	71104	1,03137
A9H6A5_GLU DA	11035,31	14	153441	150246	174793	137982	168022	195049	0,354242	159493	167018	1,047175
A9HEA5_GLU DA	3677,90	9	125743	119567	122517	98675	118486	183768	0,354929	122609	133643	1,089994
A9HBF6_GLU DA	1040,10	6	35420	50533	61307	34409	50225	51490	0,356031	49086	45375	0,924381
A9H0U5_GLU DA	2534,02	7	89036	100968	104977	89125	74688	115408	0,356792	98327	93074	0,946579
A9HL44_GLU DA	341,36	2	9438	1	6951	4518	1	7638	0,357692	5463	4052	0,741702
A9HJ94_GLU DA	668,96	2	1	1	12193	6344	1	12049	0,359705	4065	6131	1,508385
AHPD_GLU DA	6980,74	7	69738	65416	80519	59797	51369	89626	0,360389	71891	66931	0,931005
A9H3U0_GLU DA	923,15	7	25596	23350	21535	16813	21515	28057	0,362271	23494	22128	0,941871
A9HIU7_GLU DA	3200,11	14	48139	72385	60674	59342	42557	100972	0,364308	60399	67624	1,119607
NUOB2_GLU DA	3849,32	4	33535	35793	25770	22457	37153	43351	0,365028	31699	34320	1,082687
A9HRX3_GLU DA	3893,29	10	52172	63930	65699	44844	53576	72824	0,365091	60600	57081	0,941926
RRF_GLU DA	9105,32	11	128464	142068	189472	115027	195664	115336	0,373876	153335	142009	0,926137
A9H335_GLU DA	8259,89	9	151264	158362	157793	147868	142857	194327	0,377607	155806	161684	1,037725
A9H0L0_GLU DA	944,81	5	18002	19292	36434	14237	25303	27008	0,378649	24576	22183	0,902607
A9HS93_GLU DA	2179,47	7	42544	45546	83255	57010	43913	56667	0,383031	57115	52530	0,919718

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9H090_GLU DA	2897,88	21	83271	68639	99345	70585	59587	105471	0,384932	83752	78547	0,937861
OMPC_GLU DA	19558,81	17	750299	745990	641876	713776	624955	877876	0,385974	712722	738869	1,036686
A9HFA7_GLU DA	5874,71	7	106287	102545	98610	104945	92255	117500	0,388331	102481	104900	1,023608
A9HM07_GLU DA	1380,16	2	47607	41684	19959	30093	37453	33504	0,389694	36417	33683	0,924947
DCUP_GLU DA	1988,70	8	38901	40550	40706	35403	37575	44568	0,392488	40052	39182	0,978265
A9HF96_GLU DA	3804,50	10	126809	133324	134636	105900	84843	177906	0,393447	131590	122883	0,933833
A9HLU2_GLU DA	2260,44	10	72430	67651	62149	64231	51149	79328	0,397199	67410	64902	0,962797
A9HS52_GLU DA	1345,31	6	26703	45154	32320	46595	29630	34124	0,398141	34726	36783	1,059252
A9HRY6_GLU DA	1896,28	8	27364	29161	31540	36142	29923	24961	0,398334	29355	30342	1,033615
A9HBG1_GLU DA	1534,15	6	24159	25379	29366	33458	12890	39461	0,401786	26301	28603	1,08752
A9HRQ5_GLU DA	15029,59	16	270066	278193	297172	283669	230714	362718	0,405527	281810	292367	1,037459
A9H8D6_GLU DA	44334,10	17	471631	474215	540590	441389	459936	553341	0,406208	495479	484888	0,978626
A9HDU6_GLU DA	2159,72	11	78881	87047	61723	70023	70479	95676	0,406944	75884	78726	1,037453
A9HJV0_GLU DA	4713,23	9	91373	82306	79322	79696	79862	99075	0,407484	84334	86211	1,022259
A9H329_GLU DA	1042,54	5	32233	21214	32462	29188	27282	26470	0,408455	28636	27647	0,965436
A9HN12_GLU DA	3102,00	19	90640	108325	131057	134057	87157	122307	0,409184	110007	114507	1,040906
A9HRU7_GLU DA	54597,21	5	454996	433850	402367	470828	268993	495478	0,410699	430405	411767	0,956697
A9HMM2_GLU DA	1699,55	3	48080	46162	1	34367	20221	27576	0,412416	31414	27388	0,871824

