

O PAPEL DAS VIAS DE PIRROLOQUINOLINA QUINONA EM
Gluconacetobacter diazotrophicus NA TOLERÂNCIA A ESTRESSES
AMBIENTAIS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

SUZANE ARIÁDINA DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO – 2015

O PAPEL DAS VIAS DE PIRROLOQUINOLINA QUINONA EM
Gluconacetobacter diazotrophicus NA TOLERÂNCIA A ESTRESSES
AMBIENTAIS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

SUZANE ARIÁDINA DE SOUZA

“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
Coorientadora: Aline Chaves Intorne

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
SETEMBRO - 2015

O PAPEL DAS VIAS DE PIRROLOQUINOLINA QUINONA EM
Gluconacetobacter diazotrophicus NA TOLERÂNCIA A ESTRESSES
AMBIENTAIS E NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

SUZANE ARIÁDINA DE SOUZA

“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 30 de setembro de 2015.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Adriana Silva Hemerly (D.Sc., Biotecnologia) – UFRJ

Prof^a. Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

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

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

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza.

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

À Capes, pela concessão de bolsa durante todo o doutorado, inclusive durante o período em que estive no doutorado sanduíche.

À minha mãe, pela confiança, amor e por todo apoio.

Ao meu irmão, pelo carinho e cumplicidade.

Ao Fabrício, pela paciência e companheirismo.

Aos meus avós, por serem meus exemplos de vida.

Aos meus familiares, pela força e carinho.

Aos amigos do laboratório, pela agradável convivência. Agradeço especialmente a Luciano, Patrícia, Mariana, Roberta e Leandro pela ajuda e amizade no momento mais difícil do doutorado. Obrigada!

Ao professor Gonçalo Apolinário, pela orientação, pelos conselhos e ensinamentos.

À professora Aline Chaves Intorne, pela coorientação, por todos os conselhos, pelo exemplo de profissionalismo e pela amizade.

Aos professores Rosana Rodrigues, Fábio Olivares e Adriana Hemerly, por aceitarem fazer parte da banca examinadora desta tese de doutorado.

Aos pesquisadores Libo Shan e Ping He, pelos ensinamentos, paciência e pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduíche.

À Cynthia e Thâmara, pela amizade e pela agradável convivência.

Aos professores, técnicos e alunos do LBT e LMGV, que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Texas A&M, pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduíche e por todo apoio.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. CAPÍTULOS.....	6
3.1. Importância dos genes de biossíntese e transporte de PQQ em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> na tolerância a estresses abióticos e durante a interação com plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
3.1.1. INTRODUÇÃO	6
3.1.2. REVISÃO	8
3.1.2.1. Uso potencial das bactérias promotoras do crescimento vegetal na agricultura.....	8
3.1.2.2. Pirroloquinolina-quinona (PQQ) e seu papel nos processos biológicos	13
3.1.2.3. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	16
3.1.2.4. Tolerância a estresses em bactérias promotoras do crescimento vegetal.....	18
3.1.2.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> : modelo para estudos de interação planta-bactéria	20
3.1.2.6. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo para estudo da associação entre plantas e <i>G. diazotrophicus</i>	22
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.3.1. Micro-organismos e condições de cultivo	23

