

INDUÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Arabidopsis thaliana*
POR COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR
Gluconacetobacter diazotrophicus

ROBERTA RIBEIRO BARBOSA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO– 2016

INDUÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Arabidopsis thaliana*
POR COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR
Gluconacetobacter diazotrophicus

ROBERTA RIBEIRO BARBOSA

“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
MARÇO - 2016

INDUÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Arabidopsis thaliana*
POR COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR
Gluconacetobacter diazotrophicus

ROBERTA RIBEIRO BARBOSA

“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 22 de março de 2016.

Comissão Examinadora:

Prof. Marcelo Menossi Teixeira (D.Sc., Genética) - UNICAMP

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

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

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

*"O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.
Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã."*

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

A essa "Força" intangível e incognoscível para nós, para alguns chamada de Deus, que nos faz crer que o impossível é apenas difícil para aqueles que não desistem.

À minha Família, por todo amor, confiança e apoio incondicional.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela possibilidade de estudo e pesquisa de qualidade em todos esses anos.

À UENF e à Capes, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao CNPq, Capes, Faperj, Finep e INCT, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho, pelos ensinamentos acadêmicos e profissionais, e, ao seu grupo, por todo apoio, convivência e amizade.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em especial ao Prof. Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga e aos técnicos Verônica Coutinho e Luiz Francisco P. Manhães, por todo apoio oferecido nos trabalhos conduzidos com cana-de-açúcar durante o doutorado.

Aos professores Dr. Vanildo Silveira, Dra. Clécia Grativol e ao aluno de doutorado Lucas Zanchetta Passamani, por toda dedicação dispensada nos trabalhos de proteômica realizados.

Aos professores Dr. Marcelo Menossi Teixeira, Dr. Fábio Lopes Olivares e Dr. Vanildo Silveira, pelas sugestões e por aceitarem participar da minha banca de doutorado.

Aos professores, técnicos, colegas do Laboratório de Biotecnologia e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta tese.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Interação planta - microrganismo.....	4
2.1.2. Bactérias promotoras do crescimento vegetal.....	5
2.1.3. Bactérias endofíticas.....	6
2.1.4. Uso potencial, na agricultura, das bactérias promotoras do crescimento vegetal.....	8
2.2. Compostos voláteis.....	9
2.2.1. Classificação dos compostos voláteis.....	9
2.2.2. Amônia.....	10
2.2.3. Organismos produtores e importância ecológica.....	11
2.2.4. Papel dos compostos voláteis bacterianos na promoção do crescimento vegetal.....	16
2.3. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	18
2.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> : modelo de estudo em biologia molecular de planta.....	20
2.4.1. O papel das vias hormonais em <i>A. thaliana</i>	24
2.5. Proteômica: ferramenta para o estudo de interação planta-microrganismo.....	27

3. ESTRATÉGIAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL PRESENTES EM <i>G. diazotrophicus</i>	31
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. Objetivo geral.....	33
4.2. Objetivos específicos.....	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1. Microrganismos, meios e condições de cultivo.....	35
5.2. Material vegetal e condições para cultivo.....	36
5.3. Exposição de plantas de <i>A. thaliana</i> a VOCs produzidos por <i>G. diazotrophicus</i> , em placas de 24 poços.....	37
5.4. Exposição de plantas de <i>A. thaliana</i> , cultivadas em solo, aos VOCs produzidos por <i>G. diazotrophicus</i>	38
5.5. Determinação dos níveis de emissão de amônia por <i>G. diazotrophicus</i>	39
5.6. Crescimento de <i>A. thaliana</i> em meio de cultura com diferentes valores de pH.....	40
5.7. Análise proteômica.....	40
5.7.1. Extração de proteínas totais.....	40
5.7.2. Quantificação do conteúdo de proteínas totais.....	41
5.7.3. Digestão de proteínas.....	41
5.7.4. Análise LC-MS/MS.....	42
5.8. Análises estatísticas.....	42
6. RESULTADOS.....	43
6.1. Promoção do crescimento de <i>A. thaliana</i> por VOCs de <i>G. diazotrophicus</i>	43
6.2. A importância das vias vegetais de produção e percepção de hormônios no processo de promoção do crescimento ativado por VOCs de <i>G. diazotrophicus</i>	45
6.3. Produção de amônia por <i>G. diazotrophicus</i>	47
6.4. Papel da amônia liberada por <i>G. diazotrophicus</i> na promoção do crescimento de <i>A. thaliana</i> induzida por VOCs.....	49
6.5. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) em <i>G. diazotrophicus</i> não participa da promoção do crescimento de <i>A. thaliana</i> ativada por VOCs.....	53
6.6. A influência do pH do meio de cultura no crescimento de <i>A. thaliana</i>	55

6.7. Efeito dos VOCs de <i>G. diazotrophicus</i> sobre a promoção do crescimento de plantas de <i>A. thaliana</i> cultivadas em solo.....	57
6.8. Efeitos dos compostos voláteis de <i>G. diazotrophicus</i> sobre os perfis proteômicos das plantas de <i>A. thaliana</i>	59
7. DISCUSSÃO.....	67
8. CONCLUSÕES.....	77
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
APÊNDICE.....	95

RESUMO

BARBOSA, ROBERTA RIBEIRO; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março, 2016. Indução do crescimento de *Arabidopsis thaliana* por compostos voláteis produzidos por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: Rosana Rodrigues e Vanildo Silveira.

O contínuo crescimento da população humana e do consumo representará um aumento na demanda mundial de alimentos e energia nos próximos 40 anos. Na busca por uma produtividade agrícola mais sustentável, pesquisas com bactérias promotoras do crescimento vegetal vêm se expandindo. Entre as bactérias já caracterizadas, está a *G. diazotrophicus*. Isolada, em 1988, de plantas de cana-de-açúcar, essa bactéria é capaz de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) atmosférico, produzir fitormônios, sideróforos, bacteriocinas e solubilizar zinco e fósforo. Todos esses mecanismos permitem a indução do crescimento vegetal, que já foi relatada em diversas espécies de plantas, tornando *G. diazotrophicus* uma bactéria de grande potencial agrônômico. O presente trabalho objetivou estudar a liberação de compostos voláteis por *G. diazotrophicus* e seu efeito como um novo mecanismo promotor do crescimento vegetal. Foram avaliados os efeitos dos VOCs (*Volatile Organic Compounds* - Compostos Orgânicos Voláteis) produzidos por *G. diazotrophicus* sobre o crescimento de plantas de *A. thaliana* (ecótipo Col-0) e a importância de diferentes vias hormonais na resposta vegetal a tais compostos. A participação da fixação biológica de nitrogênio e da produção de amônia pela bactéria no processo de

promoção do crescimento por tais VOCs foi também investigada. Visando avaliar as vias moleculares reguladas em plantas de *A. thaliana* quando expostas aos VOCs produzidos por *G. diazotrophicus*, análises proteômicas comparativas foram conduzidas. Nossos resultados revelaram que os compostos voláteis produzidos por *G. diazotrophicus* promovem o crescimento tanto de plantas cultivadas *in vitro* quanto em solo, sendo esta promoção dependente da via do ácido salicílico. Análises de sequestro de amônia, por ácido fosfórico, indicaram que tal composto volátil, produzido por *G. diazotrophicus*, não participa da promoção do crescimento. Similarmente, estudo utilizando mutante bacteriano defeutivo para a FBN revelou que tal processo não participa da indução do crescimento vegetal disparada por VOCs. As análises proteômicas indicaram que os compostos liberados por *G. diazotrophicus* induziram repressão de determinadas vias como a fotorrespiração, vias relacionadas com a defesa vegetal e resposta a estresses abióticos. Adicionalmente, foram ativadas as vias de produção de proteínas ribossômicas, aquaporinas e vias fotossintéticas. Os resultados obtidos nos levam a sugerir que uma repressão da defesa vegetal e de processos celulares de grande demanda energética, como a fotorrespiração, aliada a um maior aporte nutricional e a uma melhor eficiência hídrica, podem ser os responsáveis pela promoção do crescimento observada em *A. thaliana*. Este é o primeiro trabalho que caracteriza a produção de compostos voláteis como um mecanismo de promoção do crescimento vegetal promovido por *G. diazotrophicus*.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, compostos voláteis, promoção do crescimento vegetal, *A. thaliana*, proteômica.

ABSTRACT

BARBOSA, ROBERTA RIBEIRO; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March, 2016. Volatiles from *Gluconacetobacter diazotrophicus* promote growth in *Arabidopsis thaliana*. Advisor: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Counselors: Rosana Rodrigues and Vanildo Silveira.

Continuing human population and consumption growth will mean that the global demand for food will increase for at least another 40 years. In the search for a more sustainable agricultural productivity, research on plant growth promoting bacteria are expanding. Among the bacteria been characterized, is the *G. diazotrophicus*. Isolated, in 1988, from sugarcane plants. This bacterium is able to perform the biological atmospheric nitrogen fixation (BNF), to produce phytohormones, siderophores, bacteriocins and solubilize zinc and phosphorus. All of these mechanisms allow the induction of plant growth, which has been reported in several species of plants, making *G. diazotrophicus* a bacterium of great agronomic potential. This study investigated the release of volatile compounds by *G. diazotrophicus* and its effect as a new plant growth promoting mechanism. The effects of VOCs (Volatile Organic Compounds) produced by *G. diazotrophicus* on the growth of *A. thaliana* plants (ecotype Col-0) and the importance of different hormonal pathways in plant response to such compounds were investigated. The participation of biological nitrogen fixation and production of ammonia by bacteria in growth promotion process for these VOCs were also investigated. To evaluate the molecular pathways regulated in plants of *A. thaliana* when exposed to VOCs produced by *G. diazotrophicus*, comparative proteomic

analyses were carried out. Our results indicated that the volatiles produced by *G. diazotrophicus* both promote the growth of plants grown *in vitro* and in soil, and this promotion depends on the salicylic acid pathway. Ammonia sequestering analyses by phosphoric acid indicated that volatile compound produced by *G. diazotrophicus* does not participate in plant growth promoting. Similarly, studies using bacterial defective mutant BNF revealed that this process did not participate in the induction of plant growth triggered by VOCs. The proteomic analyses indicated that the compounds released by *G. diazotrophicus* induced repression of certain pathways such as photorespiration, pathways related to the plant defense response and abiotic stresses. Additionally it has been activated the ribosomal protein production pathways, aquaporins, and photosynthetic pathways. The results lead us to suggest that a suppression of plant defense and cellular processes of high energy demands, such as photorespiration, a higher nutritional support, and plant water efficiency may be responsible for plant growth promoting observed. This is the first work that characterizes the production of volatile compounds as a plant growth promoting mechanism by *G. diazotrophicus*.

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, volatile compounds, plant growth promotion, *A. thaliana*, proteomic.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos e energia, aliada a uma agricultura sustentável, tem se tornado um grande desafio nos últimos anos. Com uma população mundial estimada em nove bilhões de pessoas em 2050, as mudanças climáticas esperadas poderão acarretar redução da produtividade agrícola (Coleman-Derr et al., 2014). A continuidade de práticas agrícolas, como a dependência de fertilizantes e agrotóxicos, gerando prejuízos ao meio ambiente e ao ser humano, tem agravado o problema e levado à busca por soluções alternativas, permitindo o surgimento de novos campos de pesquisa e a expansão de outros (Gunnell et al., 2007).

Entre as pesquisas biotecnológicas que vêm se expandido, estão aquelas relacionadas ao entendimento das relações benéficas entre plantas e microrganismos, entre as quais, pode-se destacar o estudo das bactérias promotoras do crescimento vegetal. Microrganismos promotores do crescimento vegetal podem colonizar folhas, flores, rizosfera (Lugtenberg et al., 2009), a superfície das raízes (Gaiero et al., 2013) ou podem colonizar tecidos internos do hospedeiro, aumentando os efeitos benéficos, com um estilo de vida endofítico sem sintoma visível de doença (Hardoim et al., 2008).

Entre as características benéficas de microrganismos promotores do crescimento vegetal, podemos citar a capacidade de aumentar a tolerância vegetal a estresses abióticos, suprimir a proliferação de patógenos (Whipps, 2001; Berg, 2009; Compant et al., 2010), fixar nitrogênio (Baldani et al., 1997),

produzir hormônios reguladores do crescimento vegetal, ou substâncias análogas, como auxina e giberelinas (Fuentes-Ramirez et al., 1993), produzir antibióticos (Strobel et al., 2003), fazer a biorremediação (Compant et al., 2010) e produzir compostos voláteis promotores de crescimento de plantas (Lugtenberg et al., 2013).

Os compostos voláteis englobam um grande e altamente diversificado grupo de moléculas (Dixon et al., 2011), que podem ser produzidos por plantas, humanos, animais, fungos e bactérias, como produtos de seu metabolismo (Sohrabi et al., 2014). A produção de compostos voláteis por microrganismos promotores do crescimento vegetal tem surgido como um novo mecanismo de indução da promoção do crescimento (Ryu et al., 2003), já descrito para diferentes bactérias como *Bacillus* (Ryu et al., 2004) e *Pseudomonas chlororaphis* (Han et al., 2006). A produção de compostos voláteis por bactérias promotoras do crescimento promove o ganho de biomassa vegetal e pode mediar, direta ou indiretamente, o aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos, tais como salinidade e estresse hídrico, melhorando a nutrição vegetal (Liu et al., 2015).

G. diazotrophicus é um exemplo de bactéria endofítica promotora do crescimento vegetal, tendo sido inicialmente isolada de cana-de-açúcar (Cavalcante et al., 1988; Reis et al., 1994). Entre os mais bem documentados efeitos benéficos de *G. diazotrophicus* para as plantas, estão a fixação biológica de nitrogênio (Cojho et al., 1993), a produção de ácido 3-indol-acético (AIA) e giberelinas A1 e A3 (Fuentes-Ramirez et al., 1993; Bastian et al., 1998), a síntese de bacteriocinas (Pinon et al., 2002) e sideróforos dos tipos salicilato e catecolato (Logeshwaran et al., 2009) e a solubilização de zinco e fósforo (Saravanan et al., 2007; Intorne et al., 2009).

Neste trabalho, objetivamos avaliar a produção de compostos voláteis por *G. diazotrophicus*, e sua ação como um mecanismo de promoção do crescimento vegetal. Para tal, a utilização da planta modelo *A. thaliana* foi fundamental para o entendimento do processo, considerando suas características de pequeno porte, fácil cultivo, genoma sequenciado, fácil obtenção de linhas mutantes e transgênicas (Meinke et al., 1998) e cuja colonização endofítica de *G. diazotrophicus* já foi caracterizada (de Souza et al., 2015).

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na promoção do crescimento de *A. thaliana*, ativada por compostos voláteis de *G. diazotrophicus*,

por meio do estudo das vias hormonais da planta e das proteínas diferencialmente reguladas durante o processo de interação, pode fornecer informações relevantes sobre a relação entre bactérias e plantas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Interação planta - microrganismo

Os microrganismos estão presentes em uma grande diversidade de ambientes, realizando complexas redes ecológicas de interações. Essas relações podem ser positivas, negativas ou não apresentar nenhum impacto para as espécies envolvidas, podendo ser classificadas como interações de mutualismo, comensalismo, amensalismo, parasitismo e competição (Faust et al., 2012).

A interação entre plantas e microrganismos pode ocorrer de diferentes formas e em diferentes locais como a superfície e o interior de folhas, frutos e raízes. Estas interações podem ser classificadas em compatíveis, incompatíveis e “*non-host*”. Nas interações compatíveis, em que há a suscetibilidade do hospedeiro, os microrganismos conseguem acessar o interior vegetal por meio de aberturas estomáticas, hidatódios ou ferimentos, subvertendo a resposta de defesa. Nas interações incompatíveis, devido a diversas barreiras físicas e mecanismos de defesa, o microrganismo não consegue penetrar os tecidos vegetais, e nas interações do tipo “*non-host*”, um patógeno normalmente virulento para um hospedeiro específico não é capaz de infectar e crescer em um hospedeiro diferente (Huckelhoven, 2007; Göhre et al., 2008).

Diversas estratégias são empregadas por microrganismos para manter sua sobrevivência em ambientes internos de folhas, raízes e frutos. No primeiro contato com a planta hospedeira, diferentes barreiras físicas preexistentes, como

a cutícula das folhas e a parede celular, impedem a entrada do microrganismo (Hückelhoven, 2007). O acesso ao interior da planta é facilitado pelos estômatos, hidatócitos e aberturas de ferimentos. Entretanto, mesmo no interior das plantas, novas barreiras são impostas e devem ser superadas pelos microrganismos para que a colonização seja bem-sucedida. As barreiras incluem, a redução do pH (Felle, 1998), a produção de compostos antimicrobianos e de enzimas de degradação (Göhre et al., 2008). Para vencer essas barreiras, algumas bactérias, como a *Pseudomonas syringae*, dispõem do sistema de secreção do Tipo III, que é capaz de penetrar na parede celular e membrana plasmática e ejetar moléculas efetoras para suprimir a defesa e obter nutrientes (Jin et al., 2003). Alguns fungos e oomicetos formam apressórios, que, pela pressão de turgor na parede celular, conseguem forçar a entrada das hifas com posterior formação de estruturas de alimentação chamadas de haustórios e liberação de efetores, permitindo sua manutenção no interior celular (O'Connell et al., 2006).

Com a entrada do microrganismo no interior vegetal, uma interação compatível é estabelecida, podendo ser benéfica, maléfica ou neutra. Entre as interações benéficas para o crescimento e saúde das plantas, está a simbiose com rizóbios e micorrizas (Göhre et al., 2008).

2.1.2. Bactérias promotoras do crescimento vegetal

Todas as plantas e provavelmente todos os seus tecidos são colonizados por uma variedade de microrganismos, muitos deles benéficos à planta hospedeira por melhorar o aporte de nutrientes, prevenir o ataque de patógenos e aumentar o crescimento vegetal em condições ambientais adversas (Partida-Martínez et al., 2011; Coleman-Derr et al., 2014; Turner et al., 2013). Como retorno, esses microrganismos recebem a proteção do ambiente que os cercam e o acesso a fontes ricas em carbono. O caso mais bem estudado deste tipo de relação são os fungos micorrízicos, que aumentam o aporte de nutrientes (Bonfante et al., 2009) e de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, que residem em estruturas radiculares de plantas leguminosas chamadas nódulos, onde se mantêm, de forma endossimbiótica, fixando o nitrogênio atmosférico, convertendo-o em amônia, que é disponibilizada

para a planta hospedeira (Lugtenberg et al., 2009). A cada ano novos microrganismos promotores do crescimento são identificados.

Muitos desses microrganismos promotores do crescimento vegetal colonizam a rizosfera, a porção do solo que fica em contato com as raízes, sendo influenciados por exsudados como ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento, hormônios e compostos antimicrobianos liberados pela planta (Lugtenberg et al., 2009). Alguns aderem à superfície das raízes, o rizoplano, sendo denominados de associativos (Gaiero et al., 2013). E outros podem entrar pelo sistema radicular do hospedeiro e aumentar os efeitos benéficos com um estilo de vida endofítico (Hardoim et al., 2008), tendo como exemplos fungos promotores do crescimento vegetal (fungos micorrízicos arbusculares, ectomicorrizos e outros fungos endofíticos), assim como rizobactérias (Kloepper et al., 1978) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (Bashan et al., 1998).

2.1.3. Bactérias endofíticas

Estudos da colonização de tecidos vegetais por bactérias foram iniciados em 1870, principalmente com os trabalhos de Pasteur. Nesta época, acreditava-se que as bactérias que colonizavam o interior vegetal, atualmente denominadas endofíticas, fossem contaminantes da desinfestação superficial incompleta, ou que se tratasse de patógenos com pouca virulência (Hollis, 1951). Porém, trabalhos posteriores mostraram que as bactérias endofíticas, ao contrário do que se pensava, podiam promover o crescimento vegetal e reduzir os sintomas de doenças causadas por diversos patógenos (Hallmann et al., 1997). Tendo como referência esses trabalhos, novas definições foram propostas.

A definição mais aplicada, atualmente, classifica os endofíticos como uma subpopulação do microbioma da rizosfera, que reside, pelo menos parte de sua vida, no interior dos tecidos vegetais. Eles geralmente são considerados não patogênicos, não causando nenhum sintoma visível de doença, sendo incluídos patógenos latentes, que, dependendo das circunstâncias ambientais e/ou genótipo do hospedeiro, podem causar doenças (Hallmann et al., 1997; James et al., 1998; Compant et al., 2010; Monteiro et al., 2012; Turner et al., 2013). Trabalhos mais recentes, com a utilização de sonicação para a liberação de

camadas mais externas dos tecidos vegetais, revelaram que as bactérias endofíticas, na maioria das vezes, residem no apoplasto, em células mortas ou que estão morrendo e em vasos do xilema de onde podem ser translocadas das raízes para a parte aérea (Lundberg et al., 2012; Bulgarelli et al., 2012; Turner et al., 2013).

A colonização dos tecidos vegetais por bactérias endofíticas pode ocorrer via mecanismos passivos ou ativos (Hardoim et al., 2008). A penetração ativa ocorre pela secreção de lipopolissacarídeos, enzimas que degradam a parede celular, e outros compostos que hidrolisam as células da exoderme vegetal. Sítios de emergência de raízes laterais e ferimentos presentes nas raízes são fontes importantes para a penetração de forma passiva (James et al., 1998; Monteiro et al., 2012). Uma vez no tecido radicular interno, as bactérias colonizam o apoplasto, apresentando uma maior população no sistema radicular quando comparado à parte aérea, e com valores que parecem ser rigidamente controlados, provavelmente para que a defesa vegetal não seja induzida, já que não ultrapassam 10^7 e 10^8 CFU/g de biomassa fresca, dependendo da idade e do genótipo da planta (Turner et al., 2013). Dentro do tecido vegetal, essas bactérias podem se dispersar sistemicamente ou se localizar em determinados pontos específicos (Hallmann et al., 1997).

A comunidade endofítica é classificada em "passageiros", que invadem os tecidos vegetais por acidente, e "verdadeiros" que têm características adaptativas que permitem viver exclusivamente em associação com a planta (Hardoim et al., 2008). Endofíticos já foram isolados de dicotiledôneas e monocotiledôneas, como cana-de-açúcar (Cavalcante et al., 1988), sorgo (Mareque et al., 2014), tomate, melão e pimenta (Xia et al., 2015).

Entre os mecanismos responsáveis pelo crescimento vegetal promovido pelos endofíticos, estão a fixação biológica de nitrogênio (Baldani et al., 1997), a produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal, ou substâncias análogas, como auxina e giberelinas (Fuentes-Ramirez et al., 1993); o aumento da resistência a estresses bióticos (Pleban et al., 1995) e abióticos (Hallmann et al., 1997); o controle biológico de pragas e doenças nas plantas (Verma et al., 2001); a indução da resistência sistêmica (Hallmann et al., 1997); a produção de antibióticos (Strobel et al., 2003); a biorremediação (Compant et al., 2010); e a produção de compostos voláteis (Lugtenberg et al., 2013).

2.1.4. Uso potencial, na agricultura, das bactérias promotoras do crescimento vegetal

O crescente aumento populacional tem se tornado um desafio para o futuro da produção agrícola sustentável de alimentos, energia, assim como de componentes básicos de processos industriais. A contínua aplicação de fertilizantes e agrotóxicos acarreta grandes custos de produção, prejuízos ao meio ambiente e ao ser humano (Gunnell et al., 2007). De forma paralela, o crescimento populacional, com um valor de nove bilhões de habitantes, estimados para 2050, acarretará mudanças climáticas com secas e aumentos progressivos de temperatura, reduzindo a produtividade agrícola (Coleman-Derr et al., 2014).

Por muitos anos, a biotecnologia vegetal contribuiu para a busca de soluções alternativas, para o aumento da demanda agrícola, por meio da obtenção de variedades de diferentes culturas com resistência às doenças, estresses abióticos e com maiores valores nutricionais. Na utilização destas estratégias, o entendimento dos benefícios das interações entre plantas e microrganismos foram frequentemente ignorados. Entretanto, sucessivos estudos demonstraram os benefícios dessas interações, como a habilidade de bactérias e fungos de interagir intimamente com suas plantas hospedeiras e suas capacidades de promover o crescimento vegetal, aumentar a tolerância vegetal a estresses abióticos e suprimir a proliferação de patógenos (Whipps, 2001; Berg, 2009; Compant et al., 2010), o que tem contribuído efetivamente para o aumento nas pesquisas e no emprego de inoculantes microbianos na agricultura.

De acordo com Berg (2009), a utilização, para a promoção do crescimento vegetal, de inoculantes microbianos, em comparação com pesticidas e fertilizantes, apresenta como vantagens a segurança, reduzido prejuízo ao meio ambiente e à saúde humana, atividade mais direcionada, efetividade em pequenas quantidades, capacidade inerente de multiplicação, que é dependente da resposta da planta hospedeira e da população microbiana interna, decomposição mais rápida do que os pesticidas químicos tradicionais, podendo ser utilizados em sistemas de manejo integrados ou convencionais contra pragas.

Comparada aos métodos tradicionais de engenharia genética para o aumento de tolerância a diversos estresses ambientais, a utilização de metodologias com base na simbiose apresenta diversas vantagens.

Primeiramente, os microrganismos simbióticos são frequentemente capazes de conferir tolerância a estresses a uma larga variedade de hospedeiros, e muitas bactérias promotoras do crescimento podem conferir benefícios para monocotiledôneas e dicotiledôneas (Redman et al., 2002; Zhang et al., 2008). Uma segunda vantagem é que microrganismos promotores do crescimento vegetal conferem mais de um tipo de tolerância ao estresse, seja abiótico ou biótico (Mayak et al., 2004). Culturas que crescem em ambientes áridos ou semiáridos geralmente respondem a diferentes estresses. Plantas de *Arabidopsis* em simbiose com *Paenibacillus polymyxa* apresentaram aumentos na tolerância à seca assim como resistência ao ataque de patógenos (Timmusk et al., 1999). E a terceira vantagem é que a associação entre plantas e microrganismos representa um vasto reservatório de informação genética, que poderá coevoluir com seu hospedeiro em condições ambientais naturais (Coleman-Derr et al., 2014).

2.2. Compostos voláteis

Os compostos voláteis têm um papel fundamental na estruturação de vida no planeta. São produzidos por uma gama de organismos, como humanos, plantas, animais, fungos e bactérias, e apresentam diversas funções em ambientes naturais e artificiais, como a defesa e a comunicação entre espécies. A habilidade de produção de VOCs por estes organismos é reconhecido há muitos anos, e os humanos têm explorado este conhecimento na produção de vinhos, queijos e outros produtos fermentados (Schulz et al., 2007). Estes compostos são comunicadores químicos ideais, uma vez que estão presentes em diversas concentrações e alcançam longas distâncias, tendo um importante efeito nos organismos e nas suas interações com o meio ambiente (Wheatley, 2002).

2.2.1. Classificação dos compostos voláteis

Os compostos voláteis englobam substâncias orgânicas e inorgânicas. Os compostos orgânicos podem ser classificados em várias categorias, que incluem compostos orgânicos voláteis (VOCs), compostos orgânicos não voláteis (NVOCs) e compostos orgânicos semivoláteis (SVOCs). Os compostos orgânicos voláteis (VOCs) consistem em um grande e altamente diversificado grupo de

moléculas com base no carbono, geralmente relacionadas por sua volatilidade em temperatura ambiente (Dixon et al., 2011). Neste grupo, estão incluídos ácidos graxos, compostos aromáticos, compostos contendo nitrogênio e compostos sulfúricos. Algumas características químicas e propriedades físicas são comuns entre estes compostos. Eles geralmente pertencem a classes dos alcoóis, tióis, aldeídos, ésteres, terpenoides e derivados dos ácidos graxos; são lipofílicos; têm baixo peso molecular (<300 Da) e alta pressão de vapor (0,01 kPa ou maior a 20°C), permitindo-lhes evaporar facilmente em condições de temperatura e pressão normais (Schulz et al., 2007). Geralmente são menos diversos que os compostos não voláteis secretados pelos diferentes organismos. As análises dos VOCs tipicamente são realizadas por meio do espectrômetro de massas associado à cromatografia gasosa (GC-MS), que integra a capacidade de separação da cromatografia com a capacidade de identificação e separação dos compostos da espectrometria (Bitas et al., 2013). Devido à sua capacidade de se mover através do espaço aéreo assim como de líquidos (Effmert et al., 2012) os compostos podem servir como moléculas sinalizadoras na mediação de interações entre organismos a curtas e longas distâncias (Bitas et al., 2013).

2.2.2. Amônia

Uma variedade de compostos voláteis, entre eles a amônia, é liberada pelos organismos, sendo fundamentais em seus desenvolvimentos e nas complexas relações que fazem com o meio ambiente (Weise et al., 2013). A amônia (NH₃) é um composto volátil inorgânico, que pode ser produzido pelos microrganismos por diversos processos, como amonificação (Simon, 2002), degradação de aminoácidos derivados de proteínas e meio de cultura complexos (Kanapka et al., 1983), descarboxilação de aminoácidos (Özugul et al., 2007), desaminação e pela degradação hidrolítica da ureia (Kleiner et al., 1998). Outro processo fundamental de conversão de amônia por microrganismos é a fixação biológica de nitrogênio. Este processo transforma o nitrogênio atmosférico em amônia, tornando-o disponível para as plantas, visto serem incapazes de assimilá-lo de forma direta (Stueken et al., 2015).

Este processo é conduzido por bactérias classificadas como diazotróficas, que são encontradas em uma variedade de habitats, incluindo o estilo de vida

livre em solo e água e em associações simbióticas com gramíneas e leguminosas, sendo esta última com formação de nódulos radiculares fixadores de nitrogênio (Dixon et al., 2004). A realização deste processo envolve a ação do complexo enzimático da nitrogenase, enzima que tem como co-fator o conjunto molibdênio-ferro (Mo-Fe) e que é codificada pelo gene *nif*, encontrado em bactérias diazotróficas na forma de cluster de sete operons, que codificam 20 proteínas (Glick, 2012; Stueken et al., 2015).

A amônia é um composto de grande importância econômica na produção de fertilizantes, sendo envolvida em rotas metabólicas celulares de formação de biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas. Pela sua característica lipofílica, sua volatilidade e difusão pelas membranas biológicas, este composto também apresenta toxicidade, que é acentuada até em pequenos níveis. Células vegetais, ao acumularem níveis superiores a 0,1mM de amônia, apresentam sintomas como clorose das folhas e redução do crescimento aéreo e radicular (Britto et al., 2002). Esses efeitos provavelmente são derivados do desbalanço de pH celular, que acarreta alterações na homeostase de cálcio (Plieth et al., 2000).

A emissão de altos níveis de amônia pela rizobactéria *Serratia odorifera*, quando em cocultivo em placas de Petri com *A. thaliana*, foi capaz de alcalinizar o meio de cultura e, conseqüentemente, reduzir o crescimento vegetal. Acredita-se que, em ambiente natural, a degradação de compostos ricos em proteínas seja acompanhada pela emissão de amônia bacteriana, que altera o pH da rizosfera e, conseqüentemente, influencia a diversidade de organismos e as interações planta - microrganismo (Weise et al., 2013).

2.2.3. Organismos produtores e importância ecológica

Os compostos voláteis desempenham um papel fundamental em cada organismo e nas suas interações com o meio ambiente (Figura 1). Eles podem se dispersar do seu ponto de produção, por meio da atmosfera, poros do solo e líquidos, tornando-se ideais comunicadores químicos na mediação de curtas e longas distâncias de informação intra ou interespecies (Bitas et al., 2013). Plantas, humanos, animais, fungos e bactérias produzem compostos voláteis como produtos de seu metabolismo (Sohrabi et al., 2014). O conhecimento de suas funções em diferentes reinos pode ser empregada no desenvolvimento de

métodos que aliviem o emprego excessivo de pesticidas e a dependência química da agricultura (Bitas et al., 2013).