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9GZI8_GLU DA	2043,40	11	52168	48455	60959	46934	53787	65478	0,413741	53861	55400	1,028576
A9HM29_GLU DA	29860,08	20	646421	649256	501337	581573	578351	601208	0,415145	599005	587044	0,980032
A9HIY5_GLU DA	4922,67	8	61331	74351	84496	100529	46887	84676	0,417225	73393	77364	1,054111
A9GZR4_GLU DA	1002,10	6	25840	24601	21319	30396	14870	23235	0,417629	23920	22834	0,954591
A9HJG3_GLU DA	2510,93	19	45067	65557	55584	53499	30695	73113	0,420964	55403	52436	0,946447
NDK_GLU DA	15674,95	5	373753	357952	324282	311107	383692	345164	0,422869	351996	346654	0,984825
A9H8C5_GLU DA	4037,65	9	66634	75537	100861	79662	76881	93763	0,423363	81011	83436	1,029932
A9HK57_GLU DA	5078,06	10	56425	82233	71795	63134	57769	83035	0,424789	70151	67979	0,969045
A9HRC0_GLU DA	537,17	3	15315	14092	19868	16941	14281	19445	0,425231	16425	16889	1,02826
A9H8I6_GLU DA	2150,84	8	48864	45065	47798	39731	54617	50232	0,426034	47242	48193	1,02013
A9HJ01_GLU DA	2951,74	10	81967	94006	115248	94559	70664	116485	0,428553	97073	93903	0,967336
A9HJG6_GLU DA	7704,89	3	59660	47540	55867	41853	59815	66013	0,430747	54356	55894	1,028297
A9HF68_GLU DA	4261,60	6	113053	79682	131070	105284	98396	111192	0,431842	107935	104957	0,97241
A9HJ45_GLU DA	589,05	3	33461	34026	1	33564	23687	16977	0,433603	22496	24743	1,099859
A9HJZ0_GLU DA	7008,81	3	159557	139559	147870	176896	176438	106917	0,434465	148995	153417	1,029677
A9HEE9_GLU DA	5739,78	10	151818	146193	137663	158686	130169	151938	0,434947	145225	146931	1,01175
A9HI49_GLU DA	788,98	7	18136	21933	21896	22301	11751	30950	0,436949	20655	21667	1,048998
A9H3H9_GLU DA	698,74	2	9511	9347	15355	8591	1	22077	0,437192	11404	10223	0,896427
A9HMC5_GLU DA	667,85	2	28917	16935	1	16879	1	23539	0,438325	15284	13473	0,8815

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HDT4_GLU DA	20482,92	15	342981	317556	335817	379369	304365	324747	0,43866	332118	336160	1,012171
A9H8S7_GLU DA	23448,24	17	290293	352989	472312	369390	294719	489985	0,438671	371865	384698	1,034511
CH601_GLU DA	38262,66	43	671974	672055	825044	741156	701396	753955	0,438761	723024	732169	1,012648
A9H4M9_GLU DA	5822,32	7	102313	103600	103359	89963	100946	114645	0,439112	103091	101851	0,987974
A9HE87_GLU DA	1461,45	7	37136	36690	57079	54088	39182	41660	0,439122	43635	44977	1,030748
A9HNB7_GLU DA	7157,15	16	131092	141742	159337	149534	104609	167777	0,43956	144057	140640	0,97628
A9HII7_GLU DA	6469,10	18	114680	133733	172627	156480	112883	162874	0,439977	140347	144079	1,026594
ATPE_GLU DA	1762,54	3	37977	36082	47187	26384	61080	27817	0,439978	40415	38427	0,950804
A9HLQ2_GLU DA	1512,60	4	16899	18672	23839	25968	16233	18821	0,444291	19803	20341	1,027148
A9HKL4_GLU DA	3807,90	13	59405	50194	55143	55025	40518	65748	0,446723	54914	53764	0,979048
A9HRE1_GLU DA	4618,99	9	60495	79476	72227	66591	56617	84732	0,447	70733	69313	0,979929
A9HI34_GLU DA	3524,14	17	88389	80430	107509	93735	99298	86841	0,451169	92109	93292	1,012836
A9H1P4_GLU DA	2830,57	10	32694	38506	50205	32406	26610	67765	0,453168	40468	42260	1,044284
RL19_GLU DA	5760,80	3	40140	34648	53933	49827	33708	48005	0,45426	42907	43846	1,0219
A9HFW9_GLU DA	662,74	2	18166	18241	1	15611	1	17937	0,456962	12136	11183	0,921473
A9HPJ3_GLU DA	1480,68	4	16225	14325	16026	11898	13912	19876	0,457186	15525	15229	0,980913
A9HBL5_GLU DA	2354,43	15	51111	59269	52137	52973	36135	77689	0,458856	54172	55599	1,026338
A9HIR0_GLU DA	2049,58	15	57975	59847	71943	64913	50585	71762	0,459312	63255	62420	0,986801
A9HNY2_GLU DA	1795,17	9	25311	23923	31083	23173	30668	27419	0,461863	26772	27086	1,011743