3.1.3.2. Curvas de crescimento	24
3.1.3.3. Determinação das concentrações inibitórias para <i>G. diazotrophicus</i> dos agentes estressantes	24
3.1.3.4. Tolerância a diferentes temperaturas e a peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	25
3.1.3.5. Ensaio de fixação biológica de nitrogênio.....	26
3.1.3.6. Material vegetal e condições de crescimento	26
3.1.3.7. Inoculação	26
3.1.3.8. Análise fenotípica de promoção do crescimento vegetal.....	27
3.1.3.9. Análise da colonização	27
3.1.3.10. Análises estatísticas	27
3.1.4. RESULTADOS.....	28
3.1.4.1. Identificação da fase exponencial de crescimento das bactérias	28
3.1.4.2. Análise das curvas de concentrações de estresses abióticos em <i>G. diazotrophicus</i>	29
3.1.4.3. Importância de PQQ na tolerância a estresses abióticos em <i>G. diazotrophicus</i>	31
3.1.4.4. Importância de PQQ para a fixação biológica de nitrogênio.....	36
3.1.4.5. PQQ atua na promoção do crescimento de <i>A. thaliana</i>	37
3.1.5. DISCUSSÃO	38
3.1.6 CONCLUSÕES	44
3.2. Pirroloquinolina quinona (PQQ): fator de promoção do crescimento em plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
3.2.1. INTRODUÇÃO	45
3.2.2. REVISÃO	46
3.2.2.1. Pirroloquinolina-quinona (PQQ) e a promoção do crescimento vegetal	46
3.2.2.2. Papel dos hormônios no crescimento das plantas	48
3.2.2.3. Hormônios e regulação da resposta imune	49
3.2.2.4. Proteômica	51
3.2.2.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> e seus mutantes para vias hormonais.....	53
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.3.1. Material vegetal e condições de cultivo	53
3.2.3.2. Curva com PQQ sintético	54
3.2.3.3. Confirmação da promoção do crescimento de Col-0 com PQQ sintético	54
3.2.3.4. Análise proteômica	54
3.2.3.4.1. Extração de proteínas totais	54
3.2.3.4.2. Quantificação do conteúdo de proteínas totais.....	55
3.2.3.4.3. Digestão das proteínas.....	55

3.2.3.4.4. Análise LC-MS/MS	56
3.2.3.5. Análises estatísticas	57
3.2.4. RESULTADOS.....	57
3.2.4.1. Promoção do crescimento de <i>A. thaliana</i> por PQQ sintético.....	57
3.2.4.2. Efeito do PQQ sobre o comprimento da raiz principal, número de raízes laterais e massa fresca total.....	58
3.2.4.3. Análise Proteômica.....	59
3.2.4.4. Participação das vias hormonais na resposta de <i>A. thaliana</i> ao PQQ..	63
3.2.5. DISCUSSÃO	66
3.2.6. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

SOUZA, SUZANE ARIÁDINA; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Setembro, 2015; O papel das vias de PQQ em *Gluconacetobacter diazotrophicus* na tolerância a estresses ambientais e na promoção do crescimento vegetal. Orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Coorientadora: Aline Chaves Intorne; Conselheiros: Rosana Rodrigues e Eliemar Campostrini.

O aumento no uso de fertilizantes químicos na agricultura tem causado sérios danos ao meio ambiente e elevado os custos de produção. Assim, o uso de bactérias promotoras de crescimento surge como alternativa para minimizar esses problemas. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é classificada como uma bactéria promotora do crescimento vegetal. Além de atuar em vários processos envolvidos na promoção do crescimento de plantas, esta bactéria produz a molécula pirroloquinolina quinona (PQQ), que atua em diferentes processos fisiológicos e bioquímicos em animais, bactérias e plantas. Porém, a atuação desta molécula no processo de promoção do crescimento vegetal foi pouco explorada até o momento. Diante disso, o presente trabalho objetivou entender o papel da via de biossíntese e transporte de PQQ na tolerância de *G. diazotrophicus* a estresses ambientais e na sua capacidade de interação com plantas. No capítulo 1, foi avaliado a importância dos genes da via de biossíntese e transporte de PQQ na tolerância de *G. diazotrophicus* a estresses ambientais, bem como na capacidade da bactéria em colonizar plantas e promover o crescimento vegetal. Para isso, mutantes bacterianos defectivos para os genes *pqqB*, *pqqC*, *pqqE* e *gdhA* foram