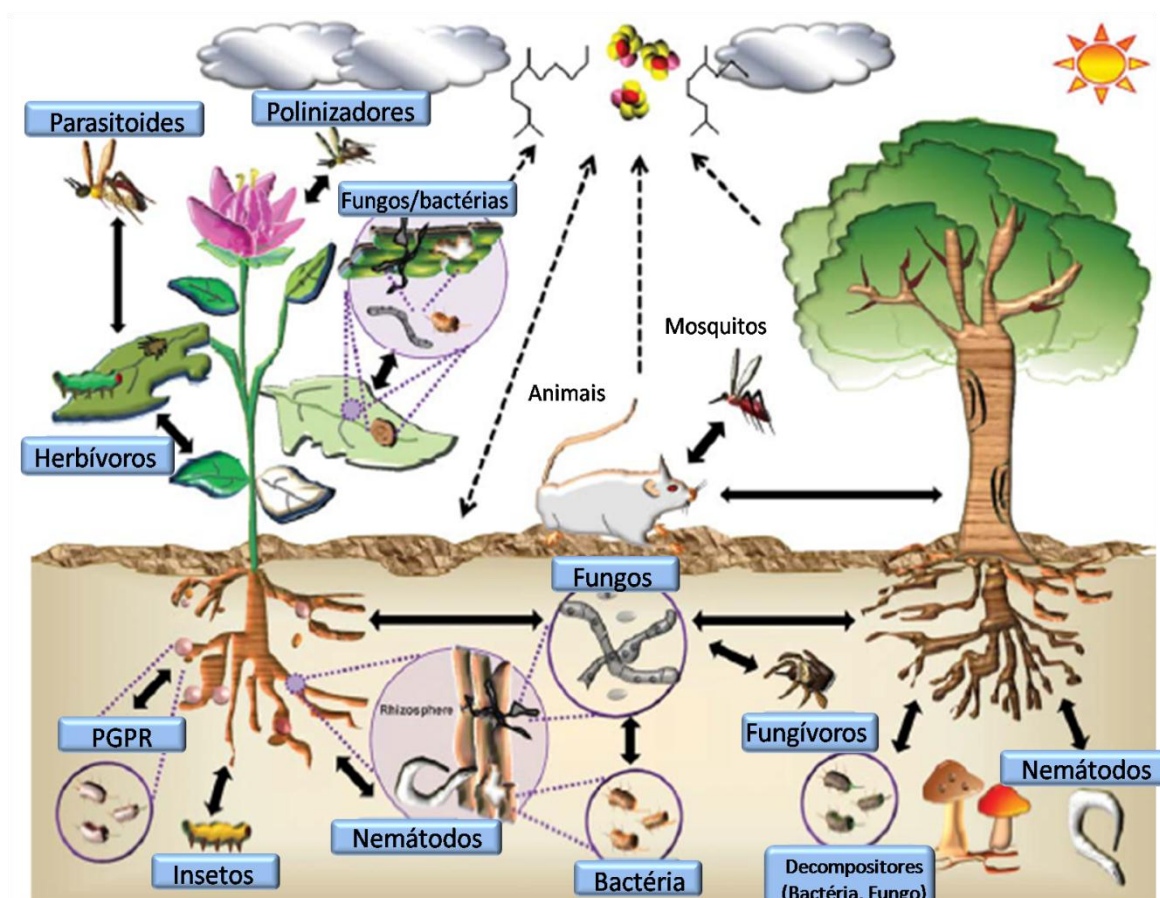


Figura 1 - Papéis conhecidos e hipotéticos dos compostos voláteis na mediação de interação dos organismos entre e dentro dos diferentes reinos. As setas de duas pontas indicam a interação entre organismos mediada pelos VOCs. Os compostos voláteis biogênicos e antropogênicos estão presentes ao redor da atmosfera, afetando, desta forma, a qualidade do meio ambiente e do ecossistema. Os solos funcionam como fonte e como dreno dos compostos voláteis. Certos VOCs produzidos por rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR), como 2,3-butanodiol, induzem promoção do crescimento e resistência a estresses. Adaptado de Bitas et al. (2013).

Estima-se que as plantas sejam os organismos que mais produzem e liberam compostos voláteis (cerca de 30.000), utilizando cerca de 20% do CO_2 fixado por dia na sua produção. A liberação dos VOCs ocorre por meio das membranas dos tecidos epidérmicos, onde são sintetizados, ou de outras estruturas como os tricomas. Nas folhas e caules, os VOCs são liberados dos estômatos. Alguns compostos podem ser estocados de forma conjugada em

vacúolos, ductos especializados e laticíferos, sendo liberados em situações específicas, como, por exemplo, numa situação de herbivoria ou ataque de predadores (Baldwin, 2010). Hormônios e seus derivados voláteis como etileno, metil jasmonato e metil salicilato são importantes nos processos de defesa vegetal (Baldwin, 2010; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Alguns outros compostos participam da resposta a estresses abióticos como altas temperaturas, alta intensidade luminosa, seca, salinidade, danos mecânicos e poluentes (Vickers et al., 2009) e na atração de polinizadores, dispersão de sementes e relações simbióticas com microrganismos (Bitas et al., 2013).

A liberação de VOCs por microrganismos está envolvida nas relações de antagonismo, mutualismo, regulação dos processos celulares e de desenvolvimento intra e interespecies e modificações do ambiente. Bactérias produzem diversos VOCs como fruto de seu metabolismo primário e secundário em diferentes condições fisiológicas (Bitas et al., 2013).

Estudos da produção de compostos produzidos por bactérias patogênicas humanas têm sido aplicados no desenvolvimento de métodos mais específicos e de maior eficiência na detecção da presença do patógeno, assim como do seu fenótipo dentro da espécie. Tal método pode ser empregado na prevenção de doenças assim como nos tratamentos com antibióticos (Bos et al., 2013). Vários fatores como a diversidade de bactérias, a disponibilidade de carbono e a fonte de energia e condições fisiológicas internas influenciam a produção de uma determinada classe de composto pelas bactérias. Ácidos graxos de cadeia curta como o lactato, acetato, propionato e etanol são produzidos via fermentação primária de carboidratos, que, são convertidos em compostos como butirato, propionato e propanol. Numa manifestação de doença, estes compostos têm suas concentrações elevadas dentro do organismo humano, sendo, desta forma, detectados, atuando como marcadores quantitativos de presença das bactérias (Thorn et al., 2012). Esses conhecimentos foram fundamentais no desenvolvimento de técnicas de detecção rápidas e não invasivas da presença de bactérias patogênicas, permitindo enorme progresso no diagnóstico clínico de infecções em tempo real, no monitoramento da progressão de doenças e no efeito dos tratamentos (Sohrabi et al., 2014).

Outros grupos de bactérias e fungos fazem associações com plantas e suas rizosferas, afetando o crescimento da planta por modulação de processos como defesa, tolerância a estresses ambientais e reciclagem de nutrientes (Buée et al., 2009; Saunders et al., 2010). Um dos mecanismos utilizados pelos microrganismos para promoção do crescimento e tolerância a estresses é a liberação de compostos voláteis (Ryu et al., 2003). Mas a produção de determinados compostos pode afetar negativamente as plantas. A liberação de compostos como amônia, dimetildissulfeto, cianeto de hidrogênio (HCN) e ácido 3-fenilproprionico por bactérias do gênero *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas*, inibe o crescimento vegetal, apresentando estes compostos efeito fitotóxico, sendo utilizados como efetores para suprimir a defesa da planta hospedeira (Kai et al., 2009; Blom et al., 2011a; Blom et al., 2011b; Bailly et al., 2012) (Figura 2).

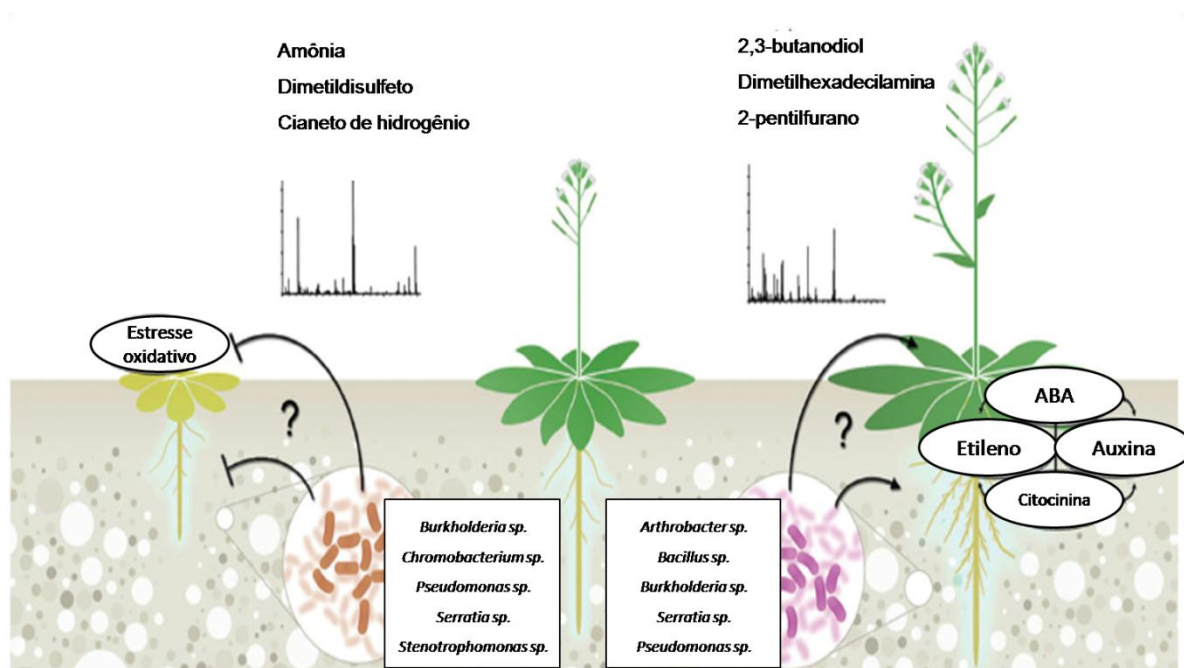


Figura 2 - Promoção do crescimento por compostos voláteis bacterianos. Em solos heterogêneos, os microrganismos podem produzir concentrações de compostos que inibem (esquerda) ou melhoram (direita) os efeitos da produtividade vegetal. Os efeitos vão desde a morte até o aumento de biomassa aérea e radicular. Poucas moléculas bioativas têm sido identificadas dentro da gama de VOCs produzidos por bactérias. O envolvimento de diferentes vias hormonais no processo tem sido sugerido. Os pontos de interrogação indicam ausência de informações quanto aos tecidos alvo dos VOCs. Adaptado de Bailly et al. (2012).

Muitos fungos associados às plantas produzem compostos voláteis com funções de promoção do crescimento e indução de defesa vegetal. Compostos voláteis liberados por *Alternaria alternata*, *Penicillium charlesii* e *P. aurantiogriseum* promoveram acumulação de amido em diferentes espécies, assim como indução de crescimento (Ezquer et al., 2010). O composto 1-octeno-3-ol, comumente produzido por fungos, induziu expressão de vários genes das vias de defesa dependentes de ácido jasmônico/etileno em *A. thaliana*. Plantas tratadas com este composto apresentaram aumento na resistência contra o fungo patogênico *Botrytis cinerea*, sugerindo que as plantas podem reconhecer certos compostos voláteis originários de fungos como um padrão molecular associado a microrganismo (Kishimoto et al., 2007). Entretanto, outros fungos apresentam respostas contrárias inibindo o crescimento e o desenvolvimento vegetal. VOCs produzidos por corpos de frutificação de ectomicorrizas *Tuber borchii*, *T. indicum* e *T. melanopsorum* inibem o desenvolvimento foliar e radicular de *A. thaliana* e seu hospedeiro *Cistus incanus*, causando fitotoxicidade em alguns casos. Quando os dez principais VOCs foram testados individualmente, a maioria deles afetou negativamente a germinação de sementes, alongamento da raiz primária e o crescimento foliar de *A. thaliana* (Splivallo et al., 2007).

Fungos também produzem compostos voláteis que exibem atividade antibacteriana e antifúngica. VOCs produzidos por *Pleurotus ostreatus* inibem o crescimento de várias espécies de bactérias (Beltran-Garcia et al., 1997). *Muscodor albus*, fungo endofítico, libera uma mistura de VOCs, incluindo 1-butanol e 3-metil-acetato, que inibem ou matam uma gama de bactérias, fungos e oomicetos (Strobel et al., 2001).

Muitos compostos voláteis liberados por fungos são importantes no controle do seu desenvolvimento, funcionando como "hormônios". Colônias de *Trichoderma* spp. produzem VOCs que induzem formação de conídios nas colônias vizinhas, mesmo na ausência de luz (Leeder et al., 2011). Outros compostos mimetizam aqueles produzidos por flores ao atrair insetos polinizadores. Esse mimetismo permite que os insetos sejam atraídos e assim dispersem os esporos fúngicos, processo fundamental na colonização secundária, desenvolvimento de doença e no processo reprodutivo (Bruce et al., 2005).

2.2.4. Papel dos compostos voláteis bacterianos na promoção do crescimento vegetal

Os organismos têm redes integradas de sinalização que lhes permitem reconhecer o ambiente e outros organismos e fazer mudanças em níveis molecular, celular e de desenvolvimento. Como o reconhecimento ocorre por meio de moléculas específicas, uma vasta gama de proteínas e de metabólitos desempenha um papel chave neste processo (Bitas et al., 2013). Muitos outros organismos têm adicionalmente, a habilidade de explorar esses mecanismos em outros organismos para se beneficiarem de relações como a simbiose (Bonfante et al., 2009; Bednarek et al., 2010).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB) são microrganismos presentes naturalmente nos solos, e que colonizam o sistema radicular, folhas, flores, tecidos internos e estimulam a promoção do crescimento por diversos mecanismos como pela produção de hormônios vegetais como auxinas (Loper et al., 1986) e giberelinas (Mac Donald et al., 1986) e pelo aumento da disponibilidade de nitrogênio no solo (Lin et al., 1983). Um novo mecanismo de indução da promoção do crescimento, pela produção de compostos voláteis, por bactérias promotoras do crescimento vegetal, foi descrito por Ryu et al.(2003), sendo este mecanismo capaz de aumentar em até cinco vezes a biomassa vegetal (Bailly et al., 2012). Além da promoção do crescimento, a produção de compostos voláteis por rizobactérias promotoras do crescimento vegetal pode elicitar a resistência sistêmica induzida (Ryu et al., 2004), mediar direta ou indiretamente o aumento da tolerância a estresses abióticos como salinidade, estresse hídrico e aumentar a nutrição vegetal (Liu et al., 2015).

A maioria dos estudos que investiga o efeito dos compostos voláteis na promoção do crescimento utiliza como metodologia placas de Petri bipartidas, que permitem a troca gasosa enquanto previnem a difusão de outros metabólitos não voláteis através do meio de cultura. Adicionalmente, utiliza-se *A. thaliana* como planta modelo, e o crescimento vegetal é feito em meio de cultura MS suplementado com sacarose (Murashige et al., 1962). Geralmente, quando outros meios são utilizados como o meio LB, que é mais alcalino e tem proteínas hidrolisadas, os efeitos vegetais da exposição aos compostos voláteis são alterados (Bailly et al., 2012).

Além da produção de CO₂, que provavelmente contribui moderadamente para a promoção do crescimento observada em ensaios que utilizam placas de Petri (Van der Kooij et al., 1999; Kai et al., 2009a), outros compostos voláteis também contribuem neste processo (Bailly et al., 2012). O composto volátil 2,3-butanodiol liberado por *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens* é o responsável pela promoção do crescimento observada em *A. thaliana* quando em cocultivo com as bactérias (Figura 2). Este composto é o produto final do processo de fermentação que é utilizado por certas bactérias para evitar a acidificação (Ryu et al., 2003). A aplicação exógena do composto sintético e a utilização de mutantes defectivos na via de sua produção confirmaram os resultados obtidos (Farag et al., 2006; Ryu et al., 2003). O cocultivo de *A. thaliana* com *Bacillus* também foi capaz de induzir a resistência sistêmica contra *Erwinia carotovora* (Ryu et al., 2004).

A produção de 2,3-butanodiol por *Pseudomonas chlororaphis* também promoveu o crescimento de tabaco e aumentou a resistência contra *E. carotovora*, mas não contra *P. syringae* pv. *tabaci* (Han et al., 2006). Outras espécies de bactérias associadas com a rizosfera como *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus epidermidis* produzem VOCs, embora ainda não totalmente identificados, promovem o crescimento de *A. thaliana* (Vespermann et al., 2007). Embora o butanodiol tenha se destacado como um VOC promotor do crescimento vegetal, dois outros compostos têm promovido o crescimento quando aplicados de forma pura: o dimetilhexadecilamina, que aumentou a biomassa de *M. sativa* em cerca de 1,4 vezes, e o 2-pentilfurano, que dobrou a biomassa de *A. thaliana* (Velázquez-Becerra et al., 2011; Bailly et al., 2012) (Figura 2).

Na avaliação do crescimento de mutantes defectivos para uma ou mais vias hormonais de *A. thaliana* em resposta aos compostos de *Bacillus*, foi demonstrado que alguns mutantes (*ein2* e *cre1*) responderam aos VOCs de *B. subtilis* mas não àqueles de *B. amyloliquefaciens* (Ryu et al., 2003). Adicionalmente, a indução da resistência contra *E. carotovora* por VOCs de *B. subtilis* é uma via de sinalização dependente de etileno, embora não seja para *B. amyloliquefaciens* (Ryu et al., 2004). Já as vias de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno são requeridas para tolerância à seca promovida por VOCs de *P. chlororaphis*. A diminuição da abertura dos estômatos induzida por 2R,3R-butanodiol, desta forma, reduz a perda de água, contribuindo para o fenótipo de tolerância (Cho, 2008).

Outros estudos com linhas transgênicas de *A. thaliana*, expressando glucuronidase (GUS) ligada ao promotor que responde à auxina, mostraram que este hormônio é fundamental na indução de promoção de crescimento por VOCs de *Bacillus*. Outros hormônios também estão envolvidos neste processo. A maioria dos genes diferencialmente expressos em resposta a VOCs de *Bacillus* está envolvida em modificação de parede celular, metabolismo, resposta a estresse e regulação hormonal (Zhang et al., 2007).

Adicionalmente, os VOCs de *Bacillus* foram responsáveis pelo aumento da eficiência fotossintética e conteúdo de clorofila em *A. thaliana* por modulação de açúcar endógeno e sinalização de ácido salicílico, fornecendo, desta forma, recursos para a promoção do crescimento vegetal. A tolerância ao estresse salino, conferida pelos VOCs, requer *HKT1*, um gene que codifica um transportador de Na⁺ de alta afinidade. Em situação de estresse (100mMNaCl), *HKT1* foi reprimido em raízes mas induzido na parte aérea, reduzindo o acúmulo geral de Na⁺ (Zhang et al., 2008).

2.3. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Entre as bactérias endofíticas já caracterizadas e promotoras do crescimento vegetal, está a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma das primeiras bactérias endofíticas diazotróficas isoladas de cana-de-açúcar, em 1988, e que coloniza raiz, caule e folhas de plantas ricas em açúcar (Cavalcante et al., 1988; Reis et al., 1994). Sua colonização também foi observada em culturas como arroz (Muthukumarasamy et al., 2005), cenoura, rabanete e beterraba (Madhaiyan et al., 2004) e em hospedeiros não nativos como milho (Riggs et al., 2001) e trigo (Luna et al., 2010). Mais recentemente, a colonização endofítica e os efeitos na promoção do crescimento, fisiologia vegetal e na ativação da defesa foram caracterizados durante a interação entre *G. diazotrophicus* e *A. thaliana* (de Souza et al., 2015).

G. diazotrophicus é uma bactéria pertencente à família Acetobacteriaceae, gram-negativa, ácido-tolerante, aeróbica obrigatória, com células medindo 0,7 a 0,9 µm por 1-2µm, com flagelos laterais, não formando esporos nem nódulos. Cresce bem em meio de cultura a 30° C, pH de 5,5 e altas concentrações de sacarose (10%). Entretanto, tolera pH mais baixos (inferiores a 3,0),

concentrações de sacarose de até 30 % em meio de cultivo e tem a habilidade de fixar nitrogênio somente em condições de microaerofilia (Cavalcante et al., 1988; Stephan et al., 1991). Apresenta boa adaptação a outras condições extremas como temperaturas elevadas e altas concentrações de sal em meio de cultura (Tejera et al., 2003).

A associação existente entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar é denominada “endofítica obrigatória”, uma vez que a bactéria se limita ao interior da planta, não sobrevivendo no solo (Baldani et al., 1997). Sua colonização, que não causa sintomas visíveis de doença ou mudanças na anatomia vegetal, ocorre nos espaços intercelulares da raiz e adjacentes aos vasos xilemáticos (Dong et al., 1997) do colmo, sendo encontrada também em folhas. O mecanismo sugerido para entrada e permanência de *G. diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar é por meio de junções de raízes laterais do apoplasto radicular com células da ponta da raiz (James et al., 1994).

G. diazotrophicus é capaz de fixar ativamente nitrogênio atmosférico, fornecendo grandes quantidades a seus hospedeiros, sendo capaz de excretar 50% do nitrogênio fixado, favorecendo o crescimento da planta hospedeira (Cojho et al., 1993). Entre as enzimas, presentes na bactéria, essenciais no processo de fixação de nitrogênio, estão a nitrogenase, a levansucrase e a pirroloquinolinaquinona glicose-desidrogenase (PQQ-GDH), enzima que, em *G. diazotrophicus*, atua na oxidação de glicose em ácido glucônico no ambiente extracelular. Durante a fixação biológica de nitrogênio, a atuação de PQQ-GDH é fundamental, produzindo grande quantidade de energia para a bactéria, já que a ação da nitrogenase demanda alta concentração energética (Galar et al., 1995; Eskin et al., 2014).

Os mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento vegetal promovido por *G. diazotrophicus* englobam outros processos como a produção de fitormônios (Muthukumarasamy et al., 2005). A bactéria é capaz e de produzir ácido 3-indol-acético (AIA) e giberelinas A1 e A3 (Fuentes-Ramirez et al., 1993; Bastian et al., 1998). *G. diazotrophicus* sintetiza bacteriocinas, cuja atividade de lisossima inibe o crescimento do patógeno de cana-de-açúcar *Xanthomonas albilineans* (Pinon et al., 2002) e produz sideróforos dos tipos salicilato e catecolato (Logeshwaran et al., 2009). Adicionalmente, produz levansucrase (LsdA), que permite à bactéria utilizar sacarose como fonte de carbono, levando

esse consumo a uma acumulação de ácidos glucônicos acarretando na acidificação do meio. O acúmulo de ácidos pode promover solubilização de zinco e outros compostos fosfatados inorgânicos no solo, que, posteriormente, se tornam disponíveis à planta hospedeira (Saravanan et al., 2007; Intorne et al., 2009).

Uma biblioteca de mutantes de inserção de *G. diazotrophicus*, desenvolvida por nossa equipe, permitiu identificar genes com papéis importantes durante a interação planta - microrganismos. Estes genes estão envolvidos com a solubilização de zinco e fósforo (Intorne et al., 2009) e com a resistência a metais como cobalto, zinco e fósforo (Intorne et al., 2012). Com o sequenciamento da estirpe PAL-5 de *G. diazotrophicus*, em que foram identificadas 3.864 sequências codificantes, 1077 proteínas hipotéticas, sendo 583 já identificadas e relacionadas a alguma via metabólica (Bertalan et al., 2009), abriram-se novas perspectivas para estudos de genômica funcional com o objetivo de entender os mecanismos moleculares envolvidos nas interações planta-bactéria endofítica.

2.4. *Arabidopsis thaliana*: modelo de estudo em biologia molecular de plantas

Arabidopsis thaliana é uma pequena planta anual pertencente à família da (Cruciferae ou Brassicaceae), que inclui plantas morfologicamente diferentes mas estreitamente ligadas como a colza, a couve-flor, rabanete e mostarda. Sua primeira descrição foi feita por Johannes Thal (de onde deriva seu nome) nas montanhas de Harz no Norte da Alemanha em 1577 (Meinke et al., 1998).

O pesquisador Friedrich Laibach foi o primeiro a publicar, em 1907, um influente estudo citogenético sobre *A. thaliana* (Somerville et al., 2002). Com o passar do tempo, novas pesquisas foram sendo feitas e a popularidade de *A. thaliana* decolou a partir da década de 1980, quando os pesquisadores aliaram, de forma bem-sucedida, a genética com poderosas ferramentas de biologia molecular. Em 2000, com o sequenciamento do DNA genômico do ecótipo Col-0 concluído, sendo *A. thaliana* a primeira planta e o terceiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado (Initiative, 2000), diversas informações como estrutura, expressão e produtos gênicos, mapa do genoma, marcadores genéticos se tornaram disponíveis à comunidade científica. Aliada à

rapidez e à facilidade com que os experimentos com *A. thaliana* são conduzidos, um enorme avanço nos campos de genética, desenvolvimento vegetal, biologia celular, fisiologia e metabolismo foi obtido (Krämer, 2015). Muitos campos de estudos têm expandido seus conhecimentos pela utilização desta planta, como, por exemplo, a biologia de sistemas (Brady et al., 2007; Endo et al., 2014). Mais recentemente, o seu estudo tem fornecido novos entendimentos moleculares no contexto ecológico evolucionário em ambiente natural (Zust et al., 2012).

Arabidopsis thaliana é nativa da Eurásia Ocidental, sendo uma espécie de planta colonizadora e pioneira em ambiente de solos pedregosos e rasos. Pode ser encontrada também em ambientes pobres em nutrientes, arenosos e em habitats florestais (Mitchell-Olds et al., 2006) e se encontra distribuída por vários continentes principalmente nas regiões temperadas do hemisfério norte (Meinke et al., 1998) (Figura 3).



Figura 3 - Distribuição mundial de *A. thaliana*. As áreas em vermelho correspondem à distribuição continental. (Krämer, 2015).

Arabidopsis thaliana não é uma planta de interesse econômico, entretanto algumas das suas características a tornam um poderoso modelo para estudos biológicos (Figura 4). Seu ciclo de vida, que inclui desde a germinação, formação

da roseta, florescimento e maturação das primeiras sementes, se completa em seis semanas. Sua fecundidade é alta, com uma produção de até 10.000 sementes por planta. Tem pequeno porte, facilitando seu cultivo e crescimento em condições controladas, requerendo somente solo úmido e luminosidade. Suas flores são pequenas e contêm anteras e pistilos, permitindo a autofecundação, o que facilita a geração de linhas mutantes e transgênicas. Seu genoma é reduzido, com cerca de 120 Mb organizados em cinco cromossomos, contendo aproximadamente 22.000 genes (Meinke et al., 1998).

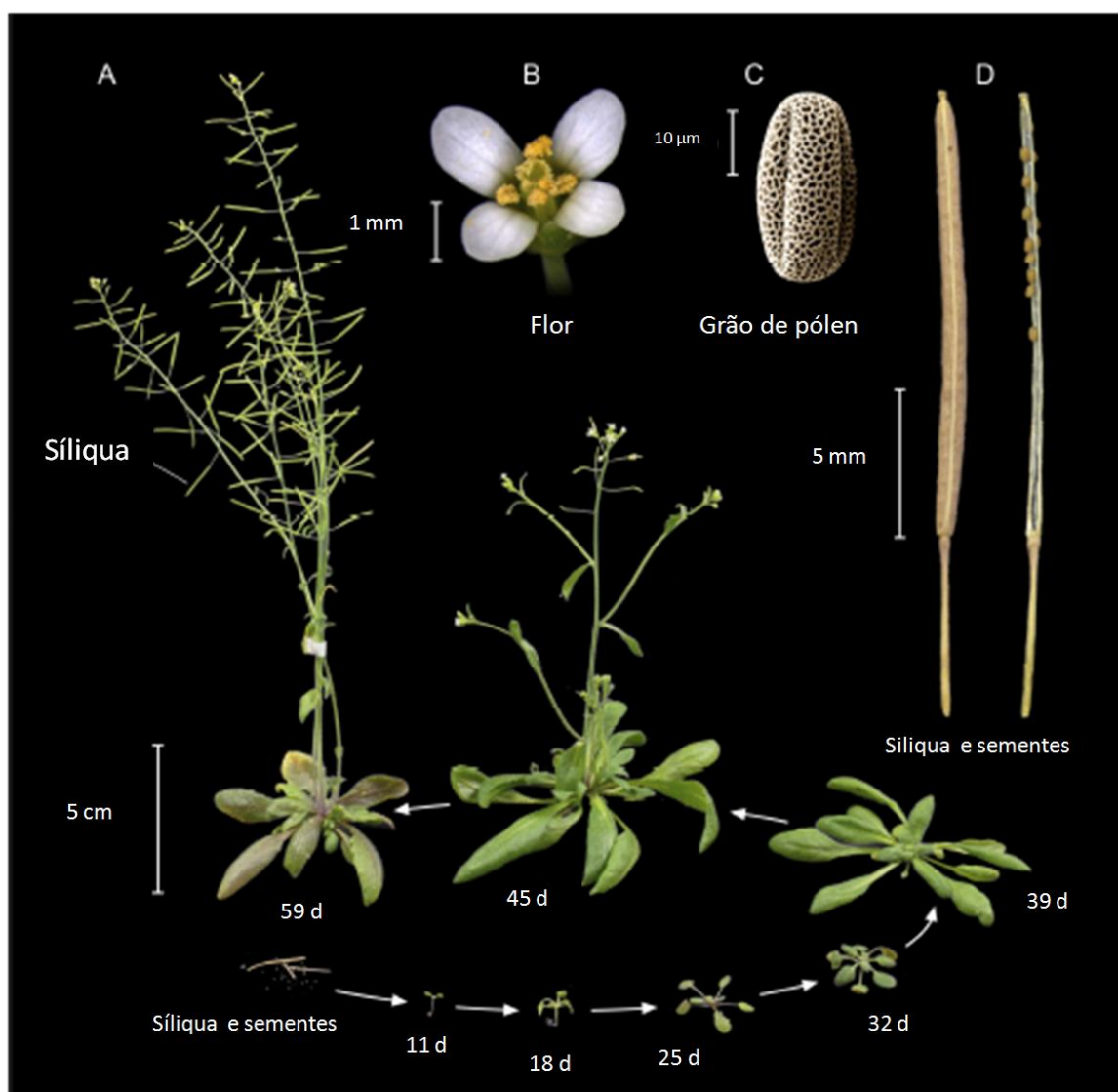


Figura 4 - Ciclo de vida de *A. thaliana*. (A) Ecótipo Col-0 em diferentes estágios do ciclo de vida: desde semente para plântula (11 dias), para crescimento vegetativo (39 dias) e crescimento reprodutivo (45 dias). (B) Fotografia de uma flor, (C) Micrografia eletrônica de varredura de um grão de pólen, (D) Fotografia de siliques maduras com suas sementes. Adaptado de Krämer (2015).

As raízes de plantas da família Brassicaceae não fazem, de forma natural, relações de simbiose com microrganismos (micorrizas e rizóbios), o que permite à planta utilizar toda sua energia para crescimento e reprodução, intensificando sua demanda da maquinaria energética para aquisição de nutrientes e para a proteção das raízes contra estresses ambientais (Krämer, 2015). Diferentes órgãos de *A. thaliana* fornecem habitat para diferentes comunidades microbianas como vírus, oomicetos, fungos, que são influenciadas pelo solo e pelo genótipo da planta (Bulgarelli et al., 2012; Schlaeppi et al., 2014). *A. thaliana* possui uma série de mecanismos de defesa contra diferentes microrganismos e herbivoria, entretanto, uma vez iniciado o crescimento reprodutivo, ele é favorecido em relação à sua defesa. Sua estratégia ecológica consiste em escapar do estresse por meio da alocação de nutrientes para a reprodução, seguida da sua rápida conclusão do ciclo de vida (Winter et al., 2011).

A. thaliana tem sido empregada como planta modelo para o entendimento dos processos de interação e colonização entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal (O'Callaghan et al., 2001), visto que os aspectos fundamentais envolvidos com o desenvolvimento vegetal, ação hormonal e vias de sinalização em resposta a condições ambientais já foram determinados nesta espécie (Meinke et al., 1998). Muitas pesquisas buscam transferir os conhecimentos obtidos com *A. thaliana* para plantas de interesse econômico para a agricultura e horticultura. A maioria dos estudos envolve tratamentos de folhas com fungos patogênicos, embora bactérias são empregadas algumas vezes, como é o caso do estudo da infiltração de folhas com pseudomonas (O'Callaghan et al., 2001).

Entre as interações já estudadas, está a relação entre *A. thaliana* e *G. diazotrophicus* (Cocking et al., 2006; de Souza et al., 2015). Embora *G. diazotrophicus* tenha sido isolada de cana-de-açúcar (Cavalcante et al., 1988), o estudo de sua interação com a planta hospedeira é muito dificultado pelo seu alto grau de ploidia, que limita a obtenção de mutantes e linhas transgênicas, ciclo de vida longo e alto porte, que impede seu cultivo em ambiente controlado. Neste sentido, são utilizados modelos vegetais de mais fácil cultivo que permitem mutações, garantindo a possibilidade de testar hipóteses acerca do papel particular de genes envolvidos na colonização por bactérias promotoras do

crescimento vegetal. Entre estes modelos estão tomate, ervilha, milho, arroz e *arabidopsis* (Cavalini et al., 2004).

Em estudos conduzidos por nossa equipe, em que se objetivou identificar a habilidade de *G. diazotrophicus* colonizar endofiticamente os tecidos de *A. thaliana*, promover o crescimento vegetal e ativar as respostas de defesa da planta durante a associação, foi constatado que *G. diazotrophicus* coloniza endofiticamente as raízes de *A. thaliana* e promove o crescimento por, possivelmente, aumentar a capacidade fotossintética e a eficiência do uso hídrico. Adicionalmente, os resultados mostraram a importância da defesa vegetal no controle da população endofítica de *G. diazotrophicus*. A utilização de *A. thaliana* como planta modelo neste processo de interação abriu interessantes perspectivas para as análises de mecanismos moleculares ativados durante o processo de interação planta - microrganismo (de Souza et al., 2015).

2.4.1. O papel das vias hormonais em *A. thaliana*

A interação entre os hormônios pode fornecer às plantas um grande potencial de regulação de mecanismos como a promoção do crescimento vegetal, mas, ao mesmo tempo, permite aos patógenos e a outros microrganismos, a manipulação da defesa para o seu benefício. Exemplo dessa estratégia é a infecção de *A. thaliana* por *P. syringae* que, ao injetar seus fatores de virulência, suprime a defesa vegetal principalmente por alterar a regulação hormonal de ABA e auxina, permitindo, assim, o desenvolvimento da doença (de Torres-Zabala et al., 2007). Evidências desse papel chave dos hormônios na defesa vegetal surgiram de estudos com *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* (tabaco), em que mutantes e linhas transgênicas com deficiências na síntese de hormônios apresentavam severas alterações em suas resistências. Tal regulação permite que as plantas rapidamente se adaptem a estresses bióticos e abióticos de uma maneira mais eficiente (Pieterse et al., 2009).

Muitos microrganismos também produzem fitormônios ou substâncias análogas para gerar um desbalanço hormonal e, conseqüentemente, manipular o sistema de defesa vegetal. Esse é um dos mecanismos usados por alguns patógenos para conferir virulência e causar doença. A produção de hormônios por bactérias endofíticas também pode gerar um desbalanço nos níveis vegetais de

hormônio e, indiretamente, influenciar a resposta imune da planta hospedeira (Bari et al., 2009). As diversas funções dos hormônios mostram que a sinalização responsável pela imunidade da planta está estritamente relacionada com o desenvolvimento vegetal, embora os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não estejam totalmente esclarecidos.