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HJQ1_GLUDA	12373,39	14	383162	384956	360979	377065	400303	356192	0,463096	376365	377853	1,003953
A9HJ43_GLUDA	1607,68	4	19853	23220	28442	22553	25222	22943	0,463722	23838	23573	0,988869
A9HBI3_GLUDA	2148,95	3	39307	37575	73632	51243	60855	34294	0,463813	50171	48797	0,972618
A9HFU5_GLUDA	7730,23	31	167054	173888	210073	194019	145944	204568	0,464145	183672	181510	0,988233
A9HJG0_GLUDA	1260,84	5	66201	68419	53285	54940	53305	82761	0,464509	62635	63669	1,016503
A9HNN4_GLUDA	932,29	2	1	1	22827	1	1	19952	0,464548	7610	6651	0,874083
A9HFE5_GLUDA	6983,36	17	105007	110001	107761	81345	84012	165445	0,465805	107590	110267	1,024888
A9HKZ6_GLUDA	1752,41	8	31970	33480	49139	38130	32405	42343	0,466203	38197	37626	0,98506
A9HHR8_GLUDA	6391,58	7	76473	60392	127852	84767	62906	110587	0,467474	88239	86087	0,975605
A9HJA9_GLUDA	4216,06	14	107962	106104	93407	116741	70920	124214	0,46957	102491	103959	1,014317
RL9_GLUDA	26520,55	13	411916	421511	361250	386593	414719	398327	0,470462	398226	399880	1,004154
LEUD_GLUDA	2177,73	6	13309	21354	64136	20554	14462	58856	0,470768	32933	31290	0,950132
A9HIK2_GLUDA	6802,01	22	168304	182197	298863	229350	154667	253850	0,472041	216455	212623	0,982296
A9GZX2_GLUDA	613,08	3	35860	29221	1	42313	1	26416	0,472477	21694	22910	1,056066
A9HP28_GLUDA	1420,20	2	23867	52285	1	39979	40624	1	0,472535	25384	26868	1,058455
A9HCR1_GLUDA	11451,86	11	236854	240711	274002	238218	260447	250019	0,473669	250522	249562	0,996165
A9HBF1_GLUDA	6657,56	4	130975	84648	92719	86068	126603	91665	0,473845	102780	101445	0,987011
A9HLZ7_GLUDA	2403,67	11	58110	73901	50221	54955	42344	88124	0,474534	60744	61808	1,017511
A9HEK6_GLUDA	5320,28	19	195122	209255	198521	203063	185485	216371	0,475122	200966	201640	1,003353

Apêndice A. Cont

accession	max score	reported peptides	Controle1	Controle2	Controle3	Co-cultivo1	Co-cultivo2	Co-cultivo3	teste t	média controle	média co-cultivo	MaxFold
A9HKU5_GLU DA	1868,74	9	125610	129342	48509	134270	25325	153179	0,475878	101154	104258	1,030685
A9HJ91_GLU DA	388,23	3	1	1	11963	1	1	10940	0,476357	3988	3647	0,914475
A9HIW8_GLU DA	21949,05	12	610078	555183	567723	543721	566922	627265	0,479634	577661	579302	1,002841
A9HFG9_GLU DA	12004,75	14	306604	321319	318687	290031	344933	308908	0,480416	315537	314624	0,997107
A9HM31_GLU DA	1118,03	6	18658	20001	21275	14207	16783	28245	0,481087	19978	19745	0,98834
A9HPB2_GLU DA	1488,82	4	57744	47824	41811	38530	72132	38589	0,481266	49126	49750	1,012703
BIOB_GLU DA	1086,73	4	39708	31128	30717	30878	26272	45172	0,485288	33851	34107	1,007572
A9H812_GLU DA	3835,83	6	57663	62794	77041	82964	30107	82485	0,487354	65833	65185	0,990164
A9H1J6_GLU DA	759,11	3	13041	13287	8573	11586	1	24020	0,488174	11634	11869	1,020219
A9HRI7_GLU DA	1825,80	15	67633	65090	79731	68940	60600	82222	0,488902	70818	70587	0,996741
A9H179_GLU DA	782,06	5	36950	34750	26651	32278	38294	27406	0,489503	32784	32659	0,996207
A9HLH8_GLU DA	1226,14	8	21768	24263	24784	31041	15224	24958	0,489656	23605	23741	1,005776
SECB_GLU DA	10530,74	8	159171	154443	212352	170341	166536	190763	0,489877	175322	175880	1,003181
A9HED6_GLU DA	20385,57	7	370994	402630	393640	389989	402393	374043	0,491608	389088	388808	0,999281
A9H1L4_GLU DA	1164,54	5	43664	52378	40489	43511	34865	58689	0,491638	45511	45689	1,003911
A9H9B9_GLU DA	3664,53	3	47465	38701	27456	1	21152	93730	0,494821	37874	38294	1,011106
A9H0Y9_GLU DA	1096,22	5	42886	35278	33075	37420	37348	36561	0,496453	37080	37110	1,000806
A9HRD4_GLU DA	1154,17	2	31936	33372	27589	26876	36110	29854	0,497836	30965	30947	0,999392
A9HC24_GLU DA	4143,12	4	1	1	95689	1	1	99557	0,489499	31897	33186	1,040418