comparados à linhagem selvagem na presença de diferentes estressores. $\Delta gdhA$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ apresentaram aumento na sensibilidade aos metais pesados zinco, cobalto e cádmio. Já o mutante $\Delta pqqB$ apresentou diminuição da sensibilidade aos referidos metais. Quando estresses oxidativos, osmóticos e salinos foram testados, observou-se que $\Delta pqqB$ é mais sensível a elevadas concentrações de Na_2SO_4 e sacarose, enquanto $\Delta pqqC$ apresenta maior sensibilidade a peg e Na_2SO_4 . O mutante $\Delta pqqE$ apresentou maior sensibilidade a paraquat, peg e Na_2SO_4 . Adicionalmente, observou-se que a molécula PQQ participa do processo de fixação biológica de nitrogênio, já que os mutantes $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ perdem a capacidade de fixar nitrogênio. Interessantemente, os mutantes testados não foram capazes de promover o crescimento de *Arabidopsis thaliana*, diferentemente da bactéria selvagem, sugerindo que PQQ é uma molécula promotora do crescimento vegetal. No capítulo 2, foi analisado o efeito da molécula PQQ na promoção do crescimento vegetal, quando fornecida exogenamente. A adição de PQQ sintético a plântulas de *A. thaliana*, cultivadas *in vitro*, resultou no maior crescimento vegetal. Análises proteômicas identificaram 193 proteínas reprimidas e 182 induzidas pelo tratamento com a molécula PQQ sintética. Ao analisar o efeito de PQQ no crescimento de diferentes mutantes de *A. thaliana*, observou-se que os mutantes para via de ácido salicílico não apresentaram promoção do crescimento, indicando que a via desse hormônio participa da regulação da resposta ao PQQ em *A. thaliana*. Portanto, este trabalho revelou que PQQ é uma molécula essencial para a tolerância a estresses ambientais em *G. diazotrophicus*, bem como para interação entre bactéria-planta. O efeito de PQQ sobre o desenvolvimento vegetal corrobora a hipótese de que tal molécula seja um fator de promoção do crescimento vegetal.

Palavras-chave: bactérias endofíticas, PQQ, estresses abióticos, antioxidante, *A. thaliana*.

ABSTRACT

SOUZA, Suzane Ariádina; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; september, 2015; Role of PQQ pathway in *Gluconacetobacter diazotrophicus* tolerance to environmental stresses and to promote plant growth. Advisor: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Co-advisor:Aline Chaves Intorne; Counselors: Rosana Rodrigues and Eliemar Campostrini.

The largely use of chemical fertilizers in agriculture has caused serious damage to the environment and also high production costs. For this reason, use of plant growth promoting bacteria is an alternative to minimize these problems. *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a bacteria classified as a plant growth promoter. Besides acting in various processes involved in plant growth promotion, this bacterium produces pyrroloquinoline quinone molecule (PQQ). PQQ acts in different physiological and biochemical processes in animals, bacteria and plants. However, the role of this molecule in plant growth promotion process has been little explored until nowadays. Therefore, the purpose of this study was to understand the PQQ biosynthesis pathway and transport in *G. diazotrophicus* tolerance to environmental stresses and their ability to interact with plants. In Chapter 1, the importance of genes involved in the biosynthesis pathway and transport of PQQ in *G. diazotrophicus* tolerance to environmental stresses, as well as in the bacteria's ability to colonize plants and promote plant growth was evaluated. To further analyze that, bacterial mutants defective in *pqqB*, *pqqC*, *pqqE* and *gdhA* genes were compared to wild type in the presence of different stressors. ▲ *gdhA*, ▲ *pqqC* and ▲ *pqqE* showed increased sensitivity to the

following heavy metals: zinc, cobalt and cadmium. On the other hand, ▲ pqqB mutant exhibited reduced sensitivity to these metals. When oxidative, osmotic and salt stresses were tested, it was observed that ▲ pqqB is more sensitive to high concentrations of Na₂SO₄ and sucrose while ▲ pqqC shows higher sensitivity to PEG and Na₂SO₄. The ▲ pqqE mutant showed higher sensitivity to paraquat, PEG and Na₂SO₄. Additionally, it was observed that the PQQ molecule participates in the biological nitrogen fixation process, once the mutants ▲ pqqB, ▲ pqqC and ▲ pqqE lose the ability to fix nitrogen. Interestingly, mutants tested were not able to promote growth in *Arabidopsis thaliana* unlikely wild type bacteria, suggesting that PQQ is a plant growth promoter molecule. In Chapter 2, the effect of PQQ molecule in promoting plant growth, when supplied exogenously, was analyzed. The addition of synthetic PQQ in *A. thaliana* seedlings, grown in vitro, resulted in the increase of plant growth. Proteomic analyzes identified 193 proteins repressed and 182 induced by treatment with the synthetic molecule PQQ. To analyze the effect of PQQ in the growth of different mutants of *A. thaliana*, it was observed that mutants from salicylic acid pathway showed no growth promotion, indicating that this hormone pathway participates in the response of regulation at the PQQ in *A. thaliana*. Therefore, this work has revealed that PQQ is a key molecule for tolerance to environmental stresses in *G. diazotrophicus*, as well as interaction between bacteria-plant. The PQQ effect on plant growth corroborates the hypothesis that this molecule is a factor of plant growth promotion.