Estudos com *Arabidopsis thaliana* têm demonstrado que a defesa vegetal não é influenciada somente pela interação entre os hormônios ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. ABA demonstrou ser antagonista a defesa dependente de ácido salicílico; as auxinas estão envolvidas com a susceptibilidade a *Pseudomonas syringae* afetam a síntese de ácido jasmônico; as giberelinas regulam a degradação de proteínas DELLA, responsáveis pela susceptibilidade a patógenos biotróficos e resistência a patógenos necrotróficos, por meio da modulação entre a sinalização de ácido salicílico e ácido jasmônico. Citocininas e brassinoesteroides também estão envolvidos nos mecanismos de defesa vegetal, embora tais processos ainda não estejam totalmente esclarecidos (Navarro et al., 2008) (Figura 5).

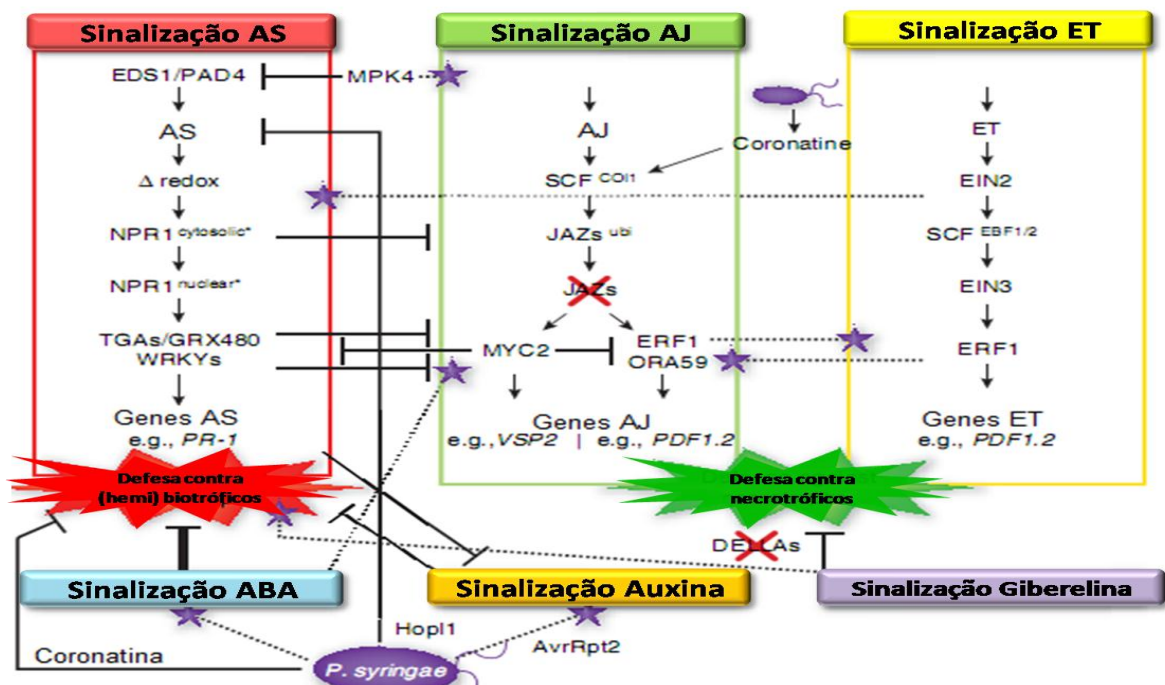


Figura 5 – Interação entre os fitormônios durante a defesa vegetal. Patógenos como *P. syringae* produzem proteínas efetoras (coronatina, Hop1 e AvrRpt2), que manipulam a resposta imune e promovem virulência. A sinalização de AS (ácido salicílico), AJ (ácido jasmônico) e ET (etileno) representa o eixo principal da defesa vegetal e os outros hormônios apenas integram essas sinalização (Pieterse et al., 2009) ⊥: efeito negativo; estrelas roxas: efeito positivo.

Além dos hormônios citados anteriormente, existem outras substâncias orgânicas naturais que apresentam uma grande atividade biológica quando aplicadas, exogenamente, em baixas concentrações. Entre elas, está o ácido salicílico. Durante o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade ao patógeno, é produzida, na proximidade da zona necrótica, uma maior quantidade de ácido salicílico. Uma parte do ácido entra no floema e pode ser detectado em outras folhas. Este aumento na síntese de ácido salicílico induz síntese de proteínas de resistência e desencadeia resistência a posteriores infecções (SAR) (Van Loon et al., 1998).

Para o entendimento do papel do ácido salicílico durante a defesa vegetal, muitos mutantes defectivos na produção ou percepção deste hormônio têm sido desenvolvidos. Tais mutantes não apresentam uma resposta sistêmica efetiva em resposta ao contato com o patógeno, demonstrando a importância deste hormônio durante o processo de sinalização e defesa vegetal. Linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* expressando o gene bacteriano *NahG* são incapazes de acumular ácido salicílico devido à degradação do mesmo pela enzima salicilato hidroxilase e, conseqüentemente, não desenvolvem resistência sistêmica adquirida decorrente da infecção patogênica (Dong, 2004).

A auxina também tem papel importante durante a defesa vegetal. Recentes estudos revelaram que este hormônio atua de forma integrada com outros hormônios vegetais, entre eles o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Evidências sugerem que auxina e ácido salicílico desempenham funções antagonistas durante a defesa das plantas, enquanto auxina e ácido jasmônico atuam de forma cooperativa (Kasan et al., 2009).

Muitos microrganismos podem produzir auxina como mecanismo de patogênese vegetal. Tal fato ocorre com as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia herbicola* e estirpes de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* e pv. *syringae*, bem como nas interações simbióticas mutualísticas (*Rhizobium* sp.), ou ainda, na promoção do crescimento vegetal por bactérias benéficas. Neste último grupo, estão incluídos membros do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Bacillus* bem como *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* e *G. diazotrophicus* (Patten et al., 2002).

Adicionalmente, as plantas frequentemente respondem a uma infecção com aumento na biossíntese de etileno. Acredita-se que o aumento na síntese

durante o ataque de um patógeno alivie o estresse causado por ele, uma vez que impede a difusão da doença por toda a planta. Entretanto, muitos fungos e bactérias patogênicas são capazes de produzir etileno como um fator de virulência, o que aumentaria sua habilidade de colonizar os tecidos vegetais (Chagué et al., 2006). Dessa forma, a inibição da síntese ou a não percepção do etileno pela planta pode diminuir significativamente a severidade de doenças, como a infecção de fungos (Bashan, 1994).

O controle do crescimento e a defesa vegetal estão interconectados por uma complexa rede de sinalização hormonal (Pieterse et al., 2009). Diante do contato com o microrganismo um desbalanço hormonal é desencadeado e ativa um conjunto gênico específico relacionado com a defesa (De Vos et al., 2005). Com o intuito de estudar todos os efeitos que os diferentes hormônios podem induzir nos tecidos vegetais em resposta às diferentes interações com microrganismos, vários mutantes envolvidos com a via de sinalização hormonal têm sido desenvolvidos. A disponibilidade de linhas mutantes de *A. thaliana* garante a possibilidade de avaliar o papel dos genes envolvidos na colonização por diferentes microrganismos, inclusive por bactérias promotoras do crescimento vegetal (O'Callaghan et al., 2001).

2.5. Proteômica: ferramenta para o estudo de interação planta - microrganismo

Análises globais dos diferentes componentes do sistema biológico como o DNA, RNA, proteínas e metabólitos estão disponíveis atualmente. Após o sequenciamento de diferentes espécies vegetais, muitas oportunidades de estudar as interações das plantas em resposta a diferentes ambientes se expandiram com a utilização das tecnologias "ômicas" (Vanderschuren et al., 2013). Nesta dinâmica, a proteômica, que permite identificar, de forma relativamente simples, o perfil proteico existente em uma célula (Aebersold et al., 2003; Yates, 2004), tem se tornado uma importante ferramenta no estudo dos processos e interações celulares, complementando os dados de transcriptômicas obtidos, uma vez que em muitas análises, é difícil fazer uma correlação positiva entre o nível de transcritos e a abundância de proteínas devido ao controle da

tradução dos mRNAs e à presença da transcrição antisense e da instabilidade de algumas proteínas (Baginsky et al., 2006).

O termo "proteômica" foi primeiramente empregado na década de 1990 (James, 1997) e por meio desta técnica se tornou possível a descrição de proteínas presentes no organismo assim como a caracterização dos níveis de modulação proteica e modificações em resposta a diferentes formas de perturbação (Baginsky, 2009). No estudo proteômico vegetal, inicialmente, empregava-se uma análise qualitativa que descrevia o perfil proteico em vários tecidos e organelas por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2-D PAGE), sendo os resultados descritos em uma lista de proteínas identificadas sem informações mais completas sobre a abundância e distribuição (Vanderschuren, et al., 2013). Os primeiros estudos identificaram proteínas presentes em diferentes tecidos e órgãos de arroz e *A. thaliana* (Komatsu et al., 1993; Kamo, et al., 1995). Com os avanços tecnológicos e o desenvolvimento da técnica de espectrometria de massas (MS) as análises proteômicas e quantificações de proteínas foram aperfeiçoadas (Vanderschuren et al., 2013) permitindo uma análise com ampla cobertura e com a possibilidade de caracterizar modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e formações de complexos proteicos (Baginsky, 2009).

Com a conclusão de diversos projetos de sequenciamento genômico de uma variedade de organismos, a identificação de proteínas baseada na fragmentação de peptídeos, utilizando a espectrometria de massas, se tornou quase automatizada. O sucesso desta técnica foi impulsionado pelo desenvolvimento de métodos de ionização proteica como a ionização por eletropulverização (ESI) ou a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) (Vanderschuren et al., 2013). O emprego adicional da cromatografia líquida de alta pressão (LC) para a separação inicial de peptídeos aumentou o número de proteínas identificadas e o entendimento de suas dinâmicas (Eriksson et al., 2007; Domon et al., 2010). Os dados obtidos com a técnica de LC-MS puderam ser, desta forma, empregados para análises de quantificações livres de marcação, que agora são largamente empregadas como um método de relativo baixo custo e alta performance para comparar um grande número de amostras (Neilson et al., 2011), por meio da intensidade de íons de peptídeos idênticos ou por espectro de cada proteína obtida (Schulze et al., 2010).

A primeira análise de proteômica em larga escala foi realizada com *A. thaliana* onde foram identificadas 13.000 proteínas únicas em diferentes órgãos (Baerenfaller et al., 2008), fornecendo importantes informações quanto ao desenvolvimento da planta. Dinâmicas proteicas durante processos biológicos como desenvolvimento vegetal e respostas de defesa em relação a estresses bióticos e abióticos também têm sido avaliadas por meio das técnicas de proteômica (Vanderschuren et al., 2013). Os dados são complementados aos obtidos por outras "ômicas" e testados em plantas modelo, fornecendo uma rede de informações da resposta vegetal aos estresses (Gupta et al., 2013) (Figura 6).

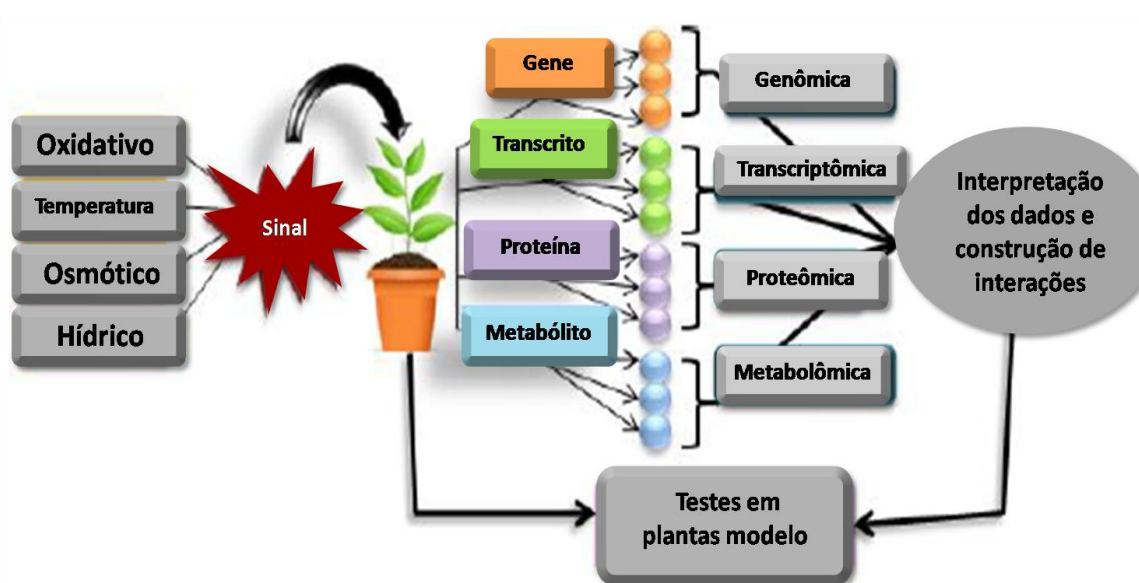


Figura 6 - Abordagem geral de aplicação das diferentes "ômicas" para construção de interações e interpretação de dados no estudo de respostas vegetais a estresses abióticos. Adaptado de Grupta et al. (2013).

Análises proteômicas de plantas expostas a compostos voláteis bacterianos também têm fornecido novas informações quanto à resposta vegetal a microrganismos. Plantas de *A. thaliana* quando expostas à rizobactéria *Bacillus subtilis* GB03, apresentaram indução da expressão de proteínas, associadas com a gliconeogênese, o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), a biossíntese de etileno, a síntese de antioxidantes e com proteínas relacionadas às vias dos ácidos jasmônico e salicílico, sugerindo existência de um mecanismo orquestrado de regulação vegetal, que culmina na promoção do crescimento e indução da resistência por compostos voláteis (Kwon et al., 2010).

Neste contexto, a proteômica têm se tornado de suma importância no entendimento da composição, modulações e modificações dos proteomas de diversas espécies vegetais e em diversas interações biológicas. As informações obtidas, aliadas aos dados de transcriptômica e metabolômica facilitarão a descoberta e validação de proteínas candidatas e suas dinâmicas em espécies de interesse econômico, sendo de significativo potencial para o avanço de programas de melhoramento vegetal (Vanderschuren et al., 2013).

3. ESTRATÉGIAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL PRESENTES EM *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Os microrganismos promotores do crescimento vegetal têm sido alvo de intensas pesquisas na busca por soluções alternativas para uma agricultura mais sustentável. São muitos os mecanismos, diretos e indiretos, empregados por estes organismos para promover o crescimento vegetal. Entre eles, podemos citar a produção de compostos voláteis. *G. diazotrophicus* está entre as bactérias estudadas e tem características para a promoção do crescimento vegetal, tais como a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios e solubilização de nutrientes de interesse agronômico.

Os trabalhos desenvolvidos por nossa equipe visam a caracterizar os mecanismos moleculares de interação entre plantas e microrganismos benéficos, mais especificamente com a *G. diazotrophicus*. Tais estudos buscam compreender a eficiência da colonização de plantas por bactérias endofíticas promotoras do crescimento, pelo estudo dos genes, vegetais e bacterianos, envolvidos com o processo de colonização, de promoção do crescimento vegetal e de modulação da resposta vegetal.

Em trabalhos mais recentes, nossa equipe desenvolveu uma biblioteca de mutantes de inserção de *G. diazotrophicus*, que abriu novas perspectivas para a compreensão do envolvimento dos genes da bactéria no processo de colonização vegetal. Tal ferramenta também permitiu a identificação e a caracterização de mutantes defectivos tanto para a solubilização de zinco e fósforo, quanto para a resistência aos metais cádmio, zinco e cobalto. Paralelamente, trabalhos de

interação da bactéria com *A. thaliana* foram conduzidos com o intuito de entender os mecanismos envolvidos no processo de colonização. Nestes trabalhos, foram confirmadas a colonização endofítica de raízes de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus*, com indução da promoção do crescimento e a ativação da defesa vegetal.

Neste trabalho, temos como objetivo demonstrar que *G. diazotrophicus*, além dos mecanismos já caracterizados, produz compostos voláteis com capacidade de promoção do crescimento de plantas. Para atingir tal objetivo, a estratégia empregada foi baseada na exposição de plantas de *A. thaliana*, em condições *in vitro* e em solo, aos VOCs produzidos por *G. diazotrophicus*, com posterior análise de ganho de biomassa. Em seguida, os efeitos foram avaliados em mutantes para as vias hormonais de ácido salicílico, etileno, ácido abscísico, ácido jasmônico e auxina. Visando a caracterizar a produção da amônia pela bactéria e sua participação no processo de promoção do crescimento, o composto foi quantificado e plantas de *A. thaliana* foram expostas a ele, com posterior análise de promoção do crescimento. A relevância da fixação biológica de nitrogênio, feita pela bactéria, no processo de promoção do crescimento vegetal, foi verificada pela utilização da bactéria *G. diazotrophicus* mutante para a via de PQQ, que é incapaz de fixar nitrogênio. Posteriormente, vias moleculares reguladas em *A. thaliana*, na presença dos VOCs, foram caracterizadas por análises proteômicas.

A caracterização da promoção do crescimento, por compostos voláteis, promovida por *G. diazotrophicus*, enriquece o conhecimento acumulado pelo grupo. O estudo com mutantes para vias hormonais, aliado à caracterização de proteínas diferencialmente reguladas, nas plantas, fornece novos caminhos para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de interação endofítica e promoção do crescimento vegetal feito por bactérias benéficas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo estudar os efeitos de compostos voláteis (VOCs) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na promoção do crescimento vegetal.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os efeitos dos VOCs de *G. diazotrophicus* no crescimento do ecótipo de *A. thaliana* Columbia (Col-0);
- ✓ Avaliar a importância de diferentes vias de produção e percepção hormonal vegetal, no processo de promoção do crescimento de *A. thaliana*, induzida pelos VOCs;
- ✓ Quantificar a produção de amônia por *G. diazotrophicus* tanto na forma volátil, quanto dissolvido em meio de cultivo;
- ✓ Avaliar a participação da amônia, liberada por *G. diazotrophicus*, na promoção do crescimento de *A. thaliana*;
- ✓ Avaliar a relevância da fixação biológica de nitrogênio, de *G. diazotrophicus*, na promoção do crescimento de *A. thaliana*, induzida por VOCs;
- ✓ Avaliar o efeito dos VOCs, liberados por *G. diazotrophicus*, na promoção do crescimento, em plantas de *A. thaliana*, cultivadas em solo;

✓ Avaliar as principais vias moleculares reguladas em plantas de *A. thaliana* quando expostas aos VOCs produzidos por *G. diazotrophicus*, por meio de análises proteômicas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Microrganismos, meios e condições de cultivo

A estirpe selvagem *G. diazotrophicus* PAL5 utilizada neste trabalho foi obtida da Coleção de Culturas de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil), e gentilmente cedida pelo Dr. Fábio Lopes Olivares, do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/UENF). O mutante de *G. diazotrophicus*, defeitivo para o gene *pqqC*, foi obtido por mutagênese insercional, utilizando o kit EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre, Madison, WI, USA) e isolado de uma biblioteca de 2554 mutantes. O gene interrompido pelo transposon no mutante foi identificado pelo sequenciamento das regiões flangeadoras do sítio de inserção do transposon (Intorne et al., 2009).

Para a obtenção da cultura estoque, uma colônia isolada de *G. diazotrophicus* e uma do mutante $\Delta pqqC$ foram cultivadas em meio DYGS modificado, contendo 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. Meio sólido: 15,0 ágar (Baldani et al., 2014) a 30 °C (Cavalcante et al., 1988) e cultivada até a obtenção de uma cultura na densidade óptica (DO_{600nm}) igual a 1,0, correspondendo à concentração de 10⁸ CFU/mL. A densidade óptica foi determinada pela utilização de um espectrofotômetro marca UV1800 Shimadzu.

Um volume de 750 μL desta cultura foi transferido para tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 250 μL de glicerol 50%. As culturas estoque foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Das colônias estoques, foram obtidas colônias isoladas, que foram cultivadas em meio DYGS, sob constante agitação e temperatura (250 min^{-1} e 30°C), em agitador-incubador orbital (C25Incubator, marca New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA), até a obtenção de uma cultura bacteriana com densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) igual a 1,0, que foi empregada nos experimentos. Para o cultivo do mutante $\Delta ppqC$ foram adicionados, no meio DYGS, $2\mu\text{l.mL}^{-1}$ do antibiótico canamicina ($50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$).

5.2. Material vegetal e condições para cultivo

Sementes de *A. thaliana* do ecótipo Columbia (Col-0) bem como dos demais mutantes utilizados (*ein3-1*, *sid2-2*, *eds16*, *abi4*, *aux1-7*, *jar1* e *eds1*), Figura 7, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Frederick Ausubel (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). As sementes foram submetidas à desinfestação superficial em etanol 95% durante 2 min, seguida de solução de hipoclorito de sódio 2,5%, sob agitação, por 10 min. O excesso desses reagentes foi removido mediante seis lavagens em água ultrapura estéril. As sementes foram mantidas por 2 dias, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, na ausência de luz, antes da semeadura.

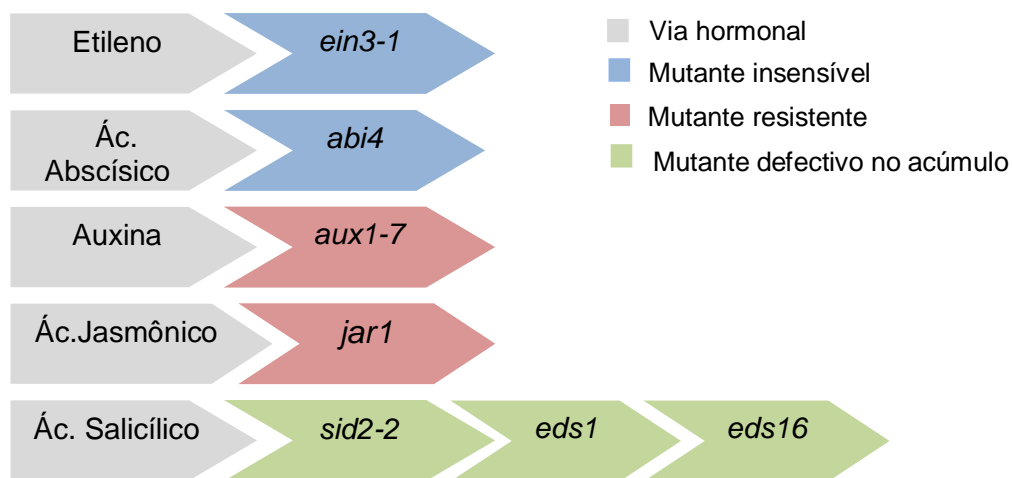


Figura 7 - Características dos mutantes hormonais de *A. thaliana* utilizados no trabalho. (TAIR, 2016).

5.3. Exposição de plantas de *A. thaliana* a VOCs produzidos por *G. diazotrophicus*, em placas de 24 poços

Para determinar se os VOCs liberados por *G. diazotrophicus* promovem o crescimento do ecótipo Col-0 e dos mutantes hormonais de *A. thaliana*, foi feito ensaio de cocultivo, evitando o contato físico entre o inóculo bacteriano e a planta, a partir da utilizando placas de 24 poços. Nessas placas, uma semente foi colocada em cada poço, que continha 1mL de meio Murashige-Skoog (MS) (Murashige, et al., 1962) ½ força com 1,5% ágar, 3% de sacarose e 0,05% do tampão ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (MES). Dependendo do experimento, 6 ou 8 poços da placa foram preenchidos com 1mL de meio DYGS sólido (1,5% ágar) e foram inoculados 5µL/poço da suspensão bacteriana de *G. diazotrophicus* ou do seu mutante $\Delta ppqC$ na concentração de 10^8 CFU/mL. Plantas cultivadas na presença de meio DYGS foram utilizadas como controle. As placas foram acondicionadas em sala de cultivo a 22 °C, 60% de umidade relativa e $70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz com fotoperíodo de 12/12h.

Para avaliação do efeito da amônia na indução da promoção do crescimento do ecótipo Col-0, foi feito experimento de cocultivo de *A. thaliana* e amônia. Em cada placa de 24 poços, 8 foram preenchidos com 1mL da solução de amônia na concentração de 5mM (valor detectado de amônia liberada por *G. diazotrophicus*). Plantas cultivadas na presença de água foram utilizadas como controle.

Para confirmar se a amônia, isoladamente, promoveria o crescimento de *A. thaliana*, foi feito experimento de cocultivo de *A. thaliana* e *G. diazotrophicus* na presença de ácido fosfórico. O ácido fosfórico reage com a amônia formando fosfato de amônio (Ryden et al., 1984). A formação do fosfato diminui a quantidade de amônia volátil presente e, desta forma, sua atuação. No experimento, foram empregadas placas de 24 poços, tendo sido colocada, na primeira e quarta fileiras (6 poços/cada), uma semente em cada poço que continha 1mL de meio MS sólido; na terceira fileira, cada poço foi preenchido com 1mL de meio DYGS sólido e foi inoculado 5µL/poço da suspensão bacteriana de *G. diazotrophicus*; e na segunda cada poço foi preenchido com 1mL da solução de 0,74mM H_3PO_4 , de acordo com o descrito por Weise e colaboradores (2013). Plantas cultivadas na presença de água foram utilizadas como controle.

Em todos os experimentos a promoção do crescimento foi determinada por análise da biomassa fresca total, com a utilização de uma balança analítica, 21 dias após a realização do experimento. As plantas de cada placa foram avaliadas individualmente, tendo sido empregadas 7 placas por tratamento.

Para avaliar a alteração do pH do meio de cultura na presença das diferentes bactérias e da amônia, cada experimento foi repetido na presença do meio MS com indicador de pH (5 mL/L azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH). Após 21 dias, o pH foi aferido por meio de pHmetro de bancada digital (Modelo DM-23, marca Digimed).

5.4. Exposição de plantas de *A. thaliana*, cultivadas em solo, aos VOCs produzidos por *G. diazotrophicus*

Para verificar se a promoção do crescimento de *A. thaliana* por VOCs de *G. diazotrophicus* aconteceria em condições *ex vitro*, foram conduzidos ensaios de cultivo em solo. Para tal, sementes do ecótipo Col-0 foram colocadas, individualmente, em copos plásticos de 50mL contendo uma mistura autoclavada de substrato comercial *West Garden* e vermiculita, na proporção 2:1. Todos os copos foram acondicionados em bandejas plásticas, sendo 40 copos por bandeja. Destes 40 copos, 5 (1ª fileira) foram preenchidos, cada um com 10mL dos seguintes tratamentos: água ultrapura autoclavada ou suspensão bacteriana de *G. diazotrophicus* na concentração de 10^8 CFU/mL. As bandejas foram lacradas com duas camadas de filme PVC e acondicionadas em sala de cultivo a 22 °C, 60% de umidade relativa e $70 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz, com fotoperíodo de 12/12h.

A cada 5 dias a água e a suspensão de *G. diazotrophicus* foram trocadas por meio de uma seringa. Após 21 dias, a promoção do crescimento foi determinada por análise da biomassa fresca aérea e radicular, com a utilização de uma balança analítica, e pelo comprimento radicular da raiz primária, com a utilização de um paquímetro. As plantas de cada bandeja foram avaliadas individualmente.

5.5. Determinação dos níveis de emissão de amônia por *G. diazotrophicus*

Para a quantificação da emissão de amônia volátil, placas de 6 poços foram utilizadas. Em 3 dos compartimentos, 40µL da suspensão bacteriana de *G. diazotrophicus*, na concentração de 10^8 CFU/mL, foram aplicados no meio DYGS sólido. Em um quarto compartimento, vazio, uma fita de teste de amônia Quantofix® (Macherey e Nagel, Duren, Alemanha) foi depositada e um orifício de cerca de 0,1cm foi feito na tampa na direção da fita, sendo fechado com parafilme para evitar contaminações e trocas de gases, como descrito por Kai et al. (2010). Após 5, 15 e 30 dias de incubação, uma microsseringa foi injetada por meio do orifício e 10µL de água ultrapura foram aplicados na direção da fita para que a reação química fosse iniciada. Trinta segundos após, a reação química foi paralisada pela injeção, na direção da fita, de 10µL de NaOH (32%). Placas contendo somente meio DYGS foram utilizadas como controle. Cada análise foi composta por 3 repetições.

A mudança de coloração obtida foi documentada e comparada com uma curva padrão de calibração, como descrito por Kai et al. (2010), visto que o kit é empregado para quantificações em solução aquosa. Para esta curva, foram utilizadas placas de Petri bipartidas descartáveis. Em um dos compartimentos 10mL de solução de amônia (hidróxido de amônia) nas concentrações de (0, 1, 2, 5, 10, 20 e 100mM) foram aplicados. No compartimento vazio, foi inserida a fita teste de amônia Quantofix®. Após 24h, a quantificação foi feita, como descrito anteriormente.

Com o intuito de avaliar se haveria liberação de amônia em meio de cultura, na presença de *G. diazotrophicus*, foi conduzido um ensaio de quantificação. Para tal, foi obtida uma cultura bacteriana com densidade óptica (DO_{600nm}) igual a 1,0. Neste ponto, em 5mL da cultura, foram aplicadas 10 gotas de NaOH (32%), com posterior agitação e quantificação, utilizando a fita. A coloração obtida foi comparada com a curva de calibração descrita no kit. Nesta mesma cultura, foi aferido o pH por meio de um pHmetro de bancada digital (Modelo DM-23, marca Digimed). O meio DYGS, mantido nas mesmas condições da cultura, foi utilizado como controle. Cada análise foi composta por 3 repetições.

5.6. Crescimento de *A. thaliana* em meio de cultivo com diferentes valores de pH

A influência do pH do meio de cultura no crescimento de *A. thaliana* foi avaliada pelo cultivo, em placas, de 6 poços, do ecótipo Col-0, em meio MS líquido com diferentes valores de pH (5-10). As placas foram mantidas em sala de cultivo a 22 °C, 60% de umidade relativa e 70 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luz com fotoperíodo de 12/12h. O crescimento foi determinado por análise da biomassa fresca total, com utilização de uma balança analítica, pelo comprimento radicular da raiz primária, com a utilização de um paquímetro e pelo número de raízes laterais, 14 dias após a realização do experimento. As plantas de cada placa foram avaliadas individualmente, tendo sido empregadas 5 placas por tratamento.

Meios MS com os valores da curva e indicador de pH foram aplicados nas placas com o intuito de mostrar que o meio de cultura não sofreu alterações de pH durante a autoclavagem e o experimento.

5.7. Análise proteômica

5.7.1. Extração de proteínas totais

As proteínas diferencialmente reguladas em resposta aos VOCs foram extraídas de 3 amostras biológicas por tratamento. Cada amostra foi composta por 16 plantas de *A. thaliana*, ecótipo Col-0, expostas aos compostos voláteis de *G. diazotrophicus* por 21 dias.

Seguiu-se a metodologia descrita por (Natarajan et al., 2005) para a extração das proteínas totais dos tecidos. Amostras de 300 mg foram maceradas sob nitrogênio líquido. O pó resultante foi colocado em um microtubo de 1,5ml e, em seguida, foi adicionado 1ml do tampão de extração TCA/Acetona (TCA 10% em acetona com 20mM de ditioneitol -DTT). Em seguida, foram incubadas por 60 min a -20 °C e, posteriormente, centrifugadas a 12.000g, a 4 °C, por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet, lavado com acetona gelada, contendo 20mM de DTT. Após nova centrifugação a 12.000g por 5 min, o sobrenadante foi descartado, e o pellet secou à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min. Os pellets foram então ressuspensos em 0,5mL de tampão ureia/tiourea (7M

ureia, 2M tiourea, 1% DTT, 2% triton-100, 0,5% formalito, 1mM de fenilmetanosulfonilfluorídrico - PMSF) e mantidos sob agitação até completa homogeneização das amostras. As amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 5 min, a 4 °C, e o sobrenadante proveniente desta centrifugação foi coletado e armazenado a -20 °C.

5.7.2. Quantificação do conteúdo de proteínas totais

Para a quantificação das proteínas totais das amostras, foi utilizado o método 2D-Quant Kit (GE Healthcare), segundo informações fornecidas pelo fabricante. A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão foi feita em leitor de microplacas a 480 nm.

5.7.3. Digestão de proteínas

Antes da etapa de digestão, as amostras foram precipitadas com a utilização de membranas Vivaspín 500MWCO5000 (GE Healthcare), utilizando como tampão bicarbonato de amônia (Sigma-Aldrich) na concentração de 50mM e pH 8.5. As membranas foram preenchidas com bicarbonato de amônia até o máximo de sua capacidade e centrifugadas a 15.000 g for 20 min at 8 °C. Este procedimento foi repetido pelo menos por 3 vezes até restarem cerca de 50 µL da amostra.

A metodologia utilizada para a digestão de proteínas é a descrita por Calderan-Rodrigues et al. (2014). Foram adicionados 25 mL de 0,2% (v/v) de RapiGest® (Waters, Milford, CT, EUA) às amostras, que foram brevemente vortexadas e incubadas durante 15 min em um Eppendorf Thermomixer® a 80 °C. Posteriormente, 2,5 mL de ditioneitol (DTT) 100 mM foram adicionados, e os tubos foram incubados a 60 °C durante 30 min, sob agitação. Adicionaram-se 2,5mL de iodoacetamida 300mM, seguidos de agitação e incubação no escuro durante 30 min à temperatura ambiente. A digestão foi feita pela adição de 20 µL de solução de tripsina (50ngmL⁻¹) (V5111, Promega, Madison, WI, EUA), preparada em bicarbonato de amônio 50mM. As amostras foram incubadas a 37 °C *overnight*. Em seguida, para a precipitação do RapiGest®, 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) foram adicionados e incubados a 37 °C durante

90min, seguido por um passo de centrifugação de 30 min a 15.000 g. As amostras foram transferidas para tubos "Total Recovery Vials" (Waters).