Keywords: endophytic bacteria, PQQ, abiotic stress, antioxidant, *A. thaliana*.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura mundial consome cerca de 170 milhões de toneladas/ano de fertilizantes químicos anualmente (IFA, 2014). Nas últimas décadas, tem crescido o uso de fertilizantes químicos, ao passo que os biofertilizantes têm sido negligenciados (Sabier Sae et al., 2015). Sabe-se que a aplicação destes produtos aumenta os custos de produção, prejudica os solos e ainda tem efeitos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente (Williams, 2010). Uma alternativa que tem surgido para amenizar tais danos é o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal na agricultura, PGPB, do inglês *Plant Growth Promoting Bacteria*.

As bactérias promotoras do crescimento vegetal favorecem o desenvolvimento das plantas por meio de diferentes mecanismos, destacando-se a produção de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de nutrientes e controle biológico (Lugtenberg e Kamilova, 2009). Uma característica interessante identificada em algumas destas bactérias é a capacidade de tolerar estresses abióticos e bióticos. Tal capacidade é de fundamental importância durante a associação com plantas em condições de estresse, uma vez que nessa situação a promoção do crescimento vegetal é mantida e favorecida ainda mais (Choudhary et al., 2015).

Entre as bactérias tolerantes a estresses ambientais, *Gluconacetobacter diazotrophicus* tem se destacado por apresentar tolerância a sulfato de sódio, sacarose, seca, altas temperaturas e a metais (Intorne et al., 2012; Stephan et al.,

1991; Tejera et al., 2003). Além disso, esta bactéria é identificada como promotora do crescimento vegetal (Saravanan et al., 2008). Essa característica, tanto em *G. diazotrophicus*, como em outras bactérias, pode ser resultado da produção de compostos benéficos às plantas, como a molécula pirroloquilolina quinona (PQQ).

PQQ é uma quinona aromática, que atua como cofator redox para diferentes desidrogenases bacterianas (Stites et al., 2000). Esta molécula participa de diferentes processos fisiológicos e bioquímicos em animais, bactérias e plantas. Além disso, promove benefícios na tolerância a estresses oxidativos (Misra et al., 2012) e mais recentemente foi descrita sua função como promotora do crescimento vegetal (Choi et al., 2008). Sabe-se que a única fonte de PQQ são os micro-organismos, mas sua presença foi descrita em alimentos como batata, banana, tomate, maçã, entre outros (Kumazawa et al., 1995; Mitchell et al., 1999; Noji et al., 2007).

O processo de biossíntese de PQQ em bactérias ainda não está totalmente elucidado. A maioria das bactérias que sintetizam PQQ possuem entre 4 e 7 genes (*pqqABCDEFG/G*), que estão organizados em operon. Em *G. diazotrophicus*, foram identificados cinco genes participantes da via de biossíntese de PQQ, além disso, foi mostrada a importância dessa molécula para o processo de solubilização de zinco e fósforo (Intorne et al., 2009).

A atuação de PQQ no processo de promoção do crescimento em plantas foi pouco explorada até o momento. Acredita-se que essa capacidade resulte da sua atividade antioxidante (Choi et al., 2008). Além disso, já foi descrita a participação desta molécula em processos de solubilização de fosfato (Cheng et al., 2015), na produção de substâncias antimicrobianas e no controle de fitopatógenos (GUO et al., 2009). Porém, pouco se conhece sobre os fatores envolvidos na ação dessa molécula como promotora do crescimento vegetal. Até o momento, poucos estudos avaliaram a importância de PQQ na tolerância a estresses abióticos, na interação planta-bactéria e nos mecanismos moleculares e genéticos relacionados com a capacidade de promoção do crescimento vegetal.

Um modelo interessante para o estudo do efeito de PQQ na promoção do crescimento é *Arabidopsis thaliana*, por apresentar ciclo de vida curto, genoma pequeno, fácil cultivo e disponibilidade de um vasto número de mutantes que permitem estudos de diferentes naturezas (Carneiro et al., 2015). Assim, essa

planta surge como uma ferramenta promissora de modelo para estudos de aspectos fundamentais envolvidos com o desenvolvimento vegetal, tais como crescimento de raízes, ação hormonal e vias de sinalização em resposta a condições ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a importância das vias de biossíntese e transporte de PQQ na tolerância a estresses ambientais em *Gluconacetobacter diazotrophicus* e na promoção do crescimento em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o perfil de crescimento da bactéria selvagem e dos mutantes de inserção defeituosos para os genes *gdha*, *pqqB*, *pqqC* e *pqqE*.
- ✓ Determinar as concentrações mínimas de agentes estressantes como metais pesados (cádmio, cobalto e zinco), paraquat, NaCl, Na₂SO₄, peg 400 e sacarose que afetam o crescimento de *G. diazotrophicus*
- ✓ Estudar o papel dos genes *pqqB*, *pqqC* e *pqqE* da via de biossíntese de PQQ e do gene *gdha* na tolerância da bactéria a diferentes estresses ambientais.
- ✓ Avaliar a importância dos genes *pqqB*, *pqqC* e *pqqE* da via de produção e transporte de PQQ e do gene *gdha* na fixação biológica de nitrogênio.
- ✓ Avaliar a importância da via de produção e transporte de PQQ na tolerância à temperatura e a peróxido de hidrogênio pela análise dos mutantes ▲*gdhA*, ▲*PQQB*, ▲*PQQC* e ▲*PQQE*.

- ✓ Estudar o papel da molécula PQQ na promoção do crescimento vegetal, pela inoculação dos mutantes defectivos em plantas de *A. thaliana*.
- ✓ Avaliar o efeito da adição de PQQ sintético na promoção do crescimento em plântulas de *A. thaliana*.
- ✓ Identificar, por análises proteômicas, as proteínas reguladas pela adição PQQ sintético, durante o processo de promoção do crescimento em plantas de *A. thaliana* (Col-0).
- ✓ Verificar a promoção do crescimento induzida por PQQ sintético em diferentes mutantes (*abi4*, *aux 1.7*, *ein 2.1*, *ein 3.1*, *eds 1*, *npr1* e *sid 2.2*) e no transgênico *NahG* de *A. thaliana*.

3. CAPÍTULOS

3.1. Importância dos genes de biossíntese e transporte de PQQ em *Gluconacetobacter diazotrophicus* na tolerância a estresses abióticos e durante a interação com plantas de *Arabidopsis thaliana*

3.1.1. INTRODUÇÃO

O uso de fertilizantes químicos na agricultura representa importante componente dos custos de produção, além de causar danos ao meio ambiente. Através da agricultura sustentável, busca-se reduzir o uso destes produtos e, ao mesmo tempo, identificar abordagens que mantenham a produtividade das lavouras, preservando o meio ambiente para as futuras gerações (Bacon et al., 2015). Neste cenário, o uso de PGPB surge como alternativa promissora para a redução no uso de fertilizantes industrializados na agricultura.

As PGPB promovem o crescimento das plantas por apresentarem características favoráveis ao seu desenvolvimento, tais como capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, produzir hormônios, solubilizar nutrientes, atuar no biocontrole de patógenos, produzir sideróforos e participar na biorremediação de solos contaminados (Francis et al., 2010). No caso de bactérias endofíticas, o desempenho de tais funções depende do sucesso no processo de colonização

das plantas hospedeiras e da capacidade destas bactérias em resistir aos diferentes estresses ambientais, tanto durante as etapas de inoculação, quanto durante o cultivo das plantas inoculadas (Gaieiro et al., 2013).

Os principais mecanismos utilizados pelas bactérias para tolerar os estresses ambientais são a formação de biofilme (Gao et al, 2015b), a produção de exopolissacarídeos (Sandhya e Ali, 2015), a diminuição na produção de etileno (Glick, 2014), o acúmulo de osmoprotetores e a produção de antioxidantes (Sandhya et al., 2010). A última estratégia é utilizada em condições de estresse oxidativo, fenômeno químico e fisiológico resultante da superprodução e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs, do inglês Reactive Oxygen Species)(Demidchik, 2014) . EROs são substâncias reativas (O_2 , O_3 , H_2O_2) que causam danos às células (Gill e Tuteja, 2010). Algumas bactérias produzem PQQ como uma molécula antioxidante, fundamental na tolerância ao estresse oxidativo (Misra et al., 2004).