5.7.4. Análise LC-MS/MS

A análise de *shotgun* foi feita segundo metodologia descrita por Liu et al. (2004). As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas SYNAPT G2 HDMS Si (nano cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a um espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo, em tandem). Um UPLC nanoACQUITY ligado a um espectrômetro de massas SYNAPT G2-Si HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido) foi utilizado para análise de LC-ESI-MS/MS. O espectrômetro de massa é operado em modo de resolução (modo V) e positivo com mobilidade iônica; transferência de energia de colisão de 19 a 45V, no modo de alta energia; cone de tensão e capilar de 30v e 2800v, respectivamente, e temperatura da fonte de 70 °C. Para os parâmetros do TOF, o tempo de verificação foi definido para 0.5s, em modo contínuo, e uma faixa de massa de 50 a 2000 Da.

O programa Mass Linx foi utilizado na identificação de proteínas. A lista de peptídeos foi contrastada com a base de dados de proteínas do banco TAIR (www.arabidopsis.org). Após a identificação, as proteínas foram selecionadas de acordo a análise ANOVA, tendo sido selecionadas as proteínas com $p < 0,05$. As proteínas selecionadas foram então submetidas à caracterização funcional, utilizando o programa Blast2Go software v3.0 PRO (www.blast2go.com) e o programa MapManv3.6.0RC1 (Thimm et al., 2004). A predição das interações proteicas foi feita utilizando o programa String v10 (Szklarczyk et al., 2015). Em todas as análises, foi utilizada como parâmetro, a diferença de no mínimo 1,2 vezes na expressão das proteínas.

5.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos a 5% de probabilidade, empregando o programa Assistat (Silva et al., 2002).

6. RESULTADOS

6.1. Promoção do crescimento de *A. thaliana* por VOCs de *G. diazotrophicus*

Com o objetivo de avaliar se os compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus* promoveriam o crescimento de *A. thaliana* (Col-0), foram feitos cocultivos, em placas de 24 poços, onde sementes de plantas e colônias bacterianas foram cultivadas em poços distintos da mesma placa. Tal disposição permitiu somente a sinalização por meio de gases entre a bactéria e a planta. A escolha da quantidade de poços com a bactéria foi determinada para que a distribuição, para as plantas, dos VOCs, fosse a mais homogênea possível (Figura 8A).

Na disposição empregada, foi possível observar que, na presença dos VOCs de *G. diazotrophicus*, as plantas de *A. thaliana*, do ecótipo Col-0, apresentaram um ganho significativo de biomassa fresca total, quando comparado ao controle (Figura 8A, B). O ganho de biomassa médio foi correspondente a 87%, confirmando que a liberação de compostos voláteis pela bactéria é um mecanismo promotor do crescimento vegetal utilizado por *G. diazotrophicus*.

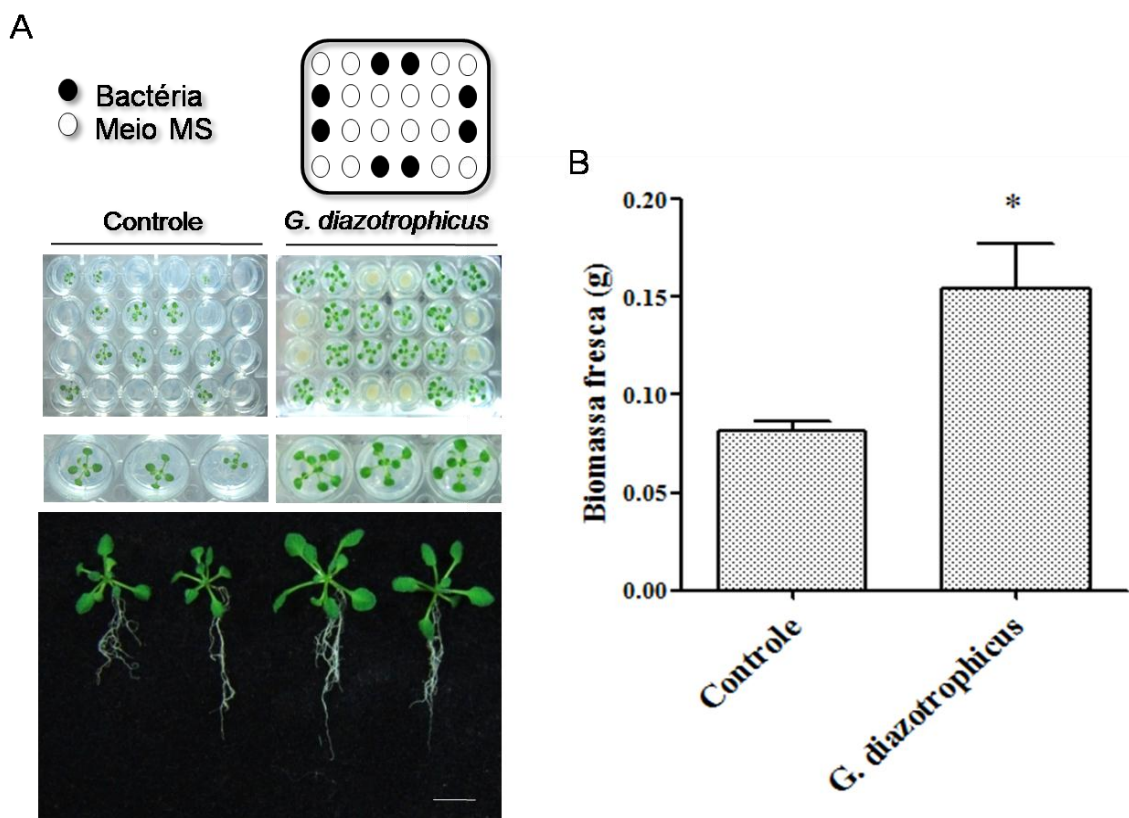


Figura 8: Promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana*, ecótipo Col-0, expostas aos VOCs de *G. diazotrophicus*. (A) Promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana*, promovida por VOCs de *G. diazotrophicus*, no sistema de placas de 24 poços. A fotografia foi feita após 21 dias de exposição aos compostos voláteis. O esquema ilustrado representa a disposição das sementes e da bactéria nos poços. A placa do lado esquerdo representa o tratamento controle e a do lado direito representa o tratamento com *G. diazotrophicus*. O diâmetro de cada poço corresponde a 2 cm e a barra de escala = 1 cm. (B) Promoção do crescimento, após 21 dias de exposição aos compostos voláteis de *G. diazotrophicus* e ao tratamento controle, no sistema de placas de 24 poços, indicado pela diferença na biomassa fresca total. Cada coluna representa a média de 7 placas, sendo que nas placas as plantas foram avaliadas em conjunto. As barras representam o desvio padrão da média de cada tratamento. Médias seguidas por * diferem significativamente, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, entre tratamentos.

6.2. A importância das vias vegetais de produção e percepção de hormônios no processo de promoção do crescimento ativado por VOCs de *G. diazotrophicus*

Com a confirmação de que compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus* promovem o crescimento do ecótipo Col-0, buscou-se avaliar a participação de vias hormonais nesse processo. Para tanto, foram conduzidos ensaios de promoção do crescimento, em placas de 24 poços, sendo 8 poços inoculados com a bactéria e os demais, com cada um dos mutantes *ein3-1*, *sid2-2*, *eds16*, *abi4*, *aux1-7*, *jar1* e *eds1*.

Como pode ser observado na Figura 9, após a exposição aos VOCs de *G. diazotrophicus*, para a maioria dos mutantes hormonais testados, foi observada a promoção do crescimento, porém, em proporções diferenciadas entre eles. A promoção do crescimento foi significativamente aumentada pelos VOCs produzidos por *G. diazotrophicus* nos mutantes *sid2-2* e *ein3-1*, com ganhos médios de biomassa de 91,81% e 70,14%, respectivamente, em relação aos seus controles. Já para o mutante *eds1*, a biomassa fresca não foi significativamente diferente do seu controle, sugerindo que a promoção do crescimento promovida por compostos voláteis de *G. diazotrophicus* seja mediada pela rota de sinalização do ácido salicílico. A importância dessa via se confirma ao analisarmos o mutante *eds16* que, embora tenha apresentado promoção do crescimento, com ganho médio de 24,5%, este foi inferior ao observado para os demais materiais testados, inclusive Col-0. (Figura 9A e B).

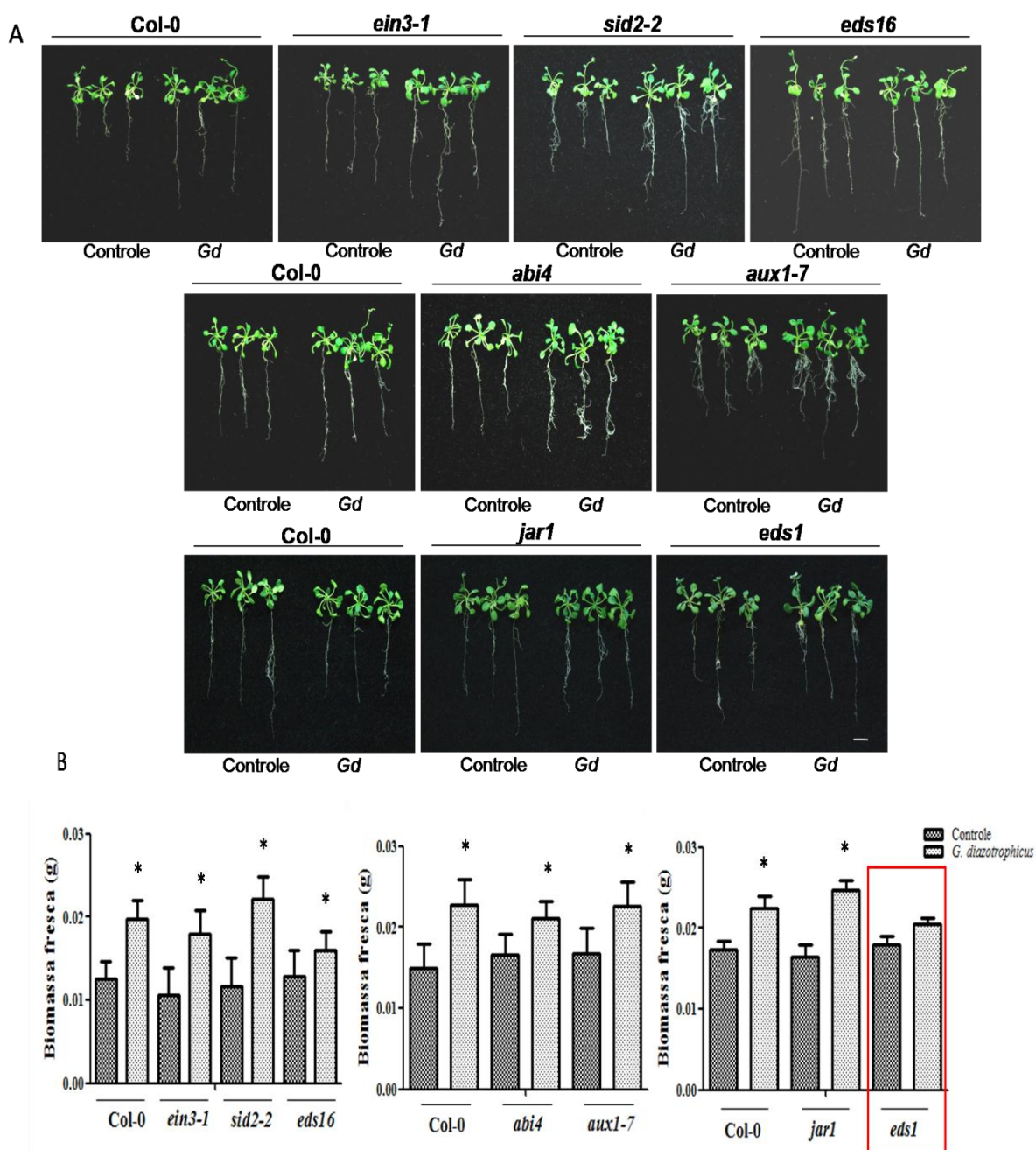


Figura 9: Promoção do crescimento dos diferentes mutantes hormonais de *A. thaliana* expostos aos VOCs de *G. diazotrophicus*. (A) Promoção do crescimento de linhas mutantes de *A. thaliana*, promovida por VOCs de *G. diazotrophicus*, no sistema de placas de 24 poços. A fotografia foi feita após 21 dias de exposição aos compostos voláteis. A barra de escala = 1 cm, *Gd* representa *G. diazotrophicus*. (B) Promoção do crescimento do ecótipo Col-0 e das linhas mutantes *ein3-1*, *sid2-2*, *eds16*, *abi4*, *aux1-7*, *jar1* e *eds1*, após 21 dias de exposição aos compostos voláteis de *G. diazotrophicus* e ao tratamento controle, no sistema de placas de 24 poços, indicado pela diferença na biomassa fresca total. Cada coluna representa a média de 7 placas, sendo que nas placas cada planta foi avaliada individualmente. As barras representam o desvio padrão da média de cada tratamento. Médias seguidas por * diferem significativamente, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, em relação aos seus respectivos controles. Destaque em vermelho para o mutante *eds1*, que não apresentou promoção do crescimento.

6.3. Produção de amônia por *G. diazotrophicus*

G. diazotrophicus produz compostos voláteis ainda desconhecidos. Com o intuito de avaliar se a amônia estava presente entre tais compostos, ensaios de quantificação de amônia, volátil e dissolvida em meio de cultivo, foram feitos, por meio da fita teste de amônia Quantofix®.

Levando em consideração que o kit é empregado para quantificações em solução aquosa, uma curva padrão de concentração de amônia, contendo 0, 1, 2, 5, 10, 20 e 100mM de NH₃, Figura 10A, foi utilizada como referência para a quantificação colorimétrica das amostras. Para a quantificação da amônia produzida por *G. diazotrophicus*, um sistema de placas de 6 poços foi utilizado, no qual em um dos poços foi acondicionada a fita de teste Quantofix e em outros três poços colônias de *G. diazotrophicus*. A avaliação foi feita após 5, 15 e 30 dias de cultivo.

Como controle, foi possível observar, Figuras 10B e C, que o meio DYGS, isoladamente, libera uma quantidade de amônia equivalente a, aproximadamente, 1mM, durante os 3 períodos avaliados. Quando se avaliou a liberação de amônia por *G. diazotrophicus*, o valor detectado foi de, aproximadamente, 2mM durante os pontos iniciais e, no 30° dia, o valor de amônia acumulado em placa foi de 5mM, indicando que, mesmo com a redução progressiva dos nutrientes no meio de cultura, há um acúmulo de amônia entre os pontos avaliados.

A produção de amônia em suspensão bacteriana de *G. diazotrophicus*, na concentração de 10⁸ CFU/mL, também foi avaliada, por meio da fita de teste Quantofix, com posterior comparação com a curva presente no kit (Figura 11). Foi possível estimar que, na condição empregada, *G. diazotrophicus* tem uma produção aproximada de 50mg/L de amônia.

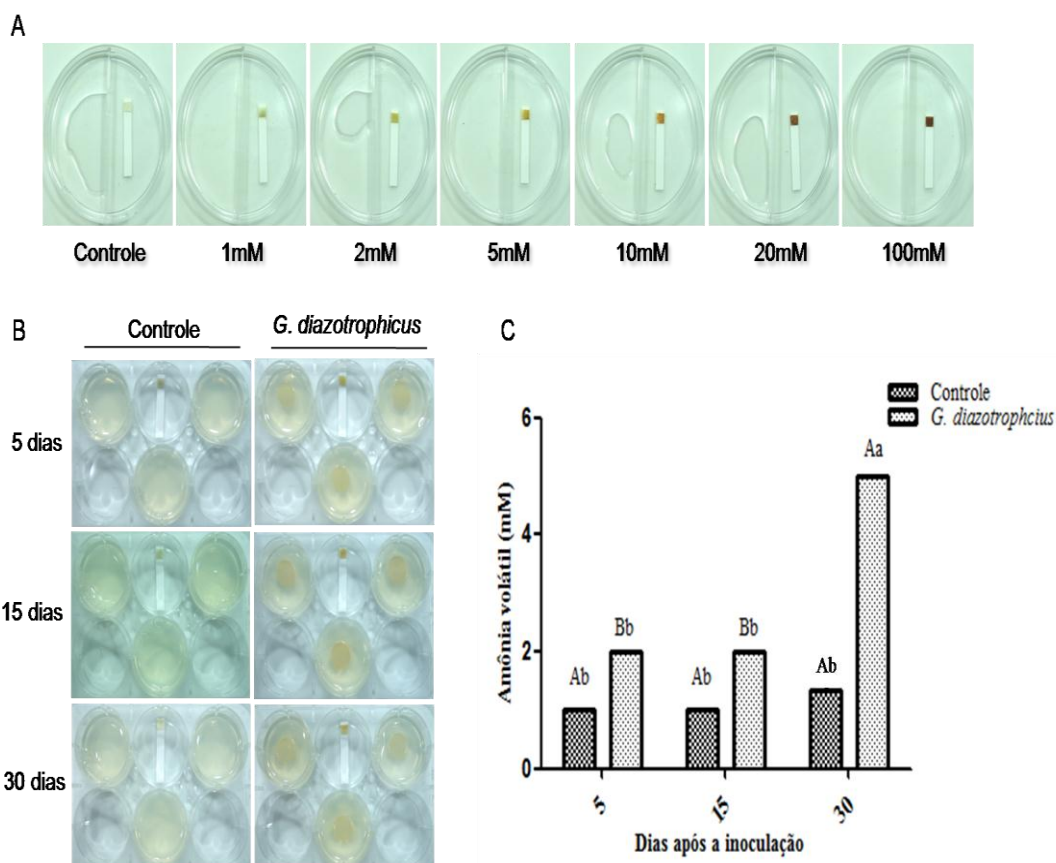


Figura 10: Produção de amônia, em forma volátil, por *G. diazotrophicus* (A) Curva de concentração de amônia utilizada como referência para as quantificações. A curva foi composta de soluções de amônia nas concentrações de 0, 1, 2, 5, 10, 20 e 100mM, que foram mantidas, por 24h, na presença da fita de quantificação. Após 24h, a reação química foi conduzida, de acordo com as determinações do kit, e a coloração foi documentada. (B) Placas de 6 poços utilizadas durante as quantificações de *G. diazotrophicus*. Em um dos poços, a fita de quantificação Quantofix foi acondicionada e em outros três colônias de *G. diazotrophicus*, na concentração de 10^8 CFU/mL. Após 5, 15 e 30 dias, as reações químicas foram iniciadas, de acordo com indicações do kit, e a coloração foi comparada à curva padrão feita. Placas da esquerda representam o controle e placas da direita representam o tratamento com *G. diazotrophicus*. (C) Quantificação de amônia liberada por *G. diazotrophicus*, na forma volátil, após 5, 15 e 30 dias, de acordo com os valores colorimétricos obtidos. Cada tratamento foi composto por 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, em cada tratamento, e médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, entre tratamentos.

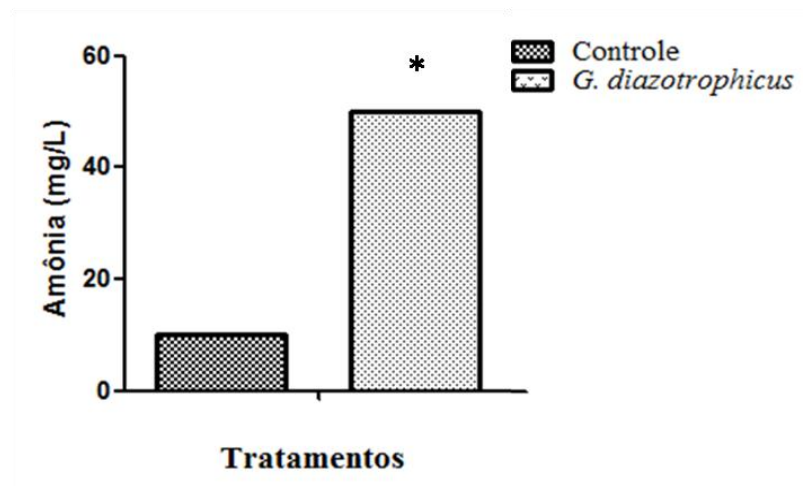


Figura 11: Produção de amônia, em meio de cultivo, por *G. diazotrophicus*. Liberação de amônia, em meio de cultivo, por *G. diazotrophicus*, na concentração de 10^8 CFU/mL. Cada tratamento foi composto por 3 repetições. Médias seguidas por * diferem significativamente, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, entre tratamentos.

6.4. Papel da amônia liberada por *G. diazotrophicus* na promoção do crescimento de *A. thaliana* induzida por VOCs

Com a confirmação de que *G. diazotrophicus* produz amônia de forma volátil, objetivou-se avaliar se a amônia, isoladamente, atua na promoção do crescimento de *A. thaliana*. Neste sentido, novos ensaios de cultivo de plantas foram conduzidos em placas contendo, em 8 poços, solução de amônia em concentração próxima àquela produzida por *G. diazotrophicus* (5 mM).

Como pode ser observado nas Figuras 12A e B, a presença da amônia não resultou em ganhos em biomassa fresca total quando comparada ao controle, o que indica que a amônia não é o composto volátil responsável pela promoção do crescimento induzida por VOCs de *G. diazotrophicus*.

Considerando a possibilidade de que alterações no pH do meio de cultivo influenciam o crescimento vegetal, foi avaliado se a presença de amônia volátil acarreta alteração do pH do meio de cultura. Para tal, um ensaio em placa de cultivo, utilizando meio MS contendo indicador de pH, foi realizado e, adicionalmente, o pH final do meio (após exposição à amônia volátil) foi determinado. Os resultados visuais de coloração e de medição de pH, Figuras 12C e D, indicaram que não houve alteração significativa de pH nos meios

expostos à amônia, evidenciando que a presença deste composto não acarreta alterações significativas de pH.

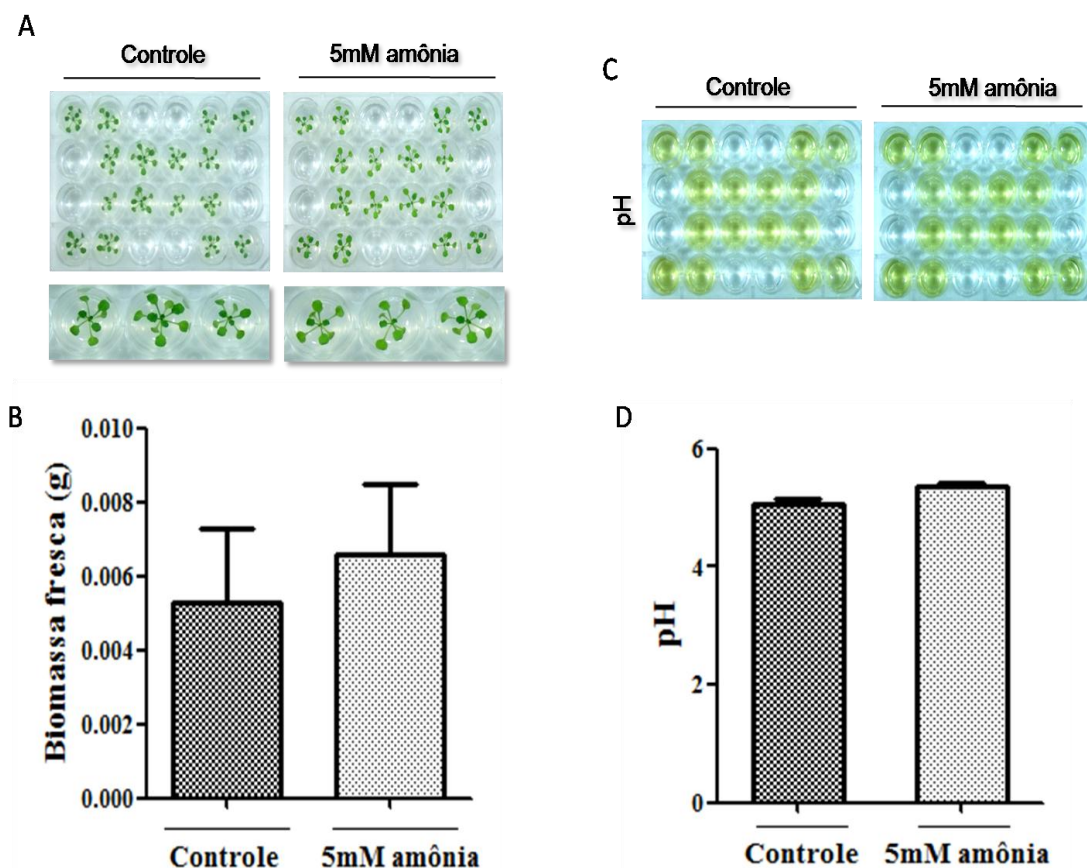


Figura 12: Crescimento de plantas de *A. thaliana* expostas à amônia. (A) Promoção de crescimento de plantas de *A. thaliana*, promovida pela concentração de amônia liberada por *G. diazotrophicus* (5mM), no sistema de placas de 24 poços, após 21 dias. A placa do lado esquerdo representa o tratamento controle (água) e a do lado direito representa o tratamento com 5mM de amônia. (B) Promoção do crescimento, após 21 dias de exposição a 5mM de amônia e ao tratamento controle, no sistema de placas de 24 poços, indicado pela diferença na biomassa fresca total. Cada coluna representa a média de 7 placas, sendo que nas placas cada planta foi avaliada individualmente. As barras representam o desvio padrão da média de cada tratamento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. (C) Meio de cultura, com indicador de pH, na presença do tratamento controle e de 5mM de amônia, no sistema de placas de 24 poços, após 21 dias. A placa do lado esquerdo representa o tratamento controle (água) e a do lado direito representa o tratamento com 5mM de amônia. (D) Valores de pH do meio de cultura na presença do tratamento controle e de 5mM de amônia, no sistema de placas de 24 poços, após 21 dias. Cada coluna representa a média de 7 placas, sendo que nas placas cada planta foi avaliada individualmente. As barras representam o desvio padrão da média de cada tratamento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

O efeito nulo da concentração de 5mM de amônia na promoção do crescimento de *A. thaliana* sugeriu que esta promoção do crescimento vegetal é induzida por outros compostos voláteis distintos da amônia. Para confirmar este efeito, foi conduzido um ensaio de cocultivo de *G. diazotrophicus* e de *A. thaliana* na presença de 0,74mM de ácido fosfórico (H_3PO_4). O ácido fosfórico reage com a amônia formando fosfato de amônio (Ryden et al., 1984), sequestrando a amônia volátil presente no ambiente. Desta forma, a utilização de uma linha de poços contendo ácido fosfórico, separando as plantas e as colônias bacterianas, poderia representar uma barreira à difusão da amônia (Figura 13A). Assim, as plantas localizadas após tal barreira recebem menor influência da amônia liberada por *G. diazotrophicus*.

Ao avaliarmos as plantas a 3 cm da colônia, Figuras 13A e B, não separadas da bactéria por “barreira” de ácido fosfórico, observa-se promoção do crescimento por VOCs de *G. diazotrophicus*, tanto na presença como na ausência do ácido, com ganhos médios de biomassa de 72% e 73%, respectivamente. Similarmente, para as plantas a 6 cm do inóculo, Figuras 13A e C, separadas da bactéria por “barreira” de ácido fosfórico, a promoção do crescimento ainda é evidente em resposta aos VOCs de *G. diazotrophicus*, com ganhos de biomassa fresca de 73% na presença e ausência do ácido.

A presença do ácido fosfórico não alterou a resposta observada, confirmando que a promoção do crescimento por VOCs de *G. diazotrophicus* não está diretamente relacionada à produção de amônia pela bactéria.

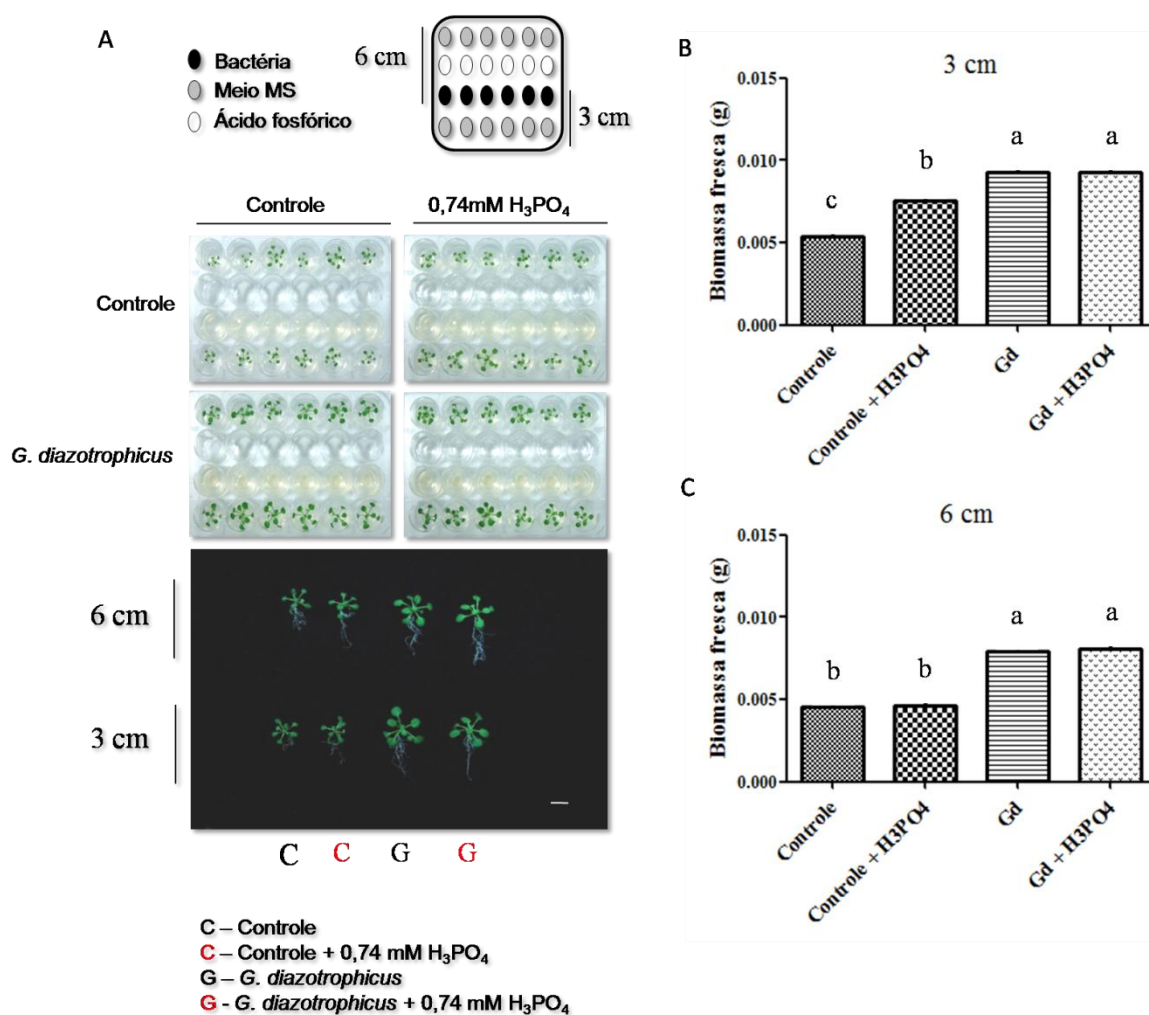


Figura 13: Promoção do crescimento de *A. thaliana* por compostos voláteis de *G. diazotrophicus*, na presença do ácido fosfórico. (A) Promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana*, promovida por VOCs de *G. diazotrophicus*, no sistema de placas de 24 poços, com 6 colônias de *G. diazotrophicus* e na presença de ácido fosfórico. A fotografia foi realizada após 21 dias de exposição aos compostos voláteis. O esquema ilustrado representa a disposição das sementes, da bactéria e do ácido nos poços. A placa do lado esquerdo representa o tratamento controle (água) e a do lado direito representa o tratamento com 0,74mM de ácido fosfórico. A primeira fileira representa as plantas na ausência da bactéria e a segunda na presença da mesma. A barra de escala = 1 cm. (B) Promoção do crescimento, após 21 dias de exposição aos compostos voláteis de *G. diazotrophicus* e ao tratamento controle, na presença de ácido fosfórico, no sistema de placas de 24 poços, indicado pela diferença na biomassa fresca total a 3 cm e a (C) 6 cm das colônias de *G. diazotrophicus*. Cada coluna representa a média de 7 placas, sendo que nas placas cada planta foi avaliada individualmente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, entre tratamentos.

6.5. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) em *G. diazotrophicus* não participa da promoção do crescimento de *A. thaliana* ativada por VOCs

Com o intuito de avaliarmos a importância da fixação biológica de nitrogênio de *G. diazotrophicus*, no processo de promoção do crescimento de *A. thaliana* induzida por VOCs, ensaios de cocultivos foram realizados com o mutante de *G. diazotrophicus* ($\Delta pqqC$). Tal mutante, defeitivo para o gene *pqqC*, foi obtido através de mutagenese insercional, utilizando o kit EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre, Madison, WI, USA) com inserção do transposon no gene *pqqC*, que participa da etapa final de biossíntese de PQQ (Intorne et al., 2009). Análises prévias, realizadas por nossa equipe mostraram que $\Delta pqqC$ é fortemente afetado na capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (de Souza, 2015).

Como pode ser observado nas Figuras 14A e B, a presença da mutação não acarretou alteração da promoção do crescimento induzida por VOCs de *G. diazotrophicus*. Esta resposta indica que os compostos, promotores do crescimento, liberados por *G. diazotrophicus*, não têm suas vias de atuação relacionadas às vias do gene *pqqC* e da fixação biológica de nitrogênio.

Os dados de quantificação de pH, Figuras 14C e D, demonstram que na presença de VOCs de *G. diazotrophicus* um valor de pH mais elevado é observado (pH=6,2), quando comparado ao controle, sendo este valor alterado para pH=7,0 em resposta aos VOCs de $\Delta pqqC$. Embora os compostos liberados por $\Delta pqqC$ alcalinizem mais o meio de cultura, quando comparado a *G. diazotrophicus*, este acréscimo não foi suficiente para alterar a promoção do crescimento observada ao compararmos o tratamento com a bactéria selvagem e a mutada.

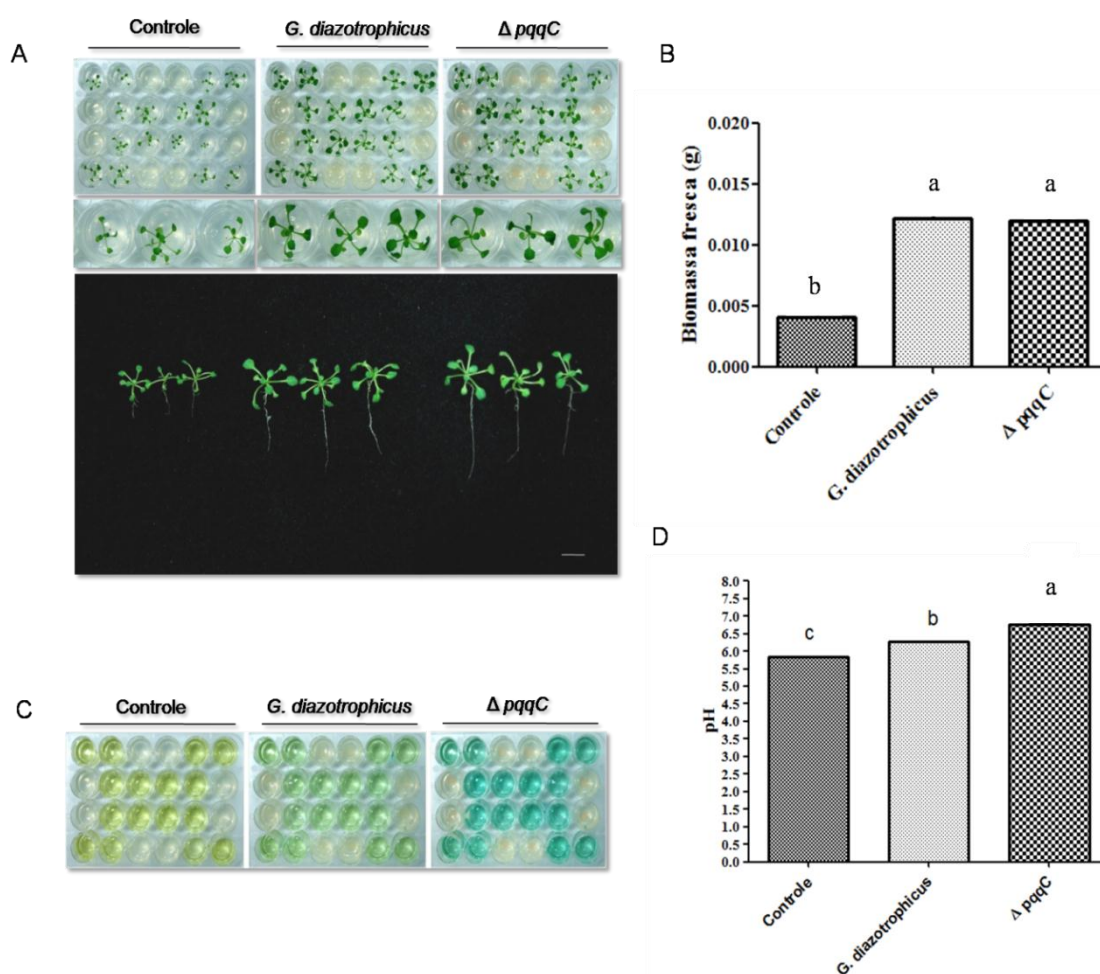


Figura 14: Promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana*, ecótipo Col-0, expostas aos VOCs do mutante $\Delta ppqC$, deficiente para a fixação biológica de nitrogênio. (A) Promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana*, promovida por compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus* e $\Delta ppqC$, no sistema de placas de 24 poços. A fotografia foi realizada após 21 dias de exposição aos compostos voláteis. A placa do lado esquerdo representa o tratamento controle, a do meio a placa de *G. diazotrophicus* e a do lado direito representa o tratamento com $\Delta ppqC$. Barra de escala = 1 cm. (B) Promoção do crescimento, após 21 dias de exposição aos compostos voláteis das diferentes bactérias e do controle, no sistema de placas de 24 poços, indicado pela diferença na biomassa fresca total. Cada coluna representa a média de 7 placas, sendo que nas placas cada planta foi avaliada individualmente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Turkey, a 5% de probabilidade, entre tratamentos. (C) Meio de cultura, com indicador de pH, na presença do tratamento controle, *G. diazotrophicus* e $\Delta ppqC$, no sistema de placas de 24 poços. A fotografia foi realizada após 21 dias de exposição aos compostos voláteis. A placa do lado esquerdo representa o tratamento controle, a do meio a placa de *G. diazotrophicus* e a do lado direito representa o tratamento com $\Delta ppqC$. (D) Valores de pH do meio de cultura na presença do tratamento controle, *G. diazotrophicus* e $\Delta ppqC$, no sistema de placas de 24 poços. A análise foi realizada após 21 dias de exposição aos diferentes compostos voláteis. Cada coluna representa a média de 7 placas, sendo que nas placas cada planta foi avaliada individualmente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, entre tratamentos.

6.6. A influência do pH do meio de cultura no crescimento de *A. thaliana*

Os compostos voláteis emitidos por *G. diazotrophicus* são responsáveis por alterar o pH do meio de cultura. Para determinar se esta alteração, isoladamente, tem efeito positivo no processo de promoção do crescimento, foi conduzido um ensaio de crescimento de *A. thaliana* em meio MS com diferentes valores de pH (5-10).

Observou-se que, para os parâmetros biomassa fresca, comprimento radicular e número de raízes laterais avaliados, Figura 15, há uma faixa ideal de pH para o crescimento de *A. thaliana*. Em pH entre 6 e 6,5, para a maioria dos parâmetros, o crescimento é favorecido. À medida que o meio se torna muito alcalino, o crescimento é gradativamente afetado, provavelmente como consequência de desequilíbrios da homeostase celular.

A alteração de pH provocada por *G. diazotrophicus* está dentro da faixa ideal de crescimento (pH=6,2). O mutante $\Delta pqqC$ provoca uma alteração de pH mais acentuada quando comparada à observada por *G. diazotrophicus* e que não se encontra na faixa ideal observada. Entretanto, a promoção do crescimento não foi afetada pela presença dos VOCs do mutante. Tal fato nos leva a concluir que a variação do pH do meio de cultura, promovida pelos VOCs liberados por *G. diazotrophicus*, não é o principal mecanismo para a indução da promoção do crescimento em *A. thaliana*.

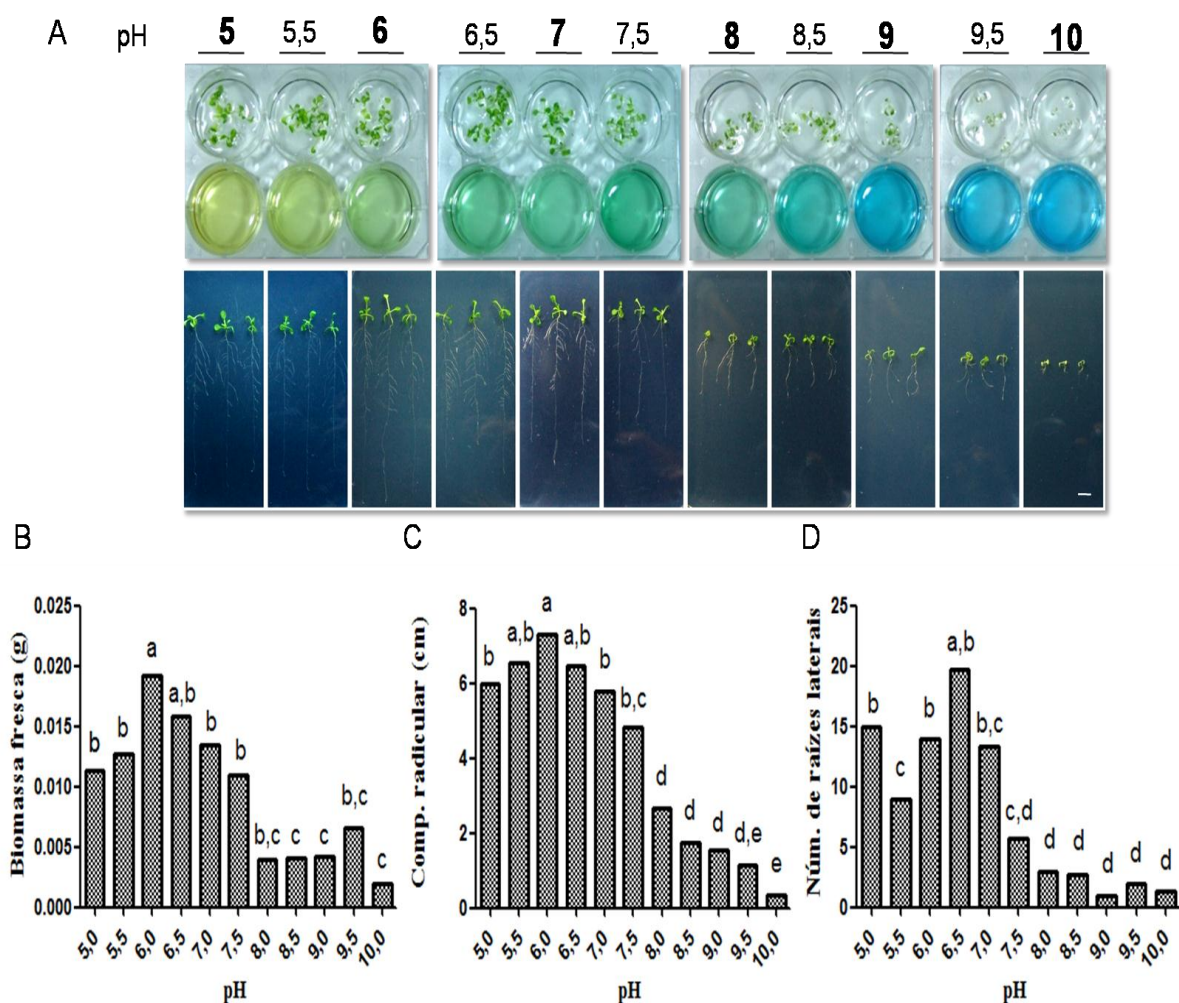


Figura 15: Crescimento de *A. thaliana*, em meio MS, com diferentes valores de pH. (A) Crescimento, em placas de 6 poços, de *A. thaliana*, em meio de cultura com diferentes valores de pH, durante 14 dias. Cada poço superior continha 5 sementes e nos 3 poços inferiores foram aplicados meio de cultura MS, com indicador de pH, que foi esterilizado e mantido durante todo o experimento para que se comprovasse a não alteração do pH. Barra de escala = 1 cm. (B) Promoção do crescimento de *A. thaliana*, após 14 dias, na presença de meio de cultura com diferentes valores de pH, indicado pela diferença na biomassa fresca total, (C) comprimento radicular e (D) número de raízes laterais. Todos os tratamentos foram compostos por 5 repetições (placas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

6.7. Efeito de VOCs de *G. diazotrophicus* sobre a promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana* cultivadas em solo

Todos os ensaios, previamente realizados, foram conduzidos *in vitro*, permitindo a possibilidade de que a promoção de crescimento observada fosse especificamente associada às condições de cultivo. Com o intuito de avaliar se os efeitos observados em plântulas cultivadas em placas de 24 poços também se manifestariam em plantas cultivadas em solo, um novo ensaio foi conduzido. Em tal teste, plantas de *A. thaliana*, cultivadas em solo, foram mantidas em um ambiente fechado, juntamente com recipientes que continham cultivos de *G. diazotrophicus* em meio de cultura.

Os resultados apresentados nas Figuras 16A e B revelam que, sob tais condições, os efeitos de VOCs produzidos por *G. diazotrophicus*, na promoção do crescimento de plantas, foram mantidos, com ganhos médios de biomassa total de 46,4%. Os resultados foram semelhantes aos observados nos ensaios *in vitro*, Figura 8, entretanto com uma proporção inferior. O comprimento de raízes e biomassa radicular Figuras 16C e D, não diferiram estatisticamente do controle, sugerindo que a promoção do crescimento observada em solo não é resultado de um acréscimo no aporte de nutrientes associado a um sistema radicular mais desenvolvido.

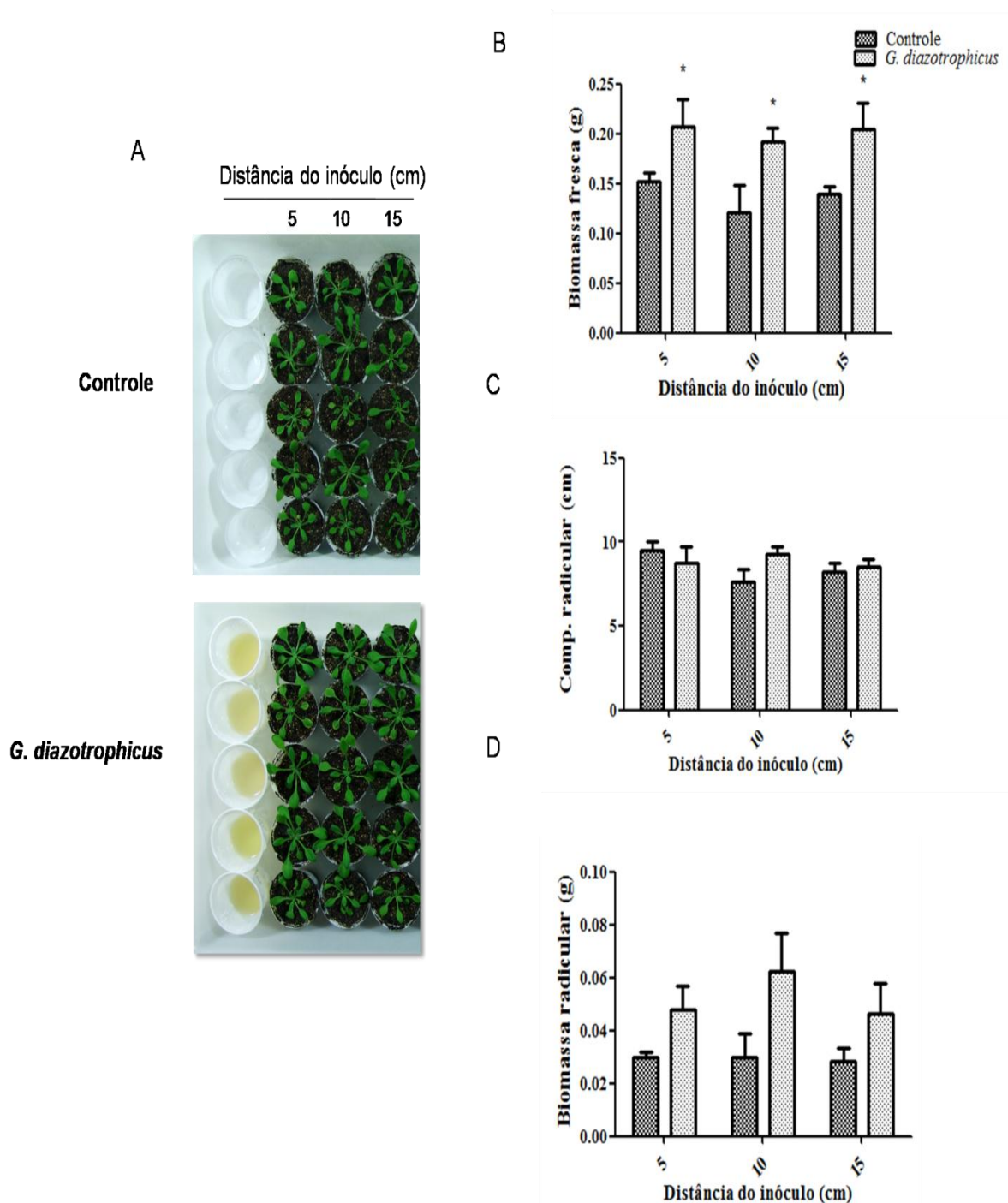


Figura 16: Promoção do crescimento de *A. thaliana*, cultivada em solo, por compostos voláteis de *G. diazotrophicus*. (A) Promoção do crescimento a 5, 10 e 15 cm da cultura bacteriana, de plantas de *A. thaliana*, em solo, promovida por compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus*. A fotografia foi realizada após 21 dias de exposição aos compostos voláteis. (B) Promoção do crescimento, após 21 dias de exposição aos compostos voláteis de *G. diazotrophicus*, indicado pela diferença na biomassa fresca total, (C) comprimento radicular e (D) biomassa radicular. Cada tratamento foi composto por 5 repetições. As barras representam o desvio padrão da média. Médias seguidas por * diferem significativamente pelo, Teste de Tukey, a 5% de probabilidade entre tratamentos e seus respectivos controles.

6.8. Efeitos dos compostos voláteis de *G. diazotrophicus* sobre os perfis proteômicos das plantas de *A. thaliana*

Com o objetivo de avaliar as alterações sobre o perfil proteômico de plantas de *A. thaliana* expostas aos VOCs de *G. diazotrophicus*, foram conduzidos ensaios de análises proteômicas comparativas no tecido foliar, de plantas cultivadas na presença da bactéria por 21 dias. As análises foram baseadas em quantificação relativa de proteínas entre plantas expostas aos VOCs bacterianos e plantas controle.

Foram identificadas 696 proteínas, Tabelas Suplementares 1 e 2, sendo 20% do valor diferencialmente reguladas na presença de VOCs de *G. diazotrophicus*. Entre elas, 83 foram negativamente reguladas e 62 positivamente reguladas (Figura 17D).

Os processos biológicos regulados na presença de VOCs de *G. diazotrophicus* foram analisados após a identificação das proteínas diferencialmente expressas. Para tanto, foi realizada a classificação funcional por meio do programa Blast2Go, em que as proteínas foram classificadas em positiva e negativamente reguladas, de acordo com o processo biológico na qual participam, podendo uma mesma proteína participar de mais de uma via. Posteriormente, a predição das interações proteicas foi realizada utilizando o programa String.

Proteínas Reguladas Positivamente

A classificação funcional das proteínas positivamente reguladas na presença de *G. diazotrophicus*, Figuras 17A, B e C, foi conduzida através de três principais critérios: Componentes celulares (12 classes), Funções moleculares (4 classes) e Processos biológicos (12 classes).

Quando o critério “Componentes celulares” foi aplicado, as proteínas positivamente reguladas foram agrupadas em 12 classes: Plastídeo (22,7%), Complexo proteico (11,7%), Citosol e Tilacoide (10,3%), Membrana plasmática (8,9%), Ribossomo (6,8%), Região extracelular (6,2%), Parede celular e Mitocôndria (5,5%), Vacúolo (4,8%), Núcleo e Complexo de Golgi (3,4%).

Para o critério “Funções moleculares”, as proteínas positivamente reguladas foram agrupadas em 4 classes: Ligação a íons (50%), Atividade oxidorreductase (21%), Constituinte de ribossomos (19%), Atividade hidrolase (9,5%).

A análise das proteínas positivamente reguladas com o critério “Processos biológicos” gerou 12 classes: Fotossíntese (15,3%), Geração de metabólitos e energia e Resposta a estresses (14,5%), Modificação de proteínas (10,2%), Metabolismo de carboidratos e Tradução (7,6%), Processos catabólicos (6,8%), Biogênese de parede celular (5,1%), Reprodução e Transporte (4,2%), Organização de componentes celulares (3,4%) e Regulação biológica (1,7%).

Nas análises, foi possível identificar proteínas relacionadas ao funcionamento ou formação de plastídeos e atividades oxidorreductases e de ligação a íons. Interessantemente, ao avaliarmos os processos biológicos regulados, foi constatado que os VOCs regulam positivamente as proteínas relacionadas com a geração de metabólitos e energia e com a fotossíntese, fato consonante com a promoção do crescimento promovida por estes compostos. A resposta a estresse também é induzida, porém representa apenas 14,5% das proteínas identificadas.

Os dados de predição das interações proteicas, Figura 17E, revelaram que a exposição da planta aos VOCs de *G. diazotrophicus* regula positivamente o acúmulo de grupos de proteínas relacionadas à fotossíntese, síntese proteica e controle de fluxo de água (Aquaporinas).

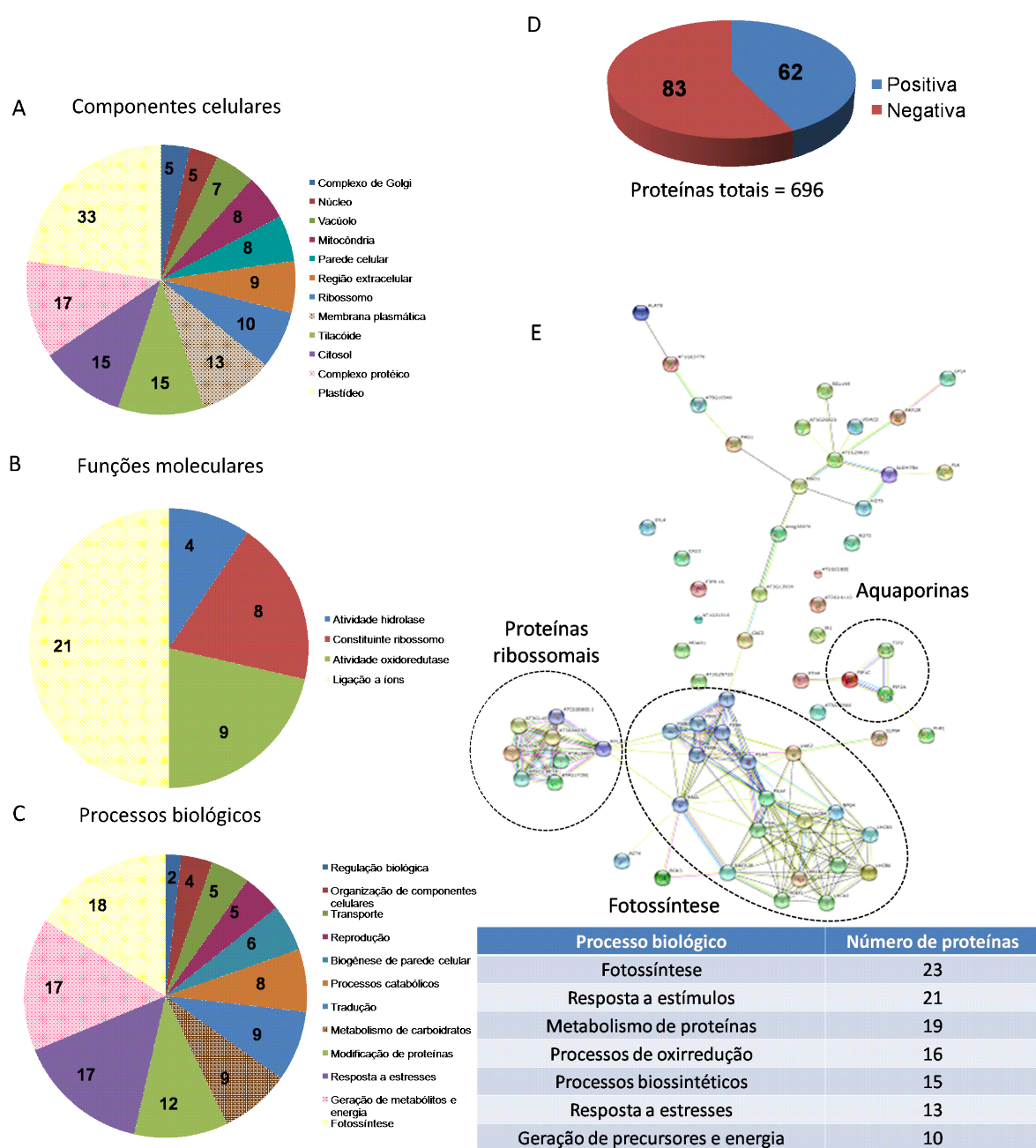


Figura 17: Proteínas positivamente reguladas na presença de compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus*. Classificação funcional das proteínas positivamente reguladas na presença de compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus*, nos critérios (A) Componentes celulares, (B) Funções moleculares e (C) Processos biológicos. Os números representam a quantidade de seqüências proteicas que foram identificadas nas respectivas funções. (D) Número total de proteínas identificadas e de proteínas positiva e negativamente reguladas na presença de VOCs de *G. diazotrophicus*. (E) Predição das interações proteicas das proteínas positivamente reguladas, após 21 dias de exposição aos VOCs. Os círculos tracejados separam as proteínas em grupos de acordo com a atividade biológica em comum. A tabela separa as proteínas em grupos de acordo com o processo biológico positivamente regulado, em resposta aos compostos voláteis de *G. diazotrophicus*, e os números representam a quantidade de proteínas de cada grupo.

Proteínas Reguladas Negativamente

Ao avaliarmos a classificação funcional das proteínas reguladas negativamente, Figuras 18A, B e C, foi possível fazer a classificação em três principais critérios: "Componentes celulares" (10classes), "Funções moleculares" (6 classes) e "Processos biológicos" (10classes).

No âmbito dos "Componentes Celulares", proteínas diferencialmente expressas foram agrupadas em 10classes: Plastídeo (23,5%), Citosol (13,2%), Tilacóide (11%), Região extracelular e Membrana Plasmática (8,8%), Complexo proteico (8%), Ribossomo e Mitocôndria (7,3%), Núcleo (6,6%) e Vacúolo (5,1%).

Quando o critério "Funções moleculares" foi aplicado, 6 classes foram geradas: Ligação a íons (34,6%), Atividade oxidorreductase (21,7%), Ligação a RNA (14%), Atividade estrutural molecular (11,5%), Atividade liase e Atividade peptidase (8,9%).

O critério "Processos biológicos" gerou 10 classes de proteínas reguladas negativamente: Resposta a estresse (24,7%), Desenvolvimento estrutural (15,6%), Geração de metabólitos e energia (13,7%), Metabolismo de carboidratos (12,8%), Biogênese de ribossomos (10%), Fotossíntese (8,2%), Organização de membranas e Metabolismo de lipídeos (5,5%), Transporte e Regulação biológica (1,8%).

O principal processo biológico regulado negativamente foi a resposta a estresse, representando 24,7% das proteínas classificadas. Ao comparamos os dados de interação proteica, Figura 18E, observa-se, novamente, presença de grupos proteicos envolvidos com a resposta vegetal a diferentes estresses, como resposta a químicos, estímulos abióticos e hormônios.

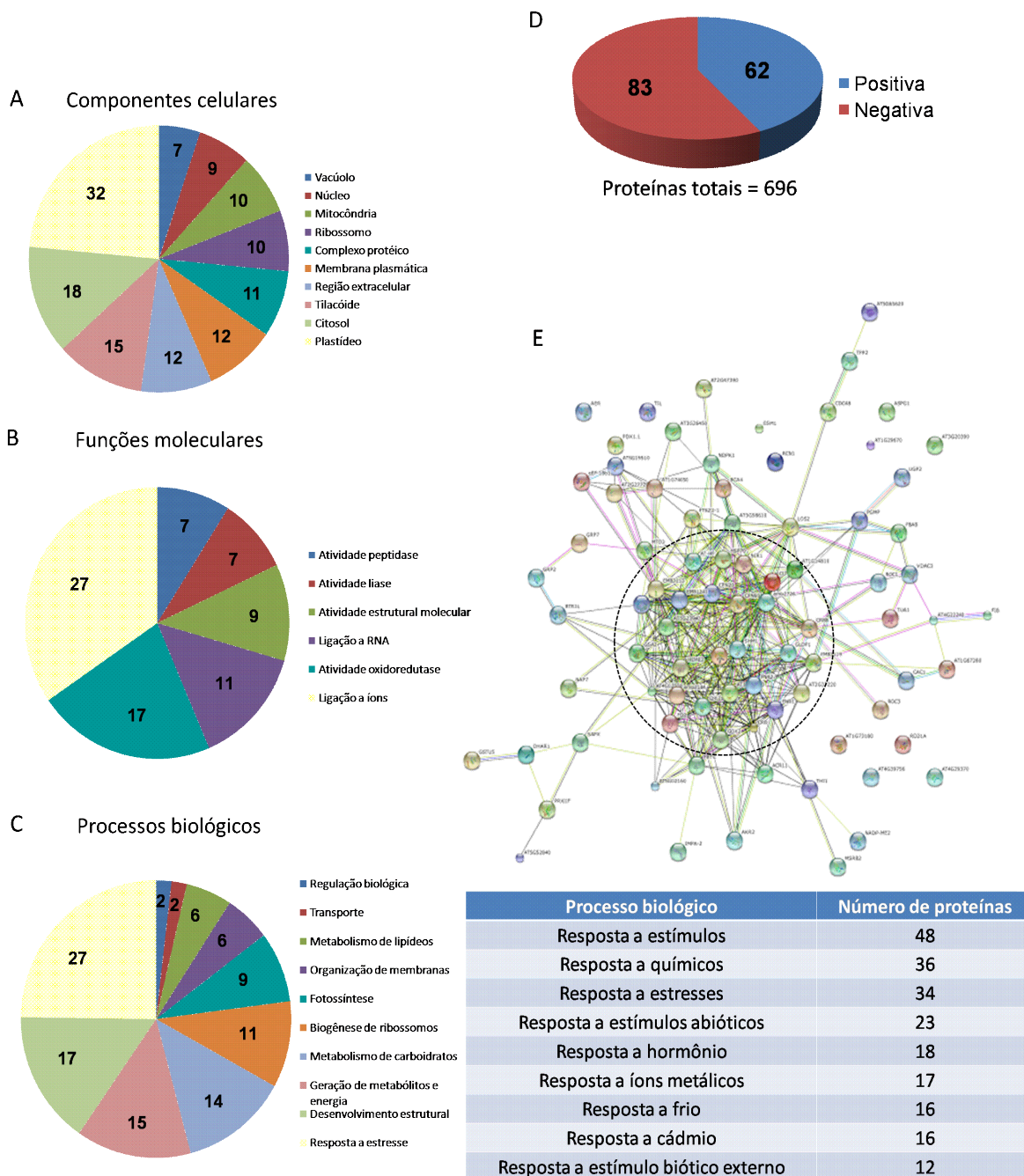


Figura 18: Proteínas negativamente reguladas na presença de compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus*. Classificação funcional das proteínas negativamente reguladas na presença de compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus* nos critérios (A) Componentes celulares, (B) Funções moleculares e (C) Processos biológicos. Os números representam a quantidade de sequências proteicas foram identificadas nas respectivas funções. (D) Número total de proteínas identificadas e de proteínas positiva e negativamente reguladas na presença de VOCs de *G. diazotrophicus*. (E) Predição das interações proteicas das proteínas negativamente reguladas após 21 dias de exposição aos VOCs. A tabela separa as proteínas, em grupos, de acordo com o processo biológico negativamente regulado, em resposta aos compostos voláteis de *G. diazotrophicus* e os números representam a quantidade de proteínas de cada grupo.

Visando a uma melhor caracterização das principais vias reguladas durante a exposição de plantas de *A. thaliana* aos compostos voláteis, foi analisado o conjunto de proteínas diferencialmente expresso pelo software MapMan, largamente empregado para análises de dados de transcriptômica, sequenciamento e, mais recentemente, de proteômica. Entre as opções do software, foram utilizados os critérios “Visão geral do metabolismo”, “Cloroplasto” e “Estresse biótico”.

Na Figura 19, onde as proteínas reguladas são analisadas quanto à participação no metabolismo geral da planta, é possível observar que 14 proteínas positivamente reguladas estão relacionadas com a fotossíntese, sendo este o processo mais ativado. Entre elas, podemos citar a proteína PSAB Fotossistema I, LHCA2 Fotossistema I e a proteína D do centro de reação do fotossistema II, com níveis de indução de 2,53; 2,23 e 2,08 respectivamente. Estes dados se confirmaram quando o conjunto total de proteínas reguladas foi analisado quanto à participação no metabolismo de cloroplasto (Figura 20). Foram induzidas 4 proteínas do fotossistema II e 10 proteínas do fotossistema I, indicando que o processo fotossintético é um dos alvos da ação de VOCs produzidos por *G. diazotrophicus*, de modo a propiciar a promoção do crescimento vegetal.

Entre as proteínas negativamente reguladas, destacam-se as envolvidas com a fotorrespiração, a glicólise e com a via de tetrapirrol. A repressão dessas vias parece ser fundamental na indução da promoção do crescimento por VOCs de *G. diazotrophicus*.