PQQ é conhecido como cofator de diferentes enzimas procariotas (Matsushita et al., 2002; McIntire, 1994). Já foi descrito nas bactérias *Enterobacter intermedium*, *Gluconobacter oxydans*, *Klebsiella pneumoniae* e *M. extorquens* (Toyama et al, 1997), *Pseudomonas fluorescens* (Holscher e Gorisch, 2006; Kim et al., 2003; Meulenber et al., 1992; Schinider et al., 1995) e *G. diazotrophicus* (Intorne et al., 2009). Também têm sido descritos diferentes efeitos de PQQ em processos fisiológicos e bioquímicos de mamíferos (Misra et al., 2012), tendo sido observada em plantas sua função como molécula promotora do crescimento (Choi et al., 2008).

G. diazotrophicus é uma PGPB, gram-negativa, endofítica (Saravanan et al., 2008), que tem alto potencial biotecnológico para fixar nitrogênio atmosférico, produzir auxina e giberelina, solubilizar fosfato e zinco (Madhaiyan et al., 2004; Blanco et al., 2005; Muthukumarasamy et al., 2006; Saravanan et al., 2007; Intorne et al., 2009) e atuar no controle biológico. Estudos de genômica funcional identificaram um gene importante para resistência a metais nesta bactéria (Intorne et al., 2012), sendo descrita ainda sua resistência à seca e a elevadas temperaturas (Tejera et al., 2003).

A biossíntese de PQQ em *G. diazotrophicus* já teve esclarecido seu papel no metabolismo respiratório (Luna & Boiardi, 2007; Luna et al., 2006). Também foi demonstrado que mutantes de *G. diazotrophicus* defectivos para os genes PQQ

não são capazes de solubilizar fosfato e zinco (Intorne et al., 2009). No entanto, ainda não foram desenvolvidos estudos no intuito de identificar o papel desta molécula na tolerância a estresses em *G. diazotrophicus* e na interação planta-bactéria. Neste sentido, o presente trabalho avaliou a importância das vias de biossíntese e transporte de PQQ na tolerância a estresses ambientais em *G. diazotrophicus* e seu papel na promoção do crescimento vegetal, durante a interação com *A. thaliana*.

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. Uso potencial das bactérias promotoras do crescimento vegetal na agricultura

O crescimento populacional, as alterações climáticas, a deterioração e a distribuição desigual dos alimentos bem como o uso intensivo de fertilizantes e defensivos químicos na agricultura são fatores em discussão nos últimos anos. A principal preocupação é como produzir alimentos para um grande contingente de pessoas, de forma sustentável e sem causar mais prejuízos ao meio ambiente (Glick, 2015).

Sabe-se que os fertilizantes químicos usados na agricultura são importantes para o desenvolvimento e crescimento das plantas, resultando em alta produtividade das lavouras, mas desencadeiam diferentes impactos ambientais, contaminando solos e águas, aumentando os custos de produção, além de eventualmente apresentar efeitos tóxicos para a saúde (Ogut et al., 2014; Tawatsin, 2015).

A estimativa de expansão prevista para utilização de fertilizantes químicos industrializados na agricultura mundial é de aproximadamente 1.9% entre os anos 2012 e 2016 (FAO, 2012). Considerável parcela dos compostos encontrados nos fertilizantes e pesticidas agrícolas não é absorvida ou utilizada pelas plantas, ficando retida nos solos, contaminando os lençóis freáticos, sendo dispersada para a atmosfera, poluindo o ar (Yadav et al., 2015). Diante deste cenário, o aumento no uso de tais abordagens não é alternativa interessante para atender à

crecente demanda por alimentos inerente ao aumento da população mundial. Logo, torna-se necessário buscar tecnologias que minimizem os danos causados pelo uso de agroquímicos e, ao mesmo tempo, potencializar a produção sustentável de alimentos.