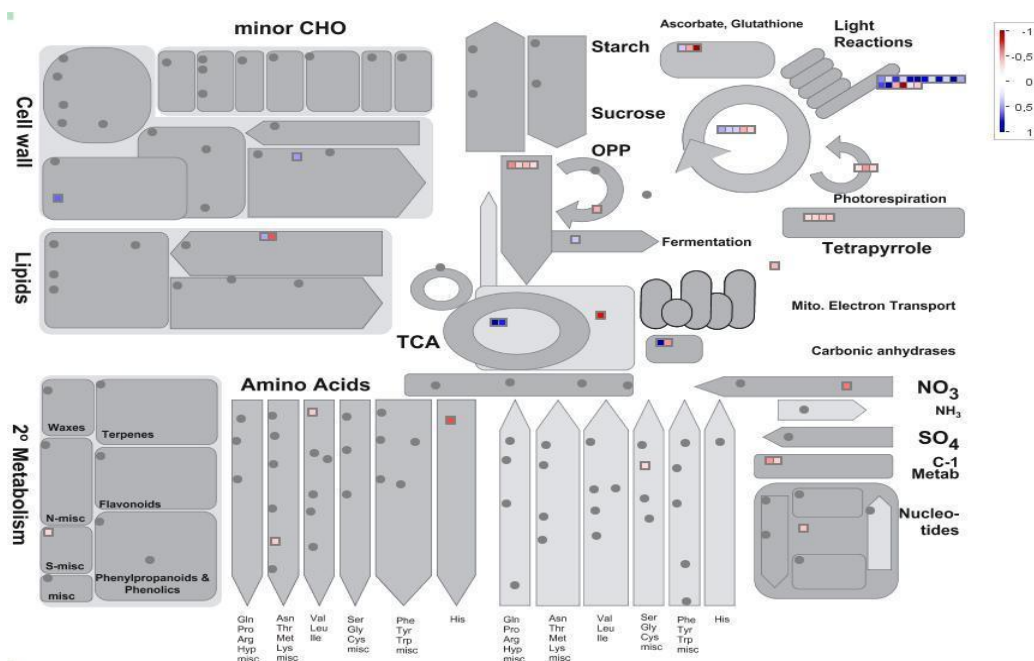


Figura 19: Modelo de visualização de proteínas, diferencialmente reguladas, envolvidas no metabolismo. MapMan *Metabolism overview* das proteínas diferencialmente reguladas em plantas de *A. thaliana*, expostas, durante 21 dias, aos VOCs de *G. diazotrophicus*. Cada quadrado representa uma proteína. Proteínas positivamente reguladas, em relação ao controle, são indicadas em escala de azul e negativamente reguladas, em escala de vermelho.

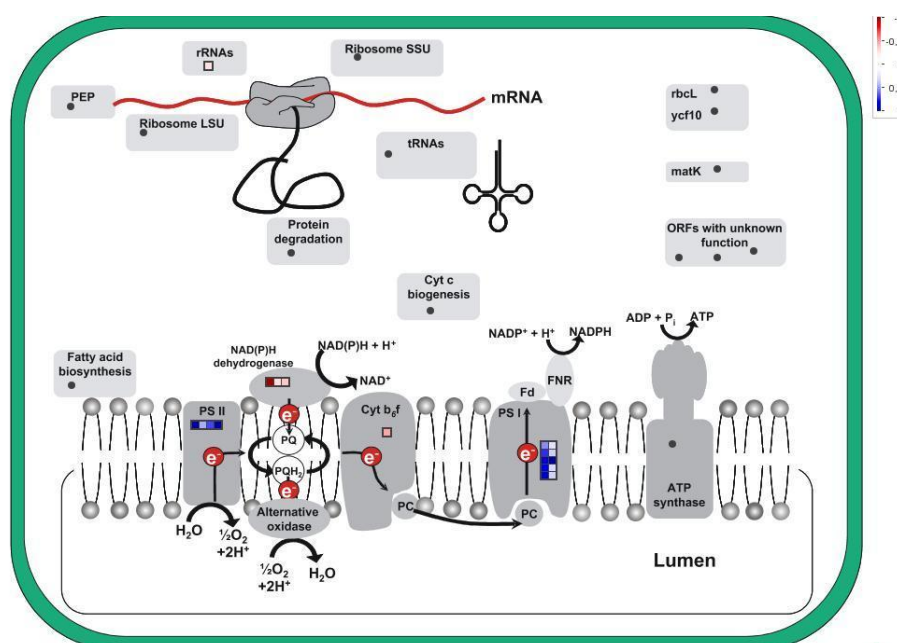


Figura 20: Modelo de visualização de proteínas, diferencialmente reguladas, envolvidas no metabolismo do cloroplasto. MapMan *Chloroplast Custom Array* das proteínas diferencialmente reguladas em plantas de *A. thaliana*, expostas, durante 21 dias, aos VOCs de *G. diazotrophicus*. Cada quadrado representa uma proteína. Proteínas positivamente reguladas, em relação ao controle, são indicadas em escala de azul e negativamente reguladas, em escala de vermelho.

Visando a avaliar a regulação das vias de resposta contra estresses bióticos, foi analisado o conjunto de proteínas reguladas sob tal critério pelo software MapMan (*Biotic stress*). Os resultados observados na Figura 18E indicam que conjuntos proteicos relacionados a vias específicas de resposta a estresse bióticos foram negativamente regulados na presença dos VOCs de *G. diazotrophicus*. Ao avaliarmos o conjunto total de proteínas reguladas quanto à participação na resposta a estresses bióticos, Figura 21, foi possível confirmar que vias de resposta a estresse abiótico foram negativamente reguladas, indicando ser este um dos mecanismos utilizados por *G. diazotrophicus* para promover o crescimento por meio de VOCs.

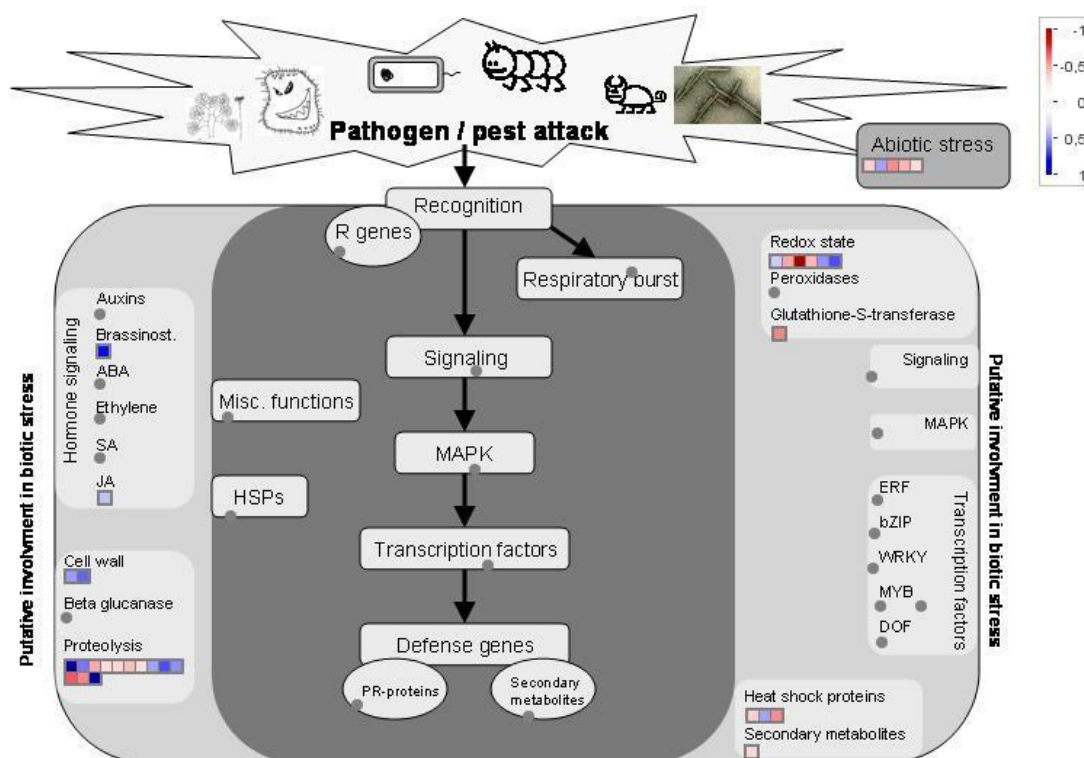


Figura 21: Modelo de visualização de proteínas, diferencialmente reguladas, envolvidas na resposta a estresses. MapMan *Biotic stress* das proteínas diferencialmente reguladas em plantas de *A. thaliana*, expostas, durante 21 dias, aos VOCs de *G. diazotrophicus*. Cada quadrado representa uma proteína. Proteínas positivamente reguladas, em relação ao controle, são indicadas em escala de azul e negativamente reguladas, em escala de vermelho.

7. DISCUSSÃO

O microbioma vegetal têm sido objeto de intenso estudo nos últimos anos devido à sua atuação nos processos de fitossanidade e produtividade vegetal (Berendsen et al., 2012). Os microrganismos associados às plantas podem, diretamente, promover o crescimento vegetal por um aumento na aquisição de nutrientes, por modulação dos níveis hormonais, ou mesmo, indiretamente, por diminuir os efeitos inibitórios de vários patógenos (Glick, 2012). Alguns microrganismos também liberam compostos voláteis orgânicos (VOCs), que, além de atuar como moléculas sinalizadoras, são capazes de promover o crescimento vegetal (Ryu et al., 2003; Lugtenberg et al., 2013). A descoberta de novos mecanismos de promoção do crescimento promovido por estes microrganismos e dos processos moleculares de interação com as plantas, fornece promissoras estratégias na busca de uma agricultura sustentável.

Gluconacetobacter diazotrophicus, bactéria promotora do crescimento vegetal, inicialmente isolada de cana-de-açúcar (Cavalcante et al., 1988; Reis et al., 1994) tem se destacado, entre os microrganismos estudados, pelo seu potencial biotecnológico. A promoção do crescimento induzida por esta bactéria decorre da sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, produzir fitormônios (Fuentes-Ramirez et al., 1993; Bastian et al., 1998), bacteriocinas (Pinon et al., 2002), sideróforos (Logeshwaran et al., 2009) e solubilizar zinco e outros compostos fosfatados inorgânicos no solo, que, posteriormente, se tornam disponíveis para a planta hospedeira (Saravanan et al., 2007; Intorne et al., 2009).

No presente trabalho, a produção de compostos voláteis por *G. diazotrophicus* foi estudada e seus efeitos na promoção do crescimento de *A. thaliana* foram demonstrados pela primeira vez.

Como primeira análise, foi avaliado o efeito dos compostos voláteis liberados por *G. diazotrophicus* na promoção do crescimento de *A. thaliana*, ecótipo Col-0, quando em cocultivo em placas de 24 poços. Os resultados demonstraram que a bactéria foi capaz de promover o crescimento das plantas, após 21 dias, com ganhos de biomassa de cerca de 86%. Tal resposta também foi obtida quando se empregou o crescimento de plantas de *A. thaliana* em solo na presença da bactéria, com ganhos de 46,4%. Embora a produção de VOCs promotores do crescimento vegetal já tenha sido relatada em outras espécies bacterianas, este é o primeiro trabalho a relatar tal característica em *G. diazotrophicus*.

Ruy et al. (2003), foi o primeiro trabalho a demonstrar a promoção do crescimento de *A. thaliana* por compostos voláteis bacterianos. Neste trabalho, foram empregadas sete bactérias promotoras do crescimento vegetal, sendo que três delas - *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Enterobacter cloacae* - foram capazes de promover o crescimento de *A. thaliana in vitro*. Tal resposta sugeriu que a síntese de VOCs é um fenômeno bactéria-específico. A promoção do crescimento vegetal, por VOCs, também já foi descrita para outras bactérias e em outras culturas. Espécies de bactérias associadas com a rizosfera, como *Burkholderia cepaciae* *Staphylococcus epidermidis*, produzem VOCs, que, embora ainda não totalmente identificados, promovem o crescimento de *A. thaliana*, com ganhos de 20 a 30% (Vespermann et al., 2007). Em trabalhos com *Pseudomonas chlororaphis*, foi observado que a produção de 2,3-butanodiol por esta bactéria foi capaz de promover o crescimento de tabaco (Han et al., 2006).

Além da indução do crescimento vegetal, bactérias e fungos promotores do crescimento liberam compostos voláteis que ativam a defesa vegetal em resposta a bactérias patogênicas e estresses abióticos (Ryu et al., 2004; Kishimoto et al., 2007; Rudrappa et al., 2010; Song et al., 2013). O cocultivo de *A. thaliana* com *Bacillus subtilis* foi capaz de induzir resistência sistêmica contra *Erwinia carotovora*, sendo esta uma via de sinalização dependente de etileno (Ryu et al., 2004). Rudrappa et al. (2010) demonstraram que as vias do ácido salicílico e etileno são requeridas para a indução da resistência sistêmica adquirida,

promovida por VOCs de *B. subtilis* FB17, em *A. thaliana*, contra *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Já as vias de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno são requeridas para tolerância à seca promovida por VOCs de *P. chlororaphis* (Han et al., 2006).

Com o intuito de estudar as vias de resposta vegetal ativadas por VOCs, produzidos por *G. diazotrophicus*, foi realizado ensaio utilizando mutantes de *A. thaliana*, defectivos para diferentes vias hormonais. Foi possível observar que, comparada ao ecótipo Col-0, a promoção do crescimento foi mantida, com diferentes proporções, para os mutantes para etileno (*ein3-1*), ácido salicílico (*sid2-2*), ácido abscísico (*abi4*), auxina (*aux1-7*) e ácido jasmônico (*jar1*). Interessantemente, embora o mutante *sid2-2* tenha apresentado ganho de biomassa de 91,81%, a promoção do crescimento se mostrou dependente da via do ácido salicílico, uma vez que o outro mutante desta via (*eds1*) não respondeu aos VOCs no âmbito da promoção do crescimento. Adicionalmente, o mutante *eds16* também apresentou tendência de redução na promoção do crescimento.

O ácido salicílico é um sinalizador endógeno que participa de diversos processos vegetais, tais como a defesa sistêmica contra patógenos, germinação de sementes, crescimento vegetativo, senescência, formação floral, respiração e fotossíntese. Adicionalmente, pode contribuir para a manutenção da homeostase redox por meio da regulação da atividade de enzimas antioxidantes e indução de rotas respiratórias alternativas. Evidências experimentais indicaram que o ácido salicílico é um importante regulador da fotossíntese, uma vez que influencia a estrutura de cloroplastos, a abertura estomática, os conteúdos de clorofila e carotenoides e a atividade de enzimas como a Rubisco (Rivas-San Vicente et al., 2011). Tal fato nos leva a sugerir que a promoção do crescimento por VOCs de *G. diazotrophicus* é um processo dependente de ácido salicílico, por contribuir diretamente para uma melhor performance fotossintética, transpiratória e de condutância estomática (Stevens et al., 2006).

O gene *EDS1*, Enhanced disease susceptibility 1, que codifica para uma lipase, está envolvido em vários processos biológicos como a resposta de defesa vegetal contra fungos, bactérias e vírus; metabolismo de lipídeos; metabolismo da resposta oxidativa; resistência sistêmica adquirida; e sinalização mediada por ácido salicílico (TAIR, 2016). No âmbito da defesa vegetal, existem, em *A. thaliana*, pelo menos três vias de sinalização que conduzem a expressão de

genes de defesa em resposta à ativação de proteínas R. Duas dessas são extensivamente estudadas, as vias dependentes de *EDS1* e de *NDR1* (Glazebrook, 2001). Adicionalmente, este gene está envolvido na imunidade vegetal baseada em padrões moleculares associados a patógenos (Wiermer et al., 2005). O gene *EDS16*, Enhanced disease susceptibility to *Erysiphe orontii* 16, codifica para uma proteína com atividade isocorismato e está envolvido com a resposta de defesa vegetal a bactérias e fungos, resistência sistêmica adquirida e movimento estomático (TAIR, 2016). Os mutantes para a via de ácido salicílico empregados neste trabalho apresentaram respostas diferenciadas quanto à promoção do crescimento. Tal resultado evidencia a importância da atividade deste hormônio no processo de promoção do crescimento induzido por VOCs de *G. diazotrophicus*, mostrando que as diferenças existentes entre os mutantes são os pontos chave regulados por este processo.

Entre os principais compostos voláteis produzidos por microrganismos, relacionados à promoção do crescimento vegetal, estão 2,3-butanodiol, dimetilhexadecilamina e o 2-pentilfurano (Velázquez-Becerra et al., 2011; Bailly et al., 2012). Entretanto, uma gama de outros compostos orgânicos pode ser produzido por estes organismos, inclusive com efeitos negativos. A liberação de compostos, como amônia, dimetildissulfeto, cianeto de hidrogênio (HCN) e ácido 3-fenilpropionico, por bactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas*, inibe o crescimento vegetal e apresenta efeito fitotóxico sendo utilizados como efetores para suprimir a defesa da planta hospedeira (Kai et al., 2009; Blom et al., 2011a; Blom et al., 2011b; Bailly et al., 2012).

G. diazotrophicus produz compostos voláteis que inibem o crescimento de *Fusarium oxysporum*. Entretanto, a produção de HCN não foi detectada nesta bactéria (Logeshwarn et al., 2011). No presente trabalho, embora não tenham sido caracterizados todos os compostos liberados por *G. diazotrophicus*, foi possível identificar presença de amônia. Este é um composto volátil que pode ser produzido pelos microrganismos através de diversos processos, como amonificação (Simon, 2002), degradação de aminoácidos derivados de proteínas e meio de cultura complexos (Kanapka et al., 1983), descarboxilação de aminoácidos (Özugul et al., 2007), desaminação, degradação hidrolítica da ureia (Kleiner et al., 1998). A fixação biológica de nitrogênio, reação catalisada pela

ação do complexo enzimático da nitrogenase, também é responsável por converter o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) (Stüeken, et al., 2015). Portanto, bactérias diazotróficas, como *G. diazotrophicus*, têm potencial de liberar tal composto.

A emissão de altos níveis de amônia pela rizobactéria *Serratia odorifera*, quando em cocultivo com *A. thaliana*, em placas de Petri, foi capaz de alcalinizar o meio de cultura e, conseqüentemente, reduzir o crescimento vegetal (Weise et al., 2013). Um pequeno acréscimo de pH do meio de cultura foi observado na presença de *G. diazotrophicus*, entretanto, os dados obtidos indicaram que a alcalinização e a promoção do crescimento observadas não estão relacionadas unicamente à emissão de amônia, evidenciando que o conjunto de compostos emitidos pela bactéria são importantes nesses processos.

Em meio de crescimento alcalino, as plantas apresentam alteração de crescimento em resposta à redução da disponibilidade de nutrientes. A absorção iônica radicular é influenciada pelo pH externo. O pH apresenta um efeito direto na absorção pela competição entre o H^+ e os outros cátions e do OH^- com os outros ânions. Em valores de pH muito baixos, a absorção de K^+ é afetada principalmente na ausência de Ca^+ . A faixa de pH ideal para as plantas se situa entre pH 6,0-6,5, pois a disponibilidade dos macronutrientes é máxima e a dos micronutrientes não é limitante (Marschner, 1986; Faquin, 2005). Esta faixa ideal também foi observada em nossos ensaios em que o ganho de biomassa fresca, o comprimento e a biomassa radicular de plantas de *A. thaliana* foram favorecidos. A alteração de pH do meio de cultivo, provocada pelos VOCs de *G. diazotrophicus*, está dentro da faixa ideal de crescimento vegetal, o que nos leva a sugerir que este pode ser um mecanismo indireto, porém não único, de promoção do crescimento induzida pelos compostos voláteis.

Um dos mecanismos mais estudado de promoção de crescimento de *G. diazotrophicus* é a fixação biológica de nitrogênio (Boddey et al., 1991; Cojho et al., 1993; Boddey et al., 2001; Baldani et al., 2005). Este processo converte o nitrogênio atmosférico em amônia, tornando-o disponível para as plantas (Stüeken et al., 2015). A importância da fixação de nitrogênio no processo de promoção do crescimento induzido por VOCs de *G. diazotrophicus* foi avaliada pela utilização do mutante de *G. diazotrophicus* ($\Delta pqqC$). A molécula de PQQ é cofator de diversas enzimas, como metanol desidrogenases, glicose

desidrogenases, álcool desidrogenases, que recebem o nome de quinoproteínas. As funções do PQQ estão envolvidas na tolerância a estresses oxidativos (Misra et al., 2012) e a promoção do crescimento vegetal (Choi et al., 2008). O gene *pqqC* participa da etapa final de biossíntese de PQQ e mutação neste gene inibe a fixação de nitrogênio (de Souza, 2015). Tal característica decorre do fato de a enzima glicose desidrogenase, cuja função é transformar glicose em ácido glucônico no espaço periplasmático, perder sua atividade na ausência do cofator PQQ. Durante a fixação biológica de nitrogênio, a atuação desta enzima é fundamental, produzindo grande quantidade de energia para a bactéria, já que a ação da nitrogenase demanda alta concentração energética (Galar et al., 1995; Eskin et al., 2014).

A ausência da fixação biológica de nitrogênio, associada à mutação no gene *pqqC* de *G. diazotrophicus*, não afetou a promoção do crescimento. Portanto, a produção de VOCs promotores do crescimento vegetal, independe da FBN. Curiosamente, a presença do mutante acarretou acréscimo do pH quando comparado com a bactéria selvagem. Tal fato, embora não tenha afetado a promoção do crescimento, pode estar relacionado com a ausência de produção do ácido glucônico.

Análises proteômicas têm se tornado importantes ferramentas para o estudo de processos e interações celulares. A análise proteômica de plantas de *A. thaliana*, expostas a VOCs de *G. diazotrophicus*, resumida na Figura 22, permitiu identificar 83 proteínas negativamente reguladas. Na classificação funcional e estudo de interações entre tais proteínas, 34 são relacionadas à resposta vegetal a estresses. Neste grupo, observamos proteínas de resposta a compostos químicos, substâncias inorgânicas, frio e estresse oxidativo. Entre elas, podemos destacar a ascorbato peroxidase, cuja função é fazer a remoção de peróxido de hidrogênio, e a metionina sulfoxido redutase, que protege a célula contra estresses oxidativos pela restauração da atividade de proteínas que foram inativadas por oxidação da metionina (Szklarczyk et al., 2015). Proteínas envolvidas com as vias de fotorrespiração e a via glicólise foram também negativamente reguladas. A fotorrespiração é consequência da oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato, catalisada pela rubisco (Maurino et al., 2010). Em teoria, uma redução nas taxas de fotorrespiração aumentaria as taxas de CO₂ fixados e, assim, o crescimento vegetal. Entretanto, tal efeito não foi observado em

mutantes para essa via, que apresentaram retardo no crescimento. Este processo, além de requerer grande gasto energético, pode prover adicional proteção contra estresses oxidativos em altas concentrações luminosas, prevenindo danos aos aparatos fotossintéticos, tendo assim função de proteção vegetal (Maurino et al., 2010).

Muitos trabalhos têm demonstrado que o crescimento vegetal e a produtividade são perturbadas quando a defesa é induzida (Walters et al., 2007; Bolton, 2009). Tal efeito pode ser atribuído aos efeitos tóxicos dos mecanismos de defesa utilizados, ao desbalanço hormonal acarretado ou pode ocorrer se a defesa alterar a interação com organismos benéficos, como as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (Heil et al., 2002). A demanda energética do processo de defesa envolve a expressão de um grande número de genes, compostos antimicrobianos e compostos sinalizadores de defesa, que desviam os recursos do crescimento e da produtividade (Walters et al., 2007; Bolton, 2009). A maioria dos mutantes de *A. thaliana* em que a sinalização ou a resposta de defesa associada ao ácido salicílico são constitutivamente aumentadas apresentam como resposta negativa decréscimos no crescimento e desenvolvimento (Heil et al., 2002). A síntese de proteínas de defesa PR1, dependentes de ácido salicílico, em tecidos foliares infectados, representa mais de 1% de todas as proteínas presentes. Desta forma, todos os átomos de nitrogênio e carbono utilizados durante este processo não puderam ser empregados no metabolismo primário (Bolton, 2009).

A repressão da expressão de genes relacionados à defesa e a processos celulares de grande demanda energética, como a fotorrespiração, obtidos neste trabalho, indica que os compostos voláteis produzidos por *G. diazotrophicus* regulam o sistema metabólico e de defesa vegetal, permitindo alocação de recursos energéticos para a promoção do crescimento. Paralelamente, pode-se sugerir que este seja um mecanismo que a bactéria utiliza no processo de interação com a planta, reprimindo o sistema de defesa e facilitando a associação endofítica.

Concomitantemente à redução da defesa, as análises dos dados de proteômica (via agrupamentos funcionais/ Software String10) revelaram que os VOCs produzidos por *G. diazotrophicus* regularam positivamente o acúmulo de proteínas relacionadas às vias fotossintéticas, síntese de aquaporinas (controle

do fluxo de água) e síntese proteica. A redução da resposta de defesa das plantas pode ser considerada uma estratégia utilizada pela bactéria para transferir recursos vegetais para os processos metabólicos de crescimento da planta .

Tal fato reverte a resposta vegetal mais comum nos processos de interação com microrganismos. Na maioria das respostas de interação com patógenos, a indução da defesa é acompanhada por inibição da expressão de genes relacionados à fotossíntese, reduzindo assim as taxas fotossintéticas (Bolton, 2009). A redução da fotossíntese pode ser considerada uma estratégia vegetal para transferir recursos para a defesa. A diminuição da taxa fotossintética aumenta a demanda energética, que pode ser utilizada na translocação de carboidratos para as áreas infectadas (Major et al., 2010). Neste processo, um considerável número de genes envolvidos com a respiração vegetal e que são responsáveis por converter nutrientes em energia, incluindo genes que codificam enzimas das rotas da glicólise e do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) são induzidos durante o processo de defesa (Bolton, 2009; Major et al., 2010). Dessa forma, é possível supor que os VOCs de *G. diazotrophicus*, de uma forma contrária, induzem repressão da resposta de defesa vegetal com o intuito final de alocar recursos para processos como a fotossíntese e a síntese proteica, que são fundamentais para o crescimento vegetal.

A indução da síntese de proteínas, como as aquaporinas, também foi observada. As aquaporinas são canais proteicos transmembrânicos que facilitam o transporte de água, pequenos solutos (ureia, ácido salicílico) ou gases (amônia e dióxido carbônico). Muitas outras funções são associadas às aquaporinas, como metabolismo de carbono, resposta a estresse oxidativo e nutrição mineral (Maurel et al., 2008). Diante de todas essas características, é possível supor que a indução dessas proteínas promovidas pelos VOCs de *G. diazotrophicus* seja importante para a aquisição de nutrientes e maior eficiência hídrica, sendo fundamentais nos processos de promoção do crescimento vegetal e resposta a estresses. *GmNOD26*, a primeira aquaporina a ser identificada, é expressa especificamente em nódulos simbióticos de fixação de nitrogênio formados após a infecção de soja pela bactéria *Rhizobiaceae* (Wallace et al., 2006). A relação simbiótica entre plantas e fungos micorrízicos altera a expressão de genes relacionados à via das aquaporinas radiculares, aumentando, assim o aporte de

água e nutrientes, fundamental em situações de estresse vegetal (Dodd et al., 2012).

A indução da expressão das diferentes vias por VOCs de *G. diazotrophicus* demonstra que a promoção do crescimento promovida por estes compostos é obtida por um maior aporte de nutrientes e fotoassimilados, maior síntese proteica e maior eficiência hídrica.

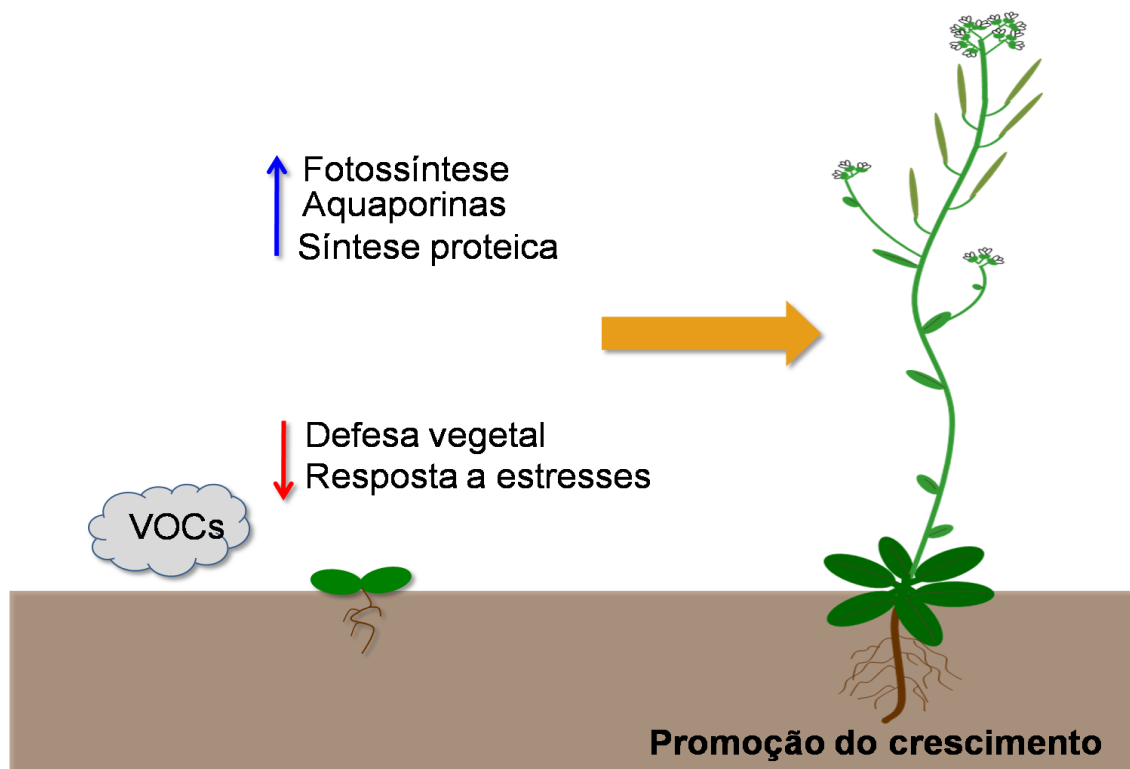


Figura 22: Esquema ilustrativo dos grupos de proteínas regulados na presença de VOCs de *G. diazotrophicus*. Grupos de proteínas, diferencialmente reguladas, na presença de VOCs de *G. diazotrophicus*, promotores do crescimento vegetal, após 21 dias. As análises foram baseadas nos dados de classificação funcional fornecidos pelo programa Blast2Go e pelos dados de interações proteicas fornecidos pelo programa String. Grupos de proteínas reguladas positivamente são representadas pela seta em azul e os grupos de proteínas negativamente reguladas são representadas em vermelho.

A promoção do crescimento de *A. thaliana*, *in vitro*, induzida pelos VOCs de *G. diazotrophicus*, também caracterizada em solo, demonstra a importância do conhecimento e do manejo dos microrganismos presentes neste ambiente, visto que são capazes de influenciar o crescimento vegetal mesmo sem que ocorra a interação física com as plantas. O entendimento das vias hormonais envolvidas e das proteínas diferencialmente reguladas durante o processo fornece novas

informações sobre os mecanismos utilizados por bactérias benéficas para colonização e indução da promoção do crescimento vegetal. A futura identificação das moléculas responsáveis pelos efeitos observados fornecerá um melhor detalhamento dos processos vegetais regulados, que culminam na promoção do crescimento. Tais descobertas, de grande potencial biotecnológico, fornecerão novos conhecimentos sobre o processo de interação planta-bactéria, podendo, dessa forma, ser extrapolados para manejo da microbiota, associada a diferentes culturas de interesse agrônomo.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Os VOCs produzidos por *G. diazotrophicus* promovem o crescimento vegetal;
- ✓ A via do ácido salicílico regula o processo de promoção do crescimento induzido pelos VOCs de *G. diazotrophicus*;
- ✓ *G. diazotrophicus* produz amônia, mas, este não é o composto responsável pela promoção do crescimento vegetal;
- ✓ As vias de fixação biológica de nitrogênio e de *pqqC* não são alvo de atuação dos VOCs de *G. diazotrophicus*;
- ✓ Os VOCs produzidos por *G. diazotrophicus* alteram o pH do meio de cultura, mas, esta alteração não é responsável pela promoção do crescimento vegetal;
- ✓ Os VOCs produzidos por *G. diazotrophicus* regulam positivamente as vias relacionadas ao processo fotossintético, aquaporinas e síntese proteica e negativamente as vias de defesa e resposta a estresses abióticos;

✓ A promoção do crescimento de *A. thaliana*, caracterizada em solo, induzida pelos VOCs de *G. diazotrophicus*, demonstra a importância do conhecimento e do manejo dos microrganismos presentes neste ambiente, visto que são capazes de influenciar o crescimento vegetal mesmo sem interação física com as plantas.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ❖ A futura identificação das moléculas voláteis responsáveis pelos efeitos de promoção do crescimento vegetal fornecerá um melhor entendimento dos processos vegetais regulados, que culminam na promoção do crescimento;
- ❖ Os resultados visuais obtidos sugerem que alterações no sistema radicular vegetal são induzidas na presença dos VOCs, o que justifica análises futuras;
- ❖ A promoção do crescimento, induzida pelos VOCs, em plantas crescidas em solo, mostra a importância do manejo da microbiota do solo, justificando futuros estudos para outras culturas vegetais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebersold, R. e Mann, M. 2003.** Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003, Vol. 422, pp. 198–207.
- Audrain, Bianca, et al. 2015.** Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015, Vol. 39, 2, pp. 222-233.
- Baerenfaller, K., et al. 2008.** Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. *Science* 2008;320:938–41. *Science*. 2008, Vol. 320, pp. 938–941.
- Baginsky, S. e Gruissem, W. 2006.** *Arabidopsis thaliana* proteomics: from proteome to genome. *Journal of Experimental Botany*. 2006, Vol. 57, pp. 1485–1491.
- Baginsky, S. 2009.** Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrometry Reviews*. 2009, Vol. 28, pp. 93–120.
- Bailly, A. I. e Weisskopf, L. 2012.** The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: Current knowledge and future challenges. *Plant Signaling and Behavior*. 2012, Vol. 7, pp. 79-85.
- Baldani, J. I. e Baldani, L. D. 2005.** History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2005, Vol. 77, pp. 549-579.
- Baldani, J. I., et al. 1997.** Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*. 5-6, 1997, Vol. 29, pp. 911-922.
- Baldani, J. I., et al. 2014.** The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*. 2014, Vol. 384, pp. 413–431.

- Baldwin, I. T. 2010.** Plant volatiles. *Current Biology*. 2010, Vol. 20, pp. 392-397.
- Bari, R. e Jones, J.D.G. 2009.** Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Molecular Biology*. 2009, Vol. 69, pp. 473-488.
- Bashan, Y. e Holguin, G. 1998.** Proposal for the division of plant growth-promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*. 1998, Vol. 30, pp. 1225-1228.
- Bashan, Y. 1994.** Symptom expression and ethylene production in leaf blight of cotton caused by *Alternaria macrospora* and *Alternaria alternata* alone and combined. *Canadian Journal of Botany*. 1994, Vol. 72, pp. 1574-1579.
- Bastian, F., et al. 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 Regulated*. 1998, Vol. 24, pp. 7-11.
- Bednarek, P., Kwon, C. e Schulze-Lefert, P. 2010.** Not a peripheral issue: secretion in plant-microbe interactions. *Current Opinion of Plant Biology*. 2010, Vol. 13, pp. 378-387.
- Beltran-Garcia, M. J., Estarron-Espinosa, M. e Ogura, T. 1997.** Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, Vol. 45, pp. 4049-4052.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. e Bakker, P. 2012.** The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 2012, Vol. 17, pp. 478-486.
- Berg, G. 2009.** Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, Vol. 84, pp. 11-18.
- Bertalan, M., et al. 2009.** Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*. 2009, Vol. 10, p. 450.
- Bitas, V., et al. 2013.** Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2013, Vol. 26, pp. 835-843.
- Blom, D., et al. 2011a.** Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental Microbiology*. 2011a, Vol. 13, pp. 3047-3058.
- Blom, D., et al. 2011b.** Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Applied Environmental Microbiology*. 2011b, Vol. 77, pp. 1000-1008.
- Boddey, R. M., et al. 1991.** Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant and Soil*. 1991, Vol. 137, pp. 111-117.

- Boddey, R. M., et al. 2001.** Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to sugarcane and other grasses. *Australian Journal of Plant Physiology*. 2001, Vol. 28, pp. 889-905.
- Bolton, M.D. 2009.** Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2009, Vol. 22, pp. 487–497.
- Bonfante, P. e Anca, I. A. 2009.** Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology*. 2009, Vol. 63, pp. 363-383.
- Bos, L.D., Sterk, P.J. e Schultz, M.J. 2013.** Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLOS Pathogens*. 2013, Vol. 9, pp. 1-8.
- Brady, S.M., et al. 2007.** A high resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*. 2007, Vol. 318, pp. 801–806.
- Britto, D.T. e Kronzucker, H.J. 2002.** NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*. 2002, Vol. 159, pp. 567–584.
- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J. e Woodcock, C. M. 2005.** Insect host location: A volatile situation. *Trends in Plant Science*. 2005, Vol. 10, pp. 269-274.
- Buée, M., et al. 2009.** The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil*. 2009, Vol. 321, pp. 189-212.
- Bulgarelli, D., et al. 2012.** Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*. 2012, Vol. 488, pp. 91-95.
- Calderan-Rodrigues, M.J., et al. 2014.** Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. *Proteomics*. 6, 2014, Vol. 14, pp. 738–749.
- Cavalcante, V. A. e Döbereiner, J. 1988.** A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*. 1988, Vol. 108, pp. 23-31.
- Cavalini, F. C., Lima, L. B. e Oviedo, V. R. S. 2004.** *Triagem de mutantes hormonais: citocina e etileno.*, Universidade de São Paulo. Piracicaba – SP : s.n., 2004. p. 130, Tese (Doutorado em Biologia).
- Chagué, V., et al. 2006.** Ethylene sensing and gene activation in *Botrytis cinerea*: a missing link in ethylene regulation of fungus–plant interactions? *Molecular Plant-Microbe In.* 2006.
- Cho, S. M., et al. 2008.** 2R,3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2008, Vol. 21, pp. 1067-1075.

- Choi, O., et al. 2008.** Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant Physiology*. 2, 2008, Vol. 146, pp. 657–668.
- Cocking, E. C. e Stone, P. J. 2006.** Intracelular colonization of roots of *Arabidopsis* and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *In Vitro Cellular and Development Biology*. 2006, Vol. 42, pp. 74–82.
- Cojho, E.H., et al. 1993.** Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiology Letters*. 1993, Vol. 106, 3, pp. 341-346.
- Coleman-Derr, D. e Tringe, S. G. 2014.** Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*. 2014, Vol. 5, pp. 1-6.
- Compant, S., Clément, C. e Sessitsch, A. 2010.** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010, pp. 669-678.
- de Souza, A. L. S. R., et al. 2015.** Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant and Soil*. 2015, Vol. 399, pp. 257-270.
- de Souza, S. A. 2015.** O Papel das vias de pirroloquinolina quinona em *Gluconacetobacter diazotrophicus* na tolerância a estresses ambientais e na promoção do crescimento vegetal. Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes : s.n., 2015. p. 111, Tese.
- de Torres-Zabala, M. e al., et. 2007.** *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal*. 2007, Vol. 26, pp. 1434–1443.
- de Vos, M., et al. 2005.** Signal Signature and Transcriptome Changes of *Arabidopsis* During Pathogen and Insect Attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2005, Vol. 18, pp. 923-937.
- Dietel, K., et al. 2013.** Bacterial Traits Involved in Colonization of *Arabidopsis thaliana* Roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *The Plant Pathology Journal*. 1, 2013, Vol. 29, pp. 59–66.
- Dixon, E., et al. 2011.** Solid-Phase Microextraction and the Human Fecal VOC Metabolome. *Plos One*. 2011, Vol. 6, pp. 1-9.
- Dixon, R. e Kahn, D. 2004.** Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews*. 2004, Vol. 2, pp. 621-631.

- Dodd, I. C. e Ruiz-Lozano, J. M. 2012.** Microbial enhancement of crop resource use efficiency. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012, Vol. 23, pp. 236–242.
- Domon, B. e Aebersold, R. 2010.** Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nature Biotechnology*. 2010, Vol. 28, pp. 710–721.
- Dong, X. 2004.** NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*. 2004, Vol. 7, pp. 547–552. .
- Dong, Z., Mccully, M. E. e Canny, M.J. 1997.** Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. . *Annals of Botany London*. 1997, pp. 147-158.
- Effmert, U., et al. 2012.** Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*. 2012, Vol. 38, pp. 665-703.
- Endo, M., et al. 2014.** Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature*. 2014, Vol. 515, pp. 419–422.
- Eriksson, J. e Fenyo, D. 2007.** Improving the success rate of proteome analysis by modeling protein-abundance distributions and experimental designs. *Nature Biotechnology*. 2007, Vol. 25, pp. 651–655.
- Eskin, N., Vessey, K. e Tian, L. 2014.** Research Progress and Perspectives of Nitrogen Fixing Bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Monocot Plants. *International Journal of Agronomy*. 2014, pp. 1-13.
- Ezquer, I., Li, J., et al. 2010.** Microbial volatile emissions promote accumulation of exceptionally high levels of starch in leaves in mono-and-dicotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology*. 2010, Vol. 51, pp. 1674-1693.
- Faquin, V. 2005.** *Nutrição mineral de plantas*. Lavras : Universidade Federal de Lavras, 2005. p. 175.
- Farag, M. A., et al. 2006.** GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*. 2006, Vol. 67, pp. 2262-2268.
- Faust, K. e Raes, J. 2012.** Microbial interactions: from networks to models. *Nature*. 2012, Vol. 10, pp. 538-550.
- Felle, H. 1998.** The apoplastic pH of the *Zea mays* root cortex as measured with pH-sensitive microelectrodes: aspects of regulation. *Journal Experimental of Botany*. 1998, Vol. 49, pp. 987–995.
- Fuentes-Ramirez, L.E., et al. 1993.** *Acetobacter diazotrophicus* in indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* . 1993, Vol. 154, pp. 145-150.

- Gaiero, J. R., et al. 2013.** Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*. 2013, Vol. 100, pp. 1738-1750.
- Galar, M. L. e Boiardi, J. L. 1995.** Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, Vol. 43, pp. 713-716.
- Glazebrook, J. 2001.** Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*. 2001, Vol. 4, pp. 301-308.
- Glick, B. R. 2012.** Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*. 2012, Vol. 2012, p. 15.
- Göhre, V. e Robatzek, S. 2008.** Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*. 2008, Vol. 46, pp. 189-215.
- Gunnell, D., et al. 2007.** The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health*. 7, 2007, Vol. 21, p. 357.
- Gupta, B., et al. 2013.** Plant Abiotic Stress: 'Omics' Approach. *Plant Biochemistry and Physiology*. 2013, Vol. 1, p. 2.
- Hallmann, A., et al. 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 1997, Vol. 43, pp. 895-914.
- Han, S. H., et al. 2006.** GacS-dependent production of 2R,3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006, Vol. 19, pp. 924-930.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S. e van Elsas, J. D. 2008.** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends of Microbiology*. 2008, Vol. 16, pp. 463-471.
- Heil, M. e Baldwin, I.T. 2002.** Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*. 2002, Vol. 7, pp. 61-67.
- Hollis, J. P. 1951.** Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*. 1951, Vol. 41, pp. 350-367.
- Huckelhoven, R. 2007.** Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*. 2007, Vol. 45, pp. 101-127.
- Initiative, Arabidopsis Genome. 2000.** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2000, Vol. 408, pp. 796-815.

- Intorne, A.C., et al. 2012.** Essential role of the *czc* determinant for cadmium , cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *International Microbiology*. 2, 2012, Vol. 15, pp. 69–78.
- Intorne, A.C., et al. 2009.** Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology*. 5, 2009, Vol. 191, pp. 477–483.
- James, E. K. e Olivares, F. L. 1998.** Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Review of Plant Science*. 1998, Vol. 17, pp. 77-119.
- James, E.K., et al. 1994.** Infection of sugar-cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *The Journal of Experimental Botany*. 45, 1994, Vol. 275, pp. 757-766.
- James, P. 1997.** Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. 1997. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1997, Vol. 30, pp. 279–331.
- Jin, Q., et al. 2003.** Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Microbes Infection*. 2003, Vol. 5, pp. 301-310.
- Kai, M. e Piechulla, B. 2009a.** Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles - An effect of CO₂? *FEBS Letters*. 2009a, Vol. 583, pp. 3473-3477.
- Kai, M., et al. 2009.** Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, Vol. 81, pp. 1001-1012.
- Kai, M., et al. 2010.** *Serratia odorifera*: analysis of volatile emission and biological impact of volatile compounds on *Arabidopsis thaliana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, Vol. 88, pp. 965–976.
- Kamo, M., et al. 1995.** Separation and characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1995, Vol. 16, pp. 423–430.
- Kanapka, J.A. e Kleinberg, I. 1983.** Catabolism of arginine by the mixed bacteria in human salivary sediment under conditions of low and high glucose concentration. *Archives of Oral Biology*. 1983, Vol. 11, pp. 1007–1015.
- Kasan, K. e Manners, J.M. 2009.** Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. 7, 2009, Vol. 14, pp. 373-382.
- Kishimoto, K., et al. 2007.** Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*. 2007, Vol. 73, pp. 35-37.
- Kleiner, D., Traglauer, A. e Domm, S. 1998.** Does ammonia production by *Klebsiella* contribute to pathogenesis? *Bull Inst Pasteur*. 1998, Vol. 96, pp. 257–265.

- Kloepper, J. W. e Schroth, M. N. 1978.** Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Angers, França : Station de Pathologic Vegetal et Phytobacteriologic, 1978. Vol. 2, pp. 879-882.
- Komatsu, S., Kajiwara, H. e Hirano, H. 1993.** A rice protein library a data-file of rice proteins separated by 2-dimensional electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics* . 1993, Vol. 86, pp. 935–942.
- Krämer, U. 2015.** Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*. 4, 2015, pp. 1-13.
- Kwon, Y. S., et al. 2010.** Proteome analysis of *Arabidopsis* seedlings exposed to bacterial volatiles. *Planta*. 2010, Vol. 232, pp. 1355–1370.
- Leeder, A. C., Palma-Guerrero, J. e Glass, N. L. 2011.**The social network: Deciphering fungal language. *Nature Reviews Microbiology*. 2011, Vol. 9, pp. 440-451.
- Lin, W., Okon, Y. e Hardy, R.W.F. 1983.** Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, Vol. 45, pp. 1775-1779.
- Liu, H., Sadygov, R.G. e Yates, J.R. 2004.** A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical Chemistry*. 14, 2004, Vol. 76, pp. 4193–4201.
- Liu, X. e Zhang, H. 2015.** The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 2015, Vol. 6, pp. 1-6.
- Logeshwaran, P., Thangaraju, M. e Rajasundari, K. 2009.** Hydroxamate Siderophores of Endophytic Bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* Isolated from Sugarcane Roots. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3, 2009, Vol. 4, pp. 3564–3567.
- Logeshwarn, P., Thangaraju, M. e Rajasundari, K. 2011.** Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against *Fusarium oxysporum* in sweet potato (*Ipomea batatus*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2011, Vol. 44, pp. 216–223.
- Loper, J. E. e Schroth, M. N. 1986.** Influence of bacteria sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugarbeet. *Phytopathology*. 1986, Vol. 76, pp. 386-389.
- Lugtenberg, B. e Kamilova, F. 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 2009, Vol. 63 , pp. 541–556.
- Lugtenberg, B. J. J., et al. 2013.** Plant growth promotion by microbes. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*. s.l. : F. J. de Bruijn, 2013, Vol. 2, pp. 561–573.

- Luna, M.F., et al. 2010.** Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnology letters*. 2010, Vol. 32, 8, pp. 1071–1076.
- Lundberg, D.S., et al. 2012.** Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*. 2012, Vol. 488, pp. 86-90.
- Mac Donald, E.M., et al. 1986.** Secretion of Zeatin, Ribosylzeatin, and Ribosyl-1" - Methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi*: Plasmid-Coded Cytokinin Biosynthesis. *Plant Physiology* . 1986, Vol. 82, pp. 742–747.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V.S. e Jovi, D. B. S. S. 2004.** Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiology Research* . 2004, Vol. 159, 3, pp. 233–243.
- Major, I.T., et al. 2010.** Photosynthetic and respiratory changes in leaves of poplar elicited by rust infection. *Photosynthesis Research*. 2010, Vol. 104, pp. 41–48.
- Mareque, C., et al. 2014.** Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Annals of Microbiology*. 2014, Vol. 65, 2, pp. 1057–1067.
- Marschner, H. 1986.** *Mineral nutrition of higher plants*. s.l. : London, Academic Press Inc., 1986. p. 674.
- Maurel, C., et al. 2008.** Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*. 2008, Vol. 59, pp. 595–624.
- Maurino, V. G. e Peterhansel, C. 2010.** Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010, Vol. 13, pp. 249–256.
- Mayak, S., Tirosh, T. e Glick, B. R. 2004.** Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*. 2004, Vol. 166, pp. 525–530.
- Meinke, D. W., et al. 1998.** *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Genome*. 1998, Vol. 282, pp. 662-682.
- Millet, Y. A., et al. 2010.** Innate Immune Responses Activated in *Arabidopsis* Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell*. 2010, Vol. 22, pp. 973–990.
- Mirza, M.S., et al. 2001.** Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil*. 2001, Vol. 237, pp. 47-54.
- Misra, H.S., Rajpurohit, Y.S. e Khairnar, N.P. 2012.** Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *Journal of Biosciences*. 2012, Vol. 37, 2, pp. 313–325.

- Mitchell-Olds, T. e Schmitt, J. 2006.** Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in Arabidopsis. *Nature*. 2006, 441, pp. 947–952.
- Møldrup, M. E., Geu-Flores, F. e Halkier, B. A. 2013.** Assigning Gene Function in Biosynthetic Pathways: Camalexin and Beyond. *Plant Cell*. 2013, Vol. 25, pp. 360-367.
- Monteiro, R. A., et al. 2012.** Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*. 2012, Vol. 356, pp. 175-196.
- Murashige, T. e Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962, Vol. 15, pp. 473–497.
- Muthukumarasamy, R., et al. 2005.** Natural association of Gluconacetobacter diazotrophicus and diazotrophic Acetobacter peroxydans with wetland rice. *Systematic Applied Microbiology*. 2005, Vol. 28, pp. 277-286.
- Natarajan, S., et al. 2005.** Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry*. 2005, Vol. 342, pp. 214–220.
- Navarro, L., et al. 2008.** DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*. 6, 2008, Vol. 18, pp. 650-655.
- Neilson, K.A., et al. 2011.** Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*. 2011, Vol. 11, pp. 535–553.
- O’Callaghan, A.C. K. J., Dixon, B. R. A. e Cocking, E. C. 2001.** Arabidopsis thaliana: a model for studies of colonization by non-pathogenic and plant-growth-promoting rhizobacteria. *Australian Journal of Plant Physiology*. 2001, Vol. 28, pp. 975–982.
- O’Connell, R. J. e Panstruga, R. 2006.** Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytologist*. 2006, Vol. 171, pp. 699–718.
- Özugul, F. e Özugul, Y. 2007.** The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*. 2007, Vol. 225, pp. 385–394.
- Partida-Martínez, L. P. e Heil, M. 2011.** The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers of Plant Science*. 2011, Vol. 2, p. 100.
- Patten, C.L e Glick, B.R. 2002.** Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, Vol. 68, pp. 3795–3801.
- Pieterse, C. M. J., et al. 2009.** Networking by small-molecule hormones in plant. *Nature Chemical Biology*. 2009, Vol. 5, p. 5.

- Pinon, D., et al. 2002.** Gluconacetobacter diazotrophicus, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against Xanthomonas albilineans, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology*. 2002, Vol. 153, pp. 345–351.
- Pleban, S., Ingel, F. e Chet, I. 1995.** Control of Rhizoctonia solani and Sclerotium rolfsii in the greenhouse using endophytic Bacillus spp. . *European Journal of Plant Pathology*. 1995, Vol. 101, pp. 665–672.
- Plieth, C., Sattelmacher, B. e Knight, M.R. 2000.** Ammonium uptake and cellular alkalization in roots of Arabidopsis thaliana: The involvement of cytoplasmic calcium. *Physiologia Plantarum*. 2000, Vol. 110, pp. 518–523.
- Puehringer, S., Metlitzky, M. e Schwarzenbacher, R. 2008.** The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC Biochemistry*. 2008, Vol. 9, 1, p. 8.
- Redman, R. S., et al. 2002.** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*. 2002, Vol. 298, pp. 1581–1581.
- Reis, V.M., Olivares, F.L. e Döbereiner, J. 1994.** Improved methodology for isolation of Acetobacter diazotrophicus and confirmation of its habitat. . *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1994, Vol. 10, pp. 101-104.
- Riggs, P.J., et al. 2001.** Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Functional Plant Biology*. 2001, Vol. 28, 9, pp. 829–836.
- Rivas-San Vicente, M. e Plasencia, J. 2011.** Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*. 2011, Vol. 62, pp. 3321–3338.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. e Jones, J. D. G. 2011.** Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*. 2011, Vol. 49, pp. 317-343.
- Rudrappa, T., et al. 2010.** The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in Arabidopsis thaliana. *Communicative and Integrative Biology*. 2010, Vol. 3, pp. 130–138.
- Ryden, J. C. e Mc Neil, J. E. 1984.** Application of micrometeorological mass balance method to the determination of ammonia loss from a grazed sward. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1984, Vol. 35, pp. 1297-1310.
- Ryu, C. M., et al. 2004.** Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2004, Vol. 134, pp. 1017-1026.
- Ryu, C. M., et al. 2003.** Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003, Vol. 100, pp. 4927-4932.
- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M. e Thangaraju, M. 2007.** Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium

Gluconacetobacter diazotrophicus. . *Chemosphere* . 2007, Vol. 66, pp. 1794–1798.

Saunders, M., Glenn, A. E. e Kohn, L. M. 2010. Exploring the evolutionary ecology of fungal endophytes in agricultural systems: Using functional traits to reveal mechanisms in community processes. *Evolutionary Applications*. 2010, Vol. 3, pp. 525-537.

Schlaeppi, K., et al. 2014. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2014, Vol. 111, pp. 585–592.

Schulz, S. e Dickschat, J.S. Bacterial volatiles: the smell of small. 2007. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*. 2007, Vol. 24, pp. 814-842.

Schulze, X. W. e Usadel, B. 2010. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annual Review of Plant Biology*. 2010, Vol. 61, pp. 491–516.

Silva, F. D. A. e Azevedo, C. D. 2002. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2002, Vol. 4, pp. 71-78.

Simon, J. 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002, Vol. 26, pp. 285–309.

Simons, K. e Gerl, M. J. 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews*. 2010, Vol. 11, pp. 688-699.

Sohrabi, M., et al. 2014. Volatile organic compounds as novel markers for the detection of bacterial infections. *Clinical Microbiology*. 2014, Vol. 3, pp. 1-6.

Somerville, C. e Koornneef, M. 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics*. 2002, Vol. 3, pp. 883–889.

Song, G. C. e Ryu, C. M. 2013. Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, Vol. 14, pp. 9803–9819.

Splivallo, R., et al. 2007. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2007, Vol. 175, pp. 417-424.

Stephan, M. P., et al. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1991, Vol. 77, pp. 67-72.

Stevens, J., Senaratna, T. e Sivasithamparam, K. 2006. Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation. *Plant Growth Regulation*. 2006, Vol. 49, pp. 77–83.

- Strobel, G. A., et al. 2001.** Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 2001, Vol. 147, pp. 2943-2950.
- Strobel, G. e Daisy, B. 2003.** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003, Vol. 67, pp. 491-502.
- Stueken, E. E., et al. 2015.** Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. *Nature*. 2015, pp. 1-5.
- Szklarczyk, D., et al. 2015.** STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*. 2015, Vol. 43, pp. 447-452.
- TAIR. 2016.** <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>. *The Arabidopsis Information Resource*. [Online] 2016. [Citado em: 29 de janeiro de 2016.]
- Tejera, N.A., et al. 2003.** Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. . *Journal of Applied Microbiology*. 5, 2003, Vol. 95, pp. 28-35.
- Thimm, O., et al. 2004.** MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 6, 2004, Vol. 37, pp. 914–939.
- Thorn, R.M.S. e Greenman, J. 2012.** Microbial volatile compounds in health and disease conditions. . *Journal of Breath Research*. 2012, Vol. 6.
- Timmusk, S. e Wagner, E. G. H. 1999.** The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12. 1999, Vol. 12, pp. 951–959.
- Turner, T. R., James, E. K. e Poole, P. S. 2013.** The plant microbiome. *Genome Biology*. 2013, Vol. 14, p. 209.
- Van der Hoorn, R. A. L. e Jones, J. D. G. 2004.** The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*. 2004, Vol. 7, pp. 400–407.
- Van der Kooij, L.A.W., De Kok, L.J. e Stulen, I. 1999.** Biomass production and carbohydrate content of *Arabidopsis thaliana* at atmospheric CO₂ concentrations from 390 to 1680 $\mu\text{mol l}^{-1}$. *Plant Biology*. 1999, Vol. 1, pp. 482-486.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. e Pieterse, C.M.J. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology*. 1998, Vol. 36, pp. 453-483.
- Vanderschuren, H., et al. 2013.** Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *Journal of Proteomics*. 2013, p. 15.

- Velázquez-Becerra, C., et al. 2011.** A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil*. 2011, Vol. 339, pp. 329-340.
- Verma, S.C., Ladha, J.K. e Tripathi, K. 2001.** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. *Journal of Biotechnology*. 2001, Vol. 91, pp. 127-141.
- Vespermann, A., Kai, M. e Piechulla, B. 2007.** Rhizobacterial volatiles affect the growth of 18 fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied Environmental Microbiology*. 2007, Vol. 73, pp. 5639-5641.
- Vickers, C. E., et al. 2009.** A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Natural Chemical Biology*. 2009, Vol. 5., pp. 283-291.
- Wallace, I.S., Choi, W.G. e Roberts, D.M. 2006.** The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta* . 2006, Vol. 1758, pp. 1165–1175.
- Walters, D. e Heil, M. 2007.** Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2007, Vol. 71, pp. 3–17.
- Weise, T., Kai, M. e Piechulla, B. 2013.** Bacterial ammonia causes significant plant growth inhibition. *PlosOne*. 5, 2013, Vol. 8, pp. 1-7.
- Wheatley, R.E. 2002.** The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Leeuwenhoek*. 2002, Vol. 81, pp. 357–364.
- Whipps, J. 2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 2001, Vol. 52, pp. 487-511.
- Wiermer, M., Feys, B. e Parker, J. 2005.** Plant immunity: The EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology*. 2005, Vol. 8, pp. 383-389.
- Winter, C.M., et al. 2011.** LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Developmental Cell*. 2011, Vol. 20, pp. 430–443.
- Winter, D., et al. 2007.** An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PlosOne*. 2007, Vol. 2, pp.1-12.
- Xia, Y., et al. 2015.** Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in Plant Science*. 2015, Vol. 6, p. 490.
- Yates, J.R. 2004.** Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2004, Vol. 33, pp. 297–316.

- Zhang, H., et al. 2009.** A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deWciency-inducible mechanisms. *The Plant Journal*. 2009, Vol. 58, pp. 568–577.
- Zhang, H., et al. 2007.** Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. *Planta*. 2007, Vol. 226, pp. 839-851.
- Zhang, H., et al. 2008.** Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 2008, Vol. 21, pp. 737–744.
- Zust, T., et al. 2012.** Natural enemies. *Science drive geographic variation in plant defenses*. 2012, Vol. 338, pp. 116–119.

APÊNDICE

Tabela Suplementar 1- Proteínas negativamente reguladas

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT4G08390.4	2	2	12,0003	0,007351857	2,950735	SAPX stromal ascorbate peroxidase
AT1G60950.1	3	2	21,939	0,000385118	2,5972811	FED A, ATFD2 2Fe-2S ferredoxin-like superfamily protein
AT4G21860.1	2	2	11,3183	0,034919891	2,1169702	MSRB2 methionine sulfoxide reductase B 2
AT3G17390.1	4	1	39,239	0,03686607	2,0478301	MTO3, SAMS3, MAT4 S-adenosylmethionine synthetase family protein
AT1G75350.1	1	1	5,9783	0,002319121	1,7852696	emb2184 Ribosomal protein L31
AT3G63540.1	3	3	18,3278	0,097723419	1,7667151	Mog1/PsbP/DUF1795-like photosystem II reaction center PsbP family protein
AT1G16880.1	5	3	42,6189	0,01165381	1,765605	uridylyltransferase-related
AT3G01450.1	2	1	11,1129	0,087149484	1,7628089	ARM repeat superfamily protein
AT2G41680.1	2	1	11,2406	0,108666098	1,7623398	NTRC NADPH-dependent thioredoxin reductase C
AT5G11670.1	5	4	28,4691	0,012420165	1,751752	ATNADP-ME2, NADP-ME2 NADP-malic enzyme 2
AT2G39770.1	1	1	5,0395	0,109214075	1,710636	CYT1, VTC1, SOZ1, EMB101, GMP1 Glucose-1-phosphate adenylyltransferase family protein
AT5G01410.1	7	3	59,9876	0,153958334	1,6973373	PDX1, ATPDX1.3, RSR4, PDX1.3, ATPDX1 Aldolase-type TIM barrel family protein
AT5G58070.1	3	3	18,2709	0,007764172	1,6965354	ATTIL, TIL temperature-induced lipocalin
AT1G26630.1	2	2	12,7905	0,103043094	1,6649469	FBR12, ATELF5A-2, ELF5A-2 Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 (eIF-5A 1) protein
AT2G03440.1	1	1	5,6184	0,101056927	1,6536735	NRP1, ATNRP1 nodulin-related protein 1
AT1G64740.1	5	1	48,1875	0,015741423	1,6510353	TUA1 alpha-1 tubulin
AT3G20390.1	5	5	41,0207	0,000265647	1,645743	endoribonuclease L-PSP family protein
AT3G10670.1	1	1	5,7294	1,39E-05	1,6382946	ATNAP7, NAP7 non-intrinsic ABC protein 7
AT5G18770.1	1	1	10,049	0,185671504	1,6378231	F-box/FBD-like domains containing protein
AT5G04430.1	3	2	17,0074	0,044301348	1,6322596	BTR1, BTR1S binding to TOMV RNA 1L (long form)
AT4G26900.1	3	3	17,2404	0,012602038	1,6083029	AT-HF, HISN4 HIS HF

Tabela Suplementar 1- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT5G40370.1	2	2	12,6801	0,177165527	1,6028679	Glutaredoxin family protein
AT5G16390.2	1	1	5,9042	0,027049286	1,5997732	CAC1, CAC1A, BCCP, BCCP1, CAC1-A, BCCP-1 chloroplastic acetylcoenzyme A carboxylase 1
AT5G35360.1	8	1	55,169	0,075053122	1,5949718	CAC2 acetyl Co-enzyme a carboxylase biotin carboxylase subunit
AT4G29370.1	2	1	11,7288	0,046169876	1,5755992	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT1G06430.1	8	1	68,8649	0,093595679	1,5666084	FTSH8 FTSH protease 8
AT2G31670.1	3	2	17,2364	0,102649681	1,5654541	Stress responsive alpha-beta barrel domain protein
AT5G54770.1	2	2	20,5647	0,007103289	1,5553992	THI1, TZ, THI4 thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast (ARA6) (THI1) (THI4)
AT2G33800.1	6	5	42,1077	0,019032088	1,5342214	Ribosomal protein S5 family protein
AT5G51460.2	2	1	12,9506	0,142806109	1,5217257	ATTPPA Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT5G09650.1	7	7	44,6657	0,120731801	1,5194471	AtPPa6, PPa6 pyrophosphorylase 6
AT1G11430.1	1	1	6,792	0,14527423	1,5147327	plastid developmental protein DAG, putative
AT3G09840.1	9	7	52,7173	0,007323285	1,5134543	CDC48, ATCDC48, CDC48A cell division cycle 48
AT2G27720.3	1	1	6,8044	0,00125359	1,5124497	60S acidic ribosomal protein family
AT1G03090.1	1	1	5,9782	0,105481469	1,5095435	MCCA methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha chain
AT2G15620.1	7	6	41,9623	0,026811451	1,5094655	NIR1, NIR, ATHNIR nitrite reductase 1
AT4G23890.1	2	2	11,99	0,065700149	1,4968018	unknown protein
AT4G16143.2	2	2	11,1672	0,01442922	1,4899293	IMPA-2 importin alpha isoform 2
AT2G24200.2	7	1	45,971	0,170163781	1,4834232	Cytosol aminopeptidase family protein
AT1G62480.1	1	1	6,628	0,187413307	1,4817235	Vacuolar calcium-binding protein-related
AT2G29450.1	5	4	35,7966	0,02842156	1,478582	ATGSTU5, ATGSTU1, AT103-1A, GSTU5 glutathione S-transferase tau 5
AT5G17310.2	14	2	93,048	0,008109811	1,4753923	UGP2 UDP-glucose pyrophosphorylase 2

Tabela Suplementar 1- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT4G39756.1	2	1	18,589	0,015879824	1,4721757	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT3G23600.1	5	4	28,3183	0,13359932	1,4652551	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G36320.1	4	3	26,3661	0,308842371	1,4644454	unknown protein
AT3G12580.1	24	5	219,6463	0,025439309	1,4602398	HSP70, ATHSP70 heat shock protein 70
AT5G47700.1	1	1	5,7092	0,241772002	1,4584459	60S acidic ribosomal protein family
AT5G39570.1	4	4	23,1721	0,406566389	1,4564514	unknown protein
AT3G14930.3	1	1	5,283	0,261519641	1,4529682	HEME1 Uroporphyrinogen decarboxylase
AT3G63190.1	3	3	19,7108	0,148212276	1,4447968	RRF, HFP108, cpRRF, AtcpRRF ribosome recycling factor, chloroplast precursor
AT5G16970.1	5	4	29,9403	0,039373341	1,4412707	AT-AER, AER alkenal reductase
AT5G48810.1	2	2	21,2196	0,112438702	1,4408054	ATB5-B, B5 #3, ATCB5-D, CB5-D cyto
AT1G70410.3	7	3	42,3739	0,04557629	1,4376772	ATBCA4, BCA4 beta carbonic anhydrase 4
AT4G33010.1	31	11	290,2367	0,004858682	1,4369742	AtGLDP1, GLDP1 glycine decarboxylase P-protein 1
AT3G46550.1	1	1	5,5309	0,212247612	1,432071	SOS5 Fasciclin-like arabinogalactan family protein
AT2G26740.1	1	1	6,7733	0,270939812	1,429882	ATSEH, SEH soluble epoxide hydrolase
AT1G74050.1	4	1	29,88	0,007159671	1,42477	Ribosomal protein L6 family protein
AT2G21660.1	5	3	47,6151	0,046444523	1,4243489	ATGRP7, CCR2, GR-RBP7, GRP7 cold, circadian rhythm, and rna binding 2
AT1G78320.1	3	1	28,1182	0,418084464	1,4232776	ATGSTU23, GSTU23 glutathione S-transferase TAU 23
AT3G14067.1	3	2	17,4882	0,066489991	1,4226418	Subtilase family protein
AT3G59920.1	3	1	16,747	0,341115956	1,4199148	ATGDI2, GDI2 RAB GDP dissociation inhibitor 2
AT2G36250.1	3	1	17,0203	0,022863266	1,4195081	FTSZ2-1, ATFTSZ2-1 Tubulin/FtsZ family protein
AT4G22240.1	7	4	54,9261	0,037440799	1,4174757	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein
AT1G35720.1	5	4	30,3604	0,118783502	1,412228	ANNAT1, OXY5, ATOXY5 annexin 1

Tabela Suplementar 1- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT5G12040.2	1	1	5,7879	0,133668403	1,4108641	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase family protein
AT2G42130.4	1	1	5,4833	0,256196954	1,4107369	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein
AT4G13430.1	7	6	42,3283	0,112683549	1,3968471	IIL1, ATLEUC1 isopropyl malate isomerase large subunit 1
AT1G19570.1	11	7	90,7661	0,014497597	1,3957515	DHAR1, ATDHAR1, DHAR5 dehydroascorbate reductase
AT3G23940.2	7	6	39,9806	0,016107314	1,3955712	dehydratase family
AT5G55280.1	2	2	12,1697	0,094795838	1,3930742	FTSZ1-1, ATFTSZ1-1, CPFTSZ homolog of bacterial cytokinesis Z-ring protein FTSZ 1-1
AT1G11840.6	4	4	24,1596	0,157462253	1,3896845	GLX1 glyoxalase I homolog
AT4G03280.1	8	7	69,1739	0,029578425	1,3887206	PETC, PGR1 photosynthetic electron transfer C
AT4G04020.1	8	7	64,0099	0,014181967	1,3853949	FIB fibrillin
AT2G47390.1	1	1	5,2837	0,039534277	1,3851342	Prolyl oligopeptidase family protein
AT4G15545.1	3	3	17,2941	0,456885166	1,3837628	unknown protein
AT4G31300.1	2	2	12,1995	0,11673828	1,381786	PBA1 N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolases) superfamily protein
AT5G65620.1	2	1	11,5625	0,042954472	1,3813597	Zincin-like metalloproteases family protein
AT4G01440.1	1	1	5,0001	0,166179156	1,3797306	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT3G04790.1	7	4	52,0219	0,005448043	1,3785522	Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein
AT1G09310.1	3	2	18,8338	0,108710679	1,3743315	Protein of unknown function, DUF538
AT5G62700.1	19	1	142,1343	0,212820693	1,3729525	TUB3 tubulin beta chain 3
AT2G25450.1	3	2	17,3118	0,197185763	1,3722922	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT2G38230.1	9	3	85,3067	0,034453173	1,3634813	ATPDX1.1, PDX1.1 pyridoxine biosynthesis 1.1
AT1G13930.1	2	2	14,2497	0,200459662	1,3613412	Involved in response to salt stress. Knockout mutants are hypersensitive to salt stress.
AT1G30230.2	4	3	27,5786	0,028689117	1,3586876	Glutathione S-transferase, C-terminal-like
AT2G16600.2	2	2	13,4722	0,003855917	1,3582386	ROC3 rotamase CYP 3

Tabela Suplementar 1- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT4G38680.1	1	1	6,8149	0,04672011	1,3568527	GRP2, CSDP2, CSP2, ATCSP2 glycine rich protein 2
AT3G53900.1	1	1	6,718	0,103150077	1,3540264	UPP, PYRR uracil phosphoribosyltransferase
AT1G67280.1	10	10	65,2388	0,015056469	1,3520817	Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily protein
AT1G54010.1	5	3	38,8261	0,187407822	1,3498313	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT5G52840.1	3	3	18,3636	0,01547155	1,3468449	NADH-ubiquinone oxidoreductase-related
AT3G06050.1	4	4	24,3322	0,008871974	1,3465676	PRXIIF, ATPRXIIF peroxiredoxin IIF
AT4G11010.1	4	4	32,1592	0,274816039	1,3443818	NDPK3 nucleoside diphosphate kinase 3
AT5G51820.1	9	7	55,2164	0,024429294	1,3427888	PGM, ATPGMP, PGM1, STF1 phosphoglucomutase
AT1G18080.1	10	9	68,073	0,07975578	1,3395235	ATARCA, RACK1A_AT, RACK1A Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT5G15090.1	7	5	52,1125	0,012792078	1,3373035	VDAC3, ATVDAC3 voltage dependent anion channel 3
AT4G34870.1	2	2	15,7197	0,20078662	1,330822	ROC5, ATCYP1 rotamase cyclophilin 5
AT2G20270.1	1	1	6,3933	0,235462834	1,3289135	Thioredoxin superfamily protein
AT4G20850.1	5	5	26,6981	0,017162275	1,3269523	TPP2 tripeptidyl peptidase ii
AT2G19480.1	3	2	18,1058	0,138585994	1,3213352	NFA02, NFA2, NAP1
AT1G73180.2	2	2	10,868	0,012710697	1,3210677	Eukaryotic translation initiation factor eIF2A family protein
AT4G29350.1	2	2	12,9484	0,254103754	1,3194188	PFN2, PRO2, PRF2 profilin 2
AT3G04400.1	1	1	6,9106	0,562490818	1,3188571	emb2171 Ribosomal protein L14p/L23e family protein
AT1G01200.1	1	1	5,5831	0,079923986	1,3161652	ATRABA3, ATRAB-A3, RABA3 RAB GTPase homolog A3
AT1G03475.1	7	5	44,8901	0,000514025	1,3131176	LIN2, HEMF1, ATCPO-I Coproporphyrinogen III oxidase
AT4G09320.1	8	7	71,5432	0,004081548	1,3111932	NDPK1 Nucleoside diphosphate kinase family protein
AT4G35450.4	3	1	16,8403	0,01890595	1,3048845	AKR2, AFT, AKR2A ankyrin repeat-containing protein 2
AT4G18480.1	7	5	54,281	0,039868522	1,3038761	CHLI1, CH42, CH-42, CHL11, CHLI-1 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein

Tabela Suplementar 1- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT4G29060.1	20	13	148,2256	0,039105999	1,3038749	emb2726 elongation factor Ts family protein
AT1G25490.1	1	1	5,3063	0,017574334	1,3034274	RCN1, REGA, ATB BETA BETA, EER1 ARM repeat superfamily protein
AT1G16080.1	3	3	17,2893	0,349391049	1,3019009	unknown protein
AT5G17710.1	3	3	25,8503	0,01283213	1,3016554	EMB1241 Co-chaperone GrpE family protein
AT5G66190.1	21	14	198,3859	0,003624478	1,2989372	ATLFNR1, FNR1 ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1
AT3G27280.2	3	2	19,1852	0,193826276	1,2984244	ATPHB4, PHB4 prohibitin 4
AT2G30200.1	5	5	28,3672	0,067558397	1,2980297	catalytics
AT1G78860.1	4	1	23,9784	0,29539333	1,2968648	D-mannose binding lectin protein with Apple-like carbohydrate-binding domain
AT1G78380.1	7	5	74,6551	0,06759632	1,2964415	ATGSTU19, GST8, GSTU19 glutathione S-transferase TAU 19
AT1G29670.1	1	1	11,834	0,047731517	1,2951467	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT5G44340.1	14	2	108,9914	0,539781059	1,2931725	TUB4 tubulin beta chain 4
AT4G34200.1	7	6	38,8167	0,120384425	1,2922493	EDA9 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
AT3G18490.1	2	2	11,0966	0,005919307	1,2915168	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT3G58610.1	11	10	101,6837	0,039995769	1,2884872	ketol-acid reductoisomerase
AT5G60600.3	4	1	23,6256	0,324973686	1,2883655	GCPE, ISPG, CSB3, CLB4, HDS 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase
AT3G48990.1	12	10	73,8769	0,13016935	1,2845633	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
AT1G11910.1	2	2	11,3783	0,334766873	1,2844392	APA1, ATAPA1 aspartic proteinase A1
AT1G14810.1	5	5	29,8902	0,008750765	1,2832774	semialdehyde dehydrogenase family protein
AT4G37930.1	28	14	274,0744	0,001001847	1,2788955	SHM1, STM, SHMT1 serine transhydroxymethyltransferase 1
AT1G15930.1	3	2	20,1107	0,050210301	1,2759814	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein
AT2G04030.1	19	16	137,2759	0,043441375	1,275246	CR88, EMB1956, HSP90.5, Hsp88.1, AtHsp90.5 Chaperone protein htpG family protein
AT3G61440.1	8	8	56,2331	0,136277679	1,2735744	ATCYSC1, ARATH

Tabela Suplementar 1- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT5G28500.1	4	4	22,6849	0,198877676	1,2707785	unknown protein
AT1G78830.1	7	3	44,4777	0,075687183	1,2705189	Curculin-like (mannose-binding) lectin family protein
AT5G52520.1	2	2	11,2303	0,129714722	1,2703768	OVA6, PRORS1 Class II aaRS and biotin synthetases superfamily protein
AT3G52380.1	4	4	25,2292	0,050152533	1,2699465	CP33, PDE322 chloroplast RNA-binding protein 33
AT2G36530.1	13	13	96,9461	0,003615745	1,268797	LOS2, ENO2 Enolase
AT4G38740.1	6	5	45,554	0,001350373	1,2622633	ROC1 rotamase CYP 1
AT1G78370.1	4	4	27,133	0,129340208	1,2615836	ATGSTU20, GSTU20 glutathione S-transferase TAU 20
AT2G28000.1	24	20	228,1387	0,032387077	1,2613844	CPN60A, CH-CPN60A, SLP chaperonin-60alpha
AT1G56190.1	19	4	225,5492	0,093956792	1,2612608	Phosphoglycerate kinase family protein
AT2G40490.1	3	3	18,9074	0,003616189	1,259351	HEME2 Uroporphyrinogen decarboxylase
AT3G26060.1	9	8	70,7159	0,066023983	1,2529538	ATPRX Q Thioredoxin superfamily protein
AT3G14210.1	7	7	78,346	0,028048699	1,2514825	ESM1 epithiospecifier modifier 1
AT1G31180.1	6	2	35,9735	0,285758441	1,2511347	ATIMD3, IMD3, IPMDH1 isopropylmalate dehydrogenase 3
AT1G02560.1	5	5	30,6741	0,018296398	1,2510234	CLPP5, NCLPP5, NCLPP1 nuclear encoded CLP protease 5
AT4G09650.1	12	12	131,8496	0,085415371	1,2466263	ATPD ATP synthase delta-subunit gene
AT3G48730.1	11	5	80,7545	0,03037327	1,2449851	GSA2 glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2
AT1G11860.2	22	19	231,4965	0,013398251	1,2426016	Glycine cleavage T-protein family
AT4G28706.1	1	1	5,844	0,088465804	1,2424512	pfkB-like carbohydrate kinase family protein
AT2G37190.1	5	2	34,0329	0,071673584	1,2420129	Ribosomal protein L11 family protein
AT4G14710.4	1	1	5,1219	0,261575166	1,2415431	ATARD2 RmlC-like cupins superfamily protein
AT3G55330.1	2	2	12,2006	0,301173278	1,240561	PPL1 PsbP-like protein 1
AT3G15360.1	3	3	33,8705	0,098879391	1,2401531	ATHM4, TRX-M4, ATM4 thioredoxin M-type 4

Tabela Suplementar 1- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT3G52930.1	18	10	191,918	0,009864863	1,2391638	Aldolase superfamily protein
AT4G02530.1	5	5	36,1585	0,024254054	1,2390836	chloroplast thylakoid lumen protein
AT3G26450.1	5	4	49,5882	0,001119289	1,2385507	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT3G12290.1	5	3	30,1035	0,080748821	1,2375656	Amino acid dehydrogenase family protein
AT3G01280.1	5	3	35,892	0,057558491	1,2361721	VDAC1, ATVDAC1 voltage dependent anion channel 1
AT4G33350.2	1	1	5,7383	0,350103957	1,2352926	Tic22-like family protein
AT2G37220.1	7	6	60,2532	0,002855036	1,2338692	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
AT4G21630.1	1	1	11,4532	0,054202129	1,2314979	Subtilase family protein
AT1G47128.1	9	8	74,3006	0,037328859	1,2294128	RD21, RD21A Granulin repeat cysteine protease family protein
AT3G48420.1	8	7	50,952	0,084553292	1,2289363	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT2G43090.1	2	2	12,8407	0,322722845	1,2285491	Aconitase/3-isopropylmalate dehydratase protein
AT1G09340.1	21	19	249,5976	0,0002253	1,2265447	CRB, CSP41B, HIP1.3 chloroplast RNA binding
AT3G46970.1	2	2	16,2027	0,101034225	1,2259019	ATPHS2, PHS2 alpha-glucan phosphorylase 2
AT5G20720.1	17	15	144,009	0,041344445	1,2247364	CPN20, CPN10, CHCPN10, ATCPN21, CPN21 chaperonin 20
AT1G21750.1	5	4	30,3533	0,143556663	1,2225237	ATPDIL1-1, ATPDI5, PDI5, PDIL1-1 PDI-like 1-1
AT1G20020.1	18	9	166,2718	0,033804249	1,2216943	ATLFR2, FNR2 ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 2
AT3G22110.1	1	1	5,7445	0,108738941	1,2210165	PAC1 20S proteasome alpha subunit C1
AT3G16420.3	5	1	46,7735	0,346379526	1,2180822	PBP1 PYK10-binding protein 1
AT5G45390.1	5	5	49,4365	0,011126376	1,2166291	CLPP4, NCLPP4 CLP protease P4
AT5G26000.1	21	17	236,1222	0,108576495	1,2160623	TGG1, BGLU38 thioglucoside glucohydrolase 1
AT1G62380.1	3	3	19,288	0,349451	1,2159143	ACO2, ATACO2 ACC oxidase 2
AT5G55190.1	4	2	40,3305	0,288749905	1,2157934	RAN3, ATRAN3 RAN GTPase 3

Tabela Suplementar 1- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT3G58140.1	2	2	10,8024	0,31346522	1,2149753	phenylalanyl-tRNA synthetase class IIc family protein
AT4G20890.1	14	2	109,0064	0,321988865	1,2142868	TUB9 tubulin beta-9 chain
AT4G39260.2	5	3	47,527	0,278734719	1,2135228	CCR1, ATGRP8, GR-RBP8, GRP8 cold, circadian rhythm, and RNA binding 1
AT5G19510.1	7	4	65,3857	0,018488243	1,2121276	Translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6 family protein
AT3G14415.3	22	7	258,6848	0,013086313	1,2115811	Aldolase-type TIM barrel family protein
AT3G48690.1	1	1	5,0207	0,232276564	1,2115401	ATCXE12, CXE12 alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G70890.1	3	3	17,4018	0,207300504	1,2115036	MLP43 MLP-like protein 43
AT1G62750.1	15	13	111,404	0,063539068	1,2108615	ATSCO1, ATSCO1/CPEF-G, SCO1 Translation elongation factor EFG/EF2 protein
AT2G07698.1	18	11	154,5458	0,052466411	1,2083782	ATPase, F1 complex, alpha subunit protein
AT3G09820.1	6	6	47,7193	0,211536327	1,208097	ADK1, ATADK1 adenosine kinase 1
AT1G07890.1	15	13	158,3634	0,199344476	1,2059503	APX1, MEE6, CS1, ATAPX1, ATAPX01 ascorbate peroxidase 1
AT4G11600.1	4	3	23,4202	0,090477665	1,2039623	ATGPX6, PHGPX, LSC803, GPX6 glutathione peroxidase 6
AT5G08690.1	19	16	176,6715	0,10626525	1,2033844	ATP synthase alpha/beta family protein
AT5G10160.1	2	2	13,3609	0,215700029	1,2026954	Thioesterase superfamily protein
AT3G03250.1	17	7	121,8409	0,076452528	1,2020067	UGP, UGP1, AtUGP1 UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1

Tabela Suplementar 2- Proteínas positivamente reguladas

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT3G49120.1	3	3	17,4981	0,324361875	1,202241544	ATPERX34, PERX34, PRXCB, ATPCB, PRX34 peroxidase CB
AT1G23190.1	10	5	72,9357	0,164671881	1,203262812	PGM3 Phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein
AT2G34420.1	9	1	136,2431	0,009287017	1,204434915	LHB1B2, LHCB1.5 photosystem II light harvesting complex gene B1B2
AT3G25920.1	6	5	37,6627	0,348241657	1,208013078	RPL15 ribosomal protein L15
AT1G54410.1	2	2	21,5082	0,167453615	1,208973559	dehydrin family protein
AT4G30074.1	1	1	5,3497	0,128320274	1,211401833	LCR19 low-molecular-weight cysteine-rich 19
AT1G57720.1	9	5	63,9474	0,179692773	1,211796367	Translation elongation factor EF1B, gamma chain
AT3G59980.1	2	2	11,5842	0,345467059	1,21811297	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
AT5G07030.1	7	6	41,195	0,369037686	1,220890613	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT2G20260.1	8	5	86,6013	0,335966551	1,222324505	PSAE-2 photosystem I subunit E-2
AT1G65980.1	3	2	24,3974	0,260393887	1,227437631	TPX1 thioredoxin-dependent peroxidase 1
AT1G53750.1	2	2	11,0743	0,384553305	1,230027805	RPT1A regulatory particle triple-A 1A
ATCG00580.1	2	2	21,9681	0,004174781	1,237387965	PSBE photosystem II reaction center protein E
AT4G05180.1	10	8	64,6177	0,178488496	1,240344453	PSBQ, PSBQ-2, PSII-Q photosystem II subunit Q-2
AT5G14200.3	8	5	50,3865	0,312730922	1,241032303	isopropylmalate dehydrogenase 1
AT5G26780.3	16	5	121,9574	0,112539454	1,241729728	SHM2 serine hydroxymethyltransferase 2
AT2G04780.1	1	1	6,3303	0,384231011	1,244467694	FLA7 FASCICLIN-like arabinogalactan 7
AT2G43030.1	6	6	44,7499	0,215680163	1,244688932	Ribosomal protein L3 family protein
AT4G01850.2	5	1	37,5189	0,621448428	1,245497139	SAM-2, MAT2, SAM2, AtSAM2 S-adenosylmethionine synthetase 2
AT5G17170.1	5	3	29,9089	0,118307729	1,248947174	ENH1 rubredoxin family protein

Tabela Suplementar 2- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT4G13940.1	21	6	190,2414	0,137935688	1,254803851	HOG1, EMB1395, SAHH1, MEE58, ATSAHH1 S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase
ATCG00710.1	2	2	11,9327	0,022623719	1,260001045	PSBH photosystem II reaction center protein H
AT2G41840.1	3	2	26,5832	0,395625341	1,266123193	Ribosomal protein S5 family protein
AT5G38410.1	13	4	200,7131	0,001175843	1,266405716	Ribulose biphosphate carboxylase (small chain) family protein
AT1G28290.2	1	1	5,5205	0,156074308	1,269042378	AGP31 arabinogalactan protein 31
AT4G33680.1	10	10	60,2029	0,090475913	1,269994042	AGD2 Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein
AT5G54270.1	3	3	49,9207	0,023710578	1,271639686	LHCB3, LHCB3*1 light-harvesting chlorophyll B-binding protein 3
AT2G46820.1	5	5	41,5735	0,0668071	1,271922445	PTAC8, TMP14, PSAP, PSI-P photosystem I P subunit
AT4G01690.1	3	3	17,4888	0,126324094	1,273218452	PPOX, HEMG1, PPO1 Flavin containing amine oxidoreductase family
AT3G54050.1	12	12	111,6167	0,004625101	1,276359815	HCEF1 high cyclic electron flow 1
AT2G17390.1	4	2	23,0525	0,003246934	1,276491836	AKR2B ankyrin repeat-containing 2B
AT3G23810.1	16	1	140,7029	0,356208155	1,281265825	SAHH2, ATSAHH2 S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) hydrolase 2
AT1G24120.1	3	1	18,8267	0,560369159	1,282700536	ARL1 ARG1-like 1
AT5G07440.2	2	1	16,5357	0,257940007	1,285420415	GDH2 glutamate dehydrogenase 2
AT4G35830.1	11	6	73,5309	0,13049581	1,28606367	ACO1 aconitase 1
AT3G52880.2	18	17	141,1885	0,001704097	1,288266558	ATMDAR1, MDAR1 monodehydroascorbate reductase 1
AT3G15730.1	3	2	17,3179	0,086809623	1,288405435	PLDALPHA1, PLD phospholipase D alpha 1
AT1G74920.2	1	1	5,6238	0,382006718	1,29023183	ALDH10A8 aldehyde dehydrogenase 10A8
AT3G54890.4	3	3	23,4882	0,112917398	1,291150429	LHCA1 photosystem I light harvesting complex gene 1
AT3G25520.1	4	4	24,9303	0,060236594	1,291858786	ATL5, PGY3, OLI5, RPL5A ribosomal protein L5
AT2G42220.1	3	2	17,8257	0,14434948	1,295444187	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein
AT1G54100.1	3	3	18,8764	0,003797455	1,295691246	ALDH7B4 aldehyde dehydrogenase 7B4

Tabela Suplementar 2- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
ATCG00770.1	2	2	12,1279	0,211204409	1,295702581	RPS8 ribosomal protein S8
AT1G20010.1	14	1	102,7269	0,125564917	1,30195699	TUB5 tubulin beta-5 chain
AT4G39330.1	6	5	39,81	0,176620683	1,302364974	ATCAD9, CAD9 cinnamyl alcohol dehydrogenase 9
AT4G28520.1	1	1	5,7485	0,035738586	1,305647674	CRU3, CRC cruciferin 3
AT3G05590.1	4	3	25,3185	0,307391622	1,311231303	RPL18 ribosomal protein L18
AT5G35560.1	2	1	11,3287	0,015785494	1,314240856	DENN (AEX-3) domain-containing protein
AT3G16470.1	6	6	45,6408	0,007649805	1,315120707	JR1 Mannose-binding lectin superfamily protein
AT5G67500.1	3	3	22,9963	0,032492568	1,31937821	VDAC2, ATVDAC2 voltage dependent anion channel 2
AT2G45290.1	15	4	153,3106	0,445769614	1,322195765	Transketolase
ATCG00430.1	2	2	16,4761	0,160784347	1,329394544	PSBG photosystem II reaction center protein G
AT5G58420.1	12	12	86,06	0,171085821	1,334463047	Ribosomal protein S4 (RPS4A) family protein
AT3G11510.1	5	4	41,0674	0,017204618	1,335763216	Ribosomal protein S11 family protein
AT2G38770.1	4	2	25,0075	0,267661795	1,345574222	EMB2765 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT1G61520.3	6	6	73,9316	0,059429922	1,346791628	LHCA3 photosystem I light harvesting complex gene 3
AT3G54660.1	4	4	22,1886	0,295613674	1,349568125	GR, EMB2360, ATGR2 glutathione reductase
AT5G52640.1	8	1	77,2208	0,404559098	1,351972031	HSP81-1, ATHS83, HSP81.1, HSP83, ATHSP90.1, AtHsp90-1, HSP90.1 heat shock protein 90.1
AT3G47470.1	7	7	54,8347	0,114797457	1,361231961	LHCA4, CAB4 light-harvesting chlorophyll-protein complex I subunit A4
AT1G28090.2	1	1	6,5708	0,274965218	1,36466379	Polynucleotide adenylyltransferase family protein
AT5G02870.2	11	2	85,2069	0,21440606	1,364882804	Ribosomal protein L4/L1 family
AT1G72150.1	15	12	105,2657	0,05587616	1,369866241	PATL1 PATELLIN 1
AT1G12090.1	1	1	15,0008	0,111537422	1,37120172	ELP extensin-like protein

Tabela Suplementar 2- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
ATCG00490.1	46	26	660,7702	0,001195934	1,375514205	RBCL ribulose-bisphosphate carboxylases
AT3G08580.1	11	5	90,1009	0,050278823	1,377576968	AAC1 ADP/ATP carrier 1
AT1G31330.1	8	5	67,0146	0,039919274	1,377868291	PSAF photosystem I subunit F
AT3G04610.1	1	1	5,7478	0,010276648	1,379254329	FLK RNA-binding KH domain-containing protein
AT5G23540.2	1	1	5,4127	0,378528994	1,380832382	Mov34/MPN/PAD-1 family protein
AT2G28130.1	3	2	16,9222	0,319765631	1,382262485	unknown protein
AT2G38040.1	7	6	50,1422	0,02294876	1,384967629	CAC3 acetyl Co-enzyme a carboxylase carboxyltransferase alpha subunit
AT2G30950.1	13	5	122,6851	0,008815594	1,39843724	VAR2, FTSH2 FtsH extracellular protease family
AT2G25140.1	2	1	13,1745	0,033268031	1,398505111	HSP98.7, CLPB-M, CLPB4 casein lytic proteinase B4
AT5G14740.5	25	1	326,555	0,121528306	1,403330106	CA2, CA18, BETA CA2 carbonic anhydrase 2
AT1G65970.1	1	1	11,4624	0,180163545	1,409159716	TPX2 thioredoxin-dependent peroxidase 2
AT4G34020.1	2	1	10,9776	0,271491658	1,41275138	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
AT2G01140.1	8	5	85,2364	0,177818761	1,415909131	Aldolase superfamily protein
AT5G01530.1	8	3	55,2294	0,071656955	1,416348897	LHCB4.1 light harvesting complex photosystem II
AT5G64570.1	5	5	28,4134	0,016979929	1,417615238	XYL4, ATBXL4 beta-D-xylosidase 4
AT3G04230.1	3	1	18,5611	0,033003349	1,427586341	Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein
AT1G20620.1	18	9	165,5724	0,003501386	1,436700826	CAT3, SEN2, ATCAT3 catalase 3
AT2G18020.1	6	2	42,9161	0,070303734	1,437659078	EMB2296 Ribosomal protein L2 family
AT1G14320.1	6	5	47,0549	0,205014839	1,44068924	SAC52, RPL10, RPL10A Ribosomal protein L16p/L10e family protein
AT2G14110.1	1	1	7,0022	0,002877694	1,445827927	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT1G31510.1	1	1	5,2904	0,036856443	1,450249705	F-box associated ubiquitination effector family protein
AT4G01050.1	9	7	59,0639	0,009700706	1,460182383	TROL thylakoid rhodanese-like

Tabela Suplementar 2- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT1G15820.1	10	7	91,6546	0,002143063	1,46060815	LHCB6, CP24 light harvesting complex photosystem II subunit 6
AT2G28740.1	4	2	33,4992	0,106560254	1,461796831	HIS4 histone H4
AT3G57610.1	8	7	52,5316	0,050643544	1,468419065	ADSS adenylosuccinate synthase
AT5G23740.1	4	1	34,2197	0,003251054	1,478550759	RPS11-BETA ribosomal protein S11-beta
AT5G47760.1	3	2	19,5686	0,165002603	1,481778134	PGLP2, ATPGLP2, ATPK5 2-phosphoglycolate phosphatase 2
AT1G29880.1	7	3	44,8903	0,304644443	1,487223119	glycyl-tRNA synthetase / glycine--tRNA ligase
AT1G07770.1	6	5	41,5808	0,02509508	1,49271174	RPS15A ribosomal protein S15A
AT3G04920.1	2	2	11,7945	0,260116339	1,494123086	Ribosomal protein S24e family protein
AT5G10540.1	3	1	21,2719	0,009183947	1,507023393	Zincin-like metalloproteases family protein
AT5G20290.1	7	7	57,2154	0,143136492	1,511167119	Ribosomal protein S8e family protein
AT3G63410.1	2	2	13,1355	0,303968385	1,515970597	APG1, VTE3, IEP37, E37 S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT5G11880.1	5	4	28,8938	0,065010864	1,516484072	Pyridoxal-dependent decarboxylase family protein
AT1G73820.1	2	2	18,7905	0,12147617	1,525951945	Ssu72-like family protein
AT1G43170.2	9	8	85,2869	0,192880472	1,547029611	ARP1, RPL3A, RP1 ribosomal protein 1
AT2G06850.1	6	3	39,925	0,012543812	1,54852221	EXGT-A1, EXT, XTH4 xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 4
AT1G79040.1	2	2	12,4402	0,052841886	1,570088273	PSBR photosystem II subunit R
AT4G21650.1	4	4	22,5758	0,104348485	1,575189735	Subtilase family protein
AT5G55730.1	2	2	12,127	0,073024755	1,577836905	FLA1 FASCICLIN-like arabinogalactan 1
AT5G02880.1	2	1	18,7604	0,030117207	1,593355877	UPL4 ubiquitin-protein ligase 4
AT3G10920.2	4	4	29,7716	0,039388115	1,595822972	MSD1 manganese superoxide dismutase 1
AT3G20820.1	5	5	35,9647	0,006784082	1,603170918	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT4G12800.1	7	6	58,0669	0,010940738	1,612812138	PSAL photosystem I subunit I

Tabela Suplementar 2- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
AT5G44750.1	3	3	23,9072	0,054273296	1,624880678	REV1, ATREV1 DNA-directed DNA polymerases
AT3G49010.4	2	2	12,9975	0,224122778	1,630132912	ATBBC1, BBC1, RSU2 breast basic conserved 1
AT4G27440.2	2	2	12,1403	0,06145538	1,63669992	PORB protochlorophyllide oxidoreductase B
AT5G42340.1	1	1	5,1275	0,059251156	1,639948545	PUB15 Plant U-Box 15
AT3G44100.1	1	1	7,1217	0,051173282	1,642789465	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein
AT5G59370.1	11	1	90,3381	0,041344793	1,647770299	ACT4 actin 4
AT2G01800.2	1	1	5,4983	0,046379173	1,651852194	COP1-interacting protein-related
AT3G08940.2	8	4	62,7052	0,000965101	1,663532481	LHCB4.2 light harvesting complex photosystem II
AT5G50370.1	1	1	5,2106	0,223296335	1,679173015	Adenylate kinase family protein
ATCG00800.1	2	2	18,0912	0,019144438	1,692129636	structural constituent of ribosome
AT4G26970.1	4	2	22,8451	0,007438966	1,695371089	ACO2 aconitase 2
AT4G17390.1	5	5	49,5242	0,041981324	1,6969483	Ribosomal protein L23/L15e family protein
AT1G23290.1	6	5	49,7748	0,145108102	1,697852131	RPL27A, RPL27AB Ribosomal protein L18e/L15 superfamily protein
AT1G10960.1	1	1	7,1711	0,114069781	1,716131285	ATFD1, FD1 ferredoxin 1
AT4G36380.1	1	1	5,0035	0,030282535	1,736721636	ROT3 Cyto
ATCG00830.1	6	5	46,1371	0,040833547	1,743975139	RPL2.1 ribosomal protein L2
ATCG00280.1	8	8	66,0963	0,037948149	1,748077925	PSBC photosystem II reaction center protein C
AT3G18080.1	2	2	11,4297	0,008030134	1,751299351	BGLU44 B-S glucosidase 44
AT1G66200.3	7	2	60,2473	0,143356767	1,754848389	GSR2, GLN1
AT3G09630.1	11	2	84,8261	0,120382075	1,756580312	Ribosomal protein L4/L1 family
AT1G50200.2	3	2	22,7351	0,003626588	1,775704659	ALATS Alanyl-tRNA synthetase
AT3G04840.1	6	3	40,9609	0,154954178	1,78015035	Ribosomal protein S3Ae

Tabela Suplementar 2- Cont.

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
ATCG00680.1	8	8	63,5075	0,032846999	1,835778078	PSBB photosystem II reaction center protein B
AT1G69740.1	2	2	10,882	0,072999894	1,838625335	HEMB1 Aldolase superfamily protein
ATCG00020.1	4	4	37,7578	0,08203364	1,861944725	PSBA photosystem II reaction center protein A
AT1G44575.1	7	5	59,7091	0,008148583	1,864265535	NPQ4, PSBS Chlorophyll A-B binding family protein
AT3G52190.1	3	2	25,6103	0,01083476	1,900487155	PHF1 phosphate transporter traffic facilitator1
AT3G53420.2	4	2	24,2269	0,017235535	1,926631914	PIP2A, PIP2, PIP2
AT3G29720.1	1	1	12,5726	0,034195359	1,947756947	HXXXD-type acyl-transferase family protein
ATCG00720.1	1	1	14,335	0,086524815	1,987084001	PETB photosynthetic electron transfer B
AT3G13930.1	1	1	5,1627	0,026438162	1,988503643	Dihydrolipoamide acetyltransferase, long form protein
AT2G27020.1	5	5	29,3751	0,016798719	2,008814109	PAG1 20S proteasome alpha subunit G1
ATCG00270.1	4	4	28,7438	0,011711982	2,085427772	PSBD photosystem II reaction center protein D
AT4G17090.1	2	2	11,2242	0,066527841	2,11885789	CT-BMY, BAM3, BMY8 chloroplast beta-amylase
AT1G01620.1	1	1	5,4926	0,04444514	2,182862127	PIP1C, TMP-B, PIP1
AT3G61470.1	3	3	26,3134	0,000163486	2,236394708	LHCA2 photosystem I light harvesting complex gene 2
AT1G23730.1	5	3	36,9208	0,023486006	2,266279327	ATBCA3, BCA3 beta carbonic anhydrase 3
AT2G04039.1	1	1	5,5111	0,089412811	2,273375541	unknown protein
AT3G26520.1	1	1	13,16	0,002311483	2,341793017	TIP2, SITIP, GAMMA-TIP2, TIP1
AT5G43940.1	10	10	71,9508	0,044959687	2,42857494	HOT5, ADH2, GSNOR, ATGSNOR1, PAR2 GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein
ATCG00340.1	5	4	35,1291	0,007897251	2,533215707	PSAB Photosystem I, PsaA/PsaB protein
AT4G34670.1	5	2	40,7419	0,018769334	2,575665122	Ribosomal protein S3Ae
AT1G63770.2	10	10	68,5074	0,028443107	2,660885316	Peptidase M1 family protein