O uso de micro-organismos benéficos na interação com plantas tem surgido como uma interessante contribuição para uma forma de agricultura econômica e ambientalmente sustentável. Entre os micro-organismos benéficos, as bactérias promotoras do crescimento vegetal têm a capacidade de melhorar o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Essas bactérias vivem em associações com diferentes tecidos e órgãos das plantas, como raízes (Stets et al., 2015), folhas (Mercier e Lindow, 2000), flores (Compant et al., 2011) e até sementes (Ferreira et al., 2008). O maior número de bactérias promotoras do crescimento vegetal é encontrado no rizoplasma próximo às raízes e na rizosfera das plantas. Além desses ambientes, bactérias promotoras do crescimento vegetal, chamadas de endofíticas, colonizam os tecidos internos das plantas (Hallmann et al., 1997).

Bactérias endofíticas já foram isoladas de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Em diversas culturas de interesse agrícola, como cana-de-açúcar (Cavalcante & Dobereiner, 1988), videira (López-Fernández et al., 2015), milho, tomate, melão, pimenta (Xia et al., 2015), sorgo (Mareque et al., 2014), banana (Sekhar e Thomas 2015), arroz (Chung et al., 2015), batata (Rado et al., 2015), trigo (Robinson et al., 2015), feijão (Lopes et al., 2015), entre outras.

As bactérias promotoras do crescimento vegetal melhoram as características das plantas de diversas formas, seja atuando no controle biológico de diversas doenças (Ryan et al., 2008), na produção de fitormônios como auxina, giberelina e citocinina (Kurepin et al., 2014; Ahmad et al., 2008), na fixação biológica de nitrogênio (Kandel et al., 2015), na solubilização de fosfato (Oteino et al., 2015) e na produção de sideróforos (Ma et al., 2015). Elas também podem promover indução de resistência sistêmica adquirida (Chung et al., 2015).

Outra característica das bactérias promotoras do crescimento que tem despertado interesse dos pesquisadores é a capacidade de degradar poluentes em áreas contaminadas por metais pesados. Este tipo de poluição tem causado perdas em terras férteis, sendo também uma grave ameaça para a saúde e o bem-estar da população humana (Francis et al., 2010; Guo et al., 2010).

A supressão de doenças de plantas através do biocontrole disparado por micro-organismos benéficos é uma das melhores alternativas para reduzir o uso de agroquímicos na agricultura (Compant et al., 2005). Os mecanismos envolvidos no biocontrole desempenhado por bactérias promotoras do crescimento vegetal ainda são pouco elucidados, porém seu efeito nas plantas é relatado em vários trabalhos (Maldonado-González et al., 2015; Sunar et al., 2015; Malfanova et al., 2011). Bactérias atuam no controle biológico pela produção de antibióticos e de diferentes metabólitos, que têm ampla atividade contra patógenos (Raaijmakers e Mazzola, 2012).

A fixação biológica do nitrogênio é um dos mais bem estudados mecanismos de promoção do crescimento nas PGPB. O nitrogênio é um dos principais nutrientes para o crescimento e desenvolvimento vegetal. Embora abundante no ar, tal elemento não se encontra em forma assimilável pelas plantas. O fornecimento de nitrogênio através de adubação química propicia importante aumento no rendimento das culturas. Contudo, a utilização de fertilizantes nitrogenados representa importantes custos econômicos e ambientais para a produção agrícola (Ferguson et al., 2010). Diante disso, a fixação biológica de nitrogênio, processo em que ocorre redução do nitrogênio atmosférico a amônia, feita por micro-organismos, é uma alternativa de baixo custo, ambientalmente correta (Bruijn, 2015).

A capacidade de plantas leguminosas interagirem simbioticamente com rizóbios fixadores de nitrogênio confere uma grande vantagem sobre outras plantas, sendo um excelente exemplo de sistema agrícola sustentável altamente eficiente (Ferguson et al., 2010). As bactérias promotoras do crescimento vegetal, como os rizóbios, são capazes de colonizar raízes e se associar simbioticamente a várias plantas hospedeiras, atuando no processo de fixação biológica do nitrogênio (Franche et al., 2008). Tais bactérias fixadoras de nitrogênio são chamadas de diazotróficas (Döbereiner, 1992).

Bactérias diazotróficas têm sido identificadas em diferentes gêneros de α e β -proteobactérias, incluindo *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Gluconobacter* e *Pseudomonas*. Entre essas, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconobacter* são classificadas como endofíticas (Baldaniet al., 1986; Cojhoet al., 1993; Richardson et al., 2009; Schmid e Hartman, 2007; Stasovski e Peterson, 1993).

Bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Azoarcus* e *Herbaspirillum* interagem com uma variedade de plantas, de forma associativa ou através de relações endofíticas. Em todas estas associações, as plantas recebem o nitrogênio fornecido pelas bactérias e, em troca, recebem das plantas hospedeiras os nutrientes de que necessita. Além disso, a colonização endofítica pode fornecer condições adequadas para proteger o complexo nitrogenase de micro-organismos fixadores de nitrogênio da prejudicial exposição ao oxigênio (Santi et al., 2013).

Sabe-se que muitas bactérias são capazes de solubilizar nutrientes como fósforo, zinco e ferro, tornando-os disponíveis para as plantas e, conseqüentemente, melhorando seu desenvolvimento (Panhwar et al., 2012). Fósforo (P) é considerado o terceiro principal composto limitante para o crescimento vegetal, e sua concentração nos solos agriculturáveis normalmente varia entre 400 e 1200 mg.kg⁻¹. Contudo, apenas 1 mg.kg⁻¹ está geralmente presente em formas disponíveis, tais como HPO₄⁻ e H₂PO₄⁻² (Rodríguez e Fraga, 1999). As bactérias utilizam diferentes estratégias para disponibilizar os nutrientes para as plantas. Para solubilizar P inorgânico, as bactérias sintetizam ácidos orgânicos, como ácido glucônico e nítrico, os quais quelam o composto insolúvel e abaixam o pH, disponibilizando assim o P para as plantas. Outro mecanismo é simplesmente liberar prótons, reduzindo o pH e aumentando a solubilidade sem a ajuda de quelatos (Khan et al., 2009).

A capacidade de solubilizar P é comum em bactérias rizosféricas (Richardson, 2001), sendo que muitas dessas bactérias já foram isoladas, incluindo as dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, e *Erwinia* (Gamalero & Glick, 2011). Em *G. diazotrophicus*, a capacidade de solubilizar fósforo e zinco está vinculada à produção de ácido glucônico (Intorne et al., 2009).

Assim como o P, o ferro encontra-se em concentrações abundantes na maioria dos solos, porém em formas insolúveis de FeO₃, como hematita e ferridrita (Masalha et al., 2000). Algumas bactérias têm a capacidade de produzir sideróforos, estruturas que sequestram o ferro, tornando-o disponível. *Pseudomonas sp.* aumentou a absorção de ferro em feijão, reduzindo a clorose das plantas pela produção de sideróforos (Sharma et al., 2003). Já os sideróforos

produzidos por *Pseudomonas fluorescens* foram facilmente absorvidos por *A. thaliana* (Vansuyt et al., 2007).

Outra característica das PGPB que resulta no crescimento vegetal é a produção de hormônios. As plantas produzem diferentes hormônios que regulam várias funções relacionadas ao crescimento, metabolismo e reprodução dos tecidos. Contudo, diversas espécies bacterianas são capazes de produzir hormônios capazes de influenciar o desenvolvimento vegetal. Muitos estudos já foram desenvolvidos mostrando os benefícios diretos de PGPB na promoção do crescimento através da produção de reguladores de crescimento (Esitken et al., 2003; Orhan et al., 2006; Cakmakci et al., 2007; Günes et al., 2014; Karakurt et al., 2011; Turan et al., 2008). A capacidade de produzir AIA e o efeito deste composto sobre as plantas têm sido mostrados por diversos trabalhos, destacando o papel deste processo na promoção do crescimento vegetal, decorrente da associação bactéria-planta (Egamberdieva et al., 2015; Hussein e Joo, 2015; Patten e Glick, 2002).

As vias de biossíntese de ABA por bactérias são desconhecidas, mas sua produção foi relatada em algumas espécies de PGPB como *Azospirillum brasilense* e *Bacillus japonicum*. A produção de ABA inibe a biossíntese de citocinina, assim a produção de ABA por bactérias interfere nos níveis de citocinina da planta hospedeira. Sob condições de estresse, a produção desse hormônio por bactérias mantém a quantidade de ABA da planta, amenizando assim os efeitos negativos do estresse (Spaepen, 2015).

O etileno, um hormônio gasoso conhecido como “hormônio do crescimento”, tem principal ação no desenvolvimento vegetal sob condições de estresse e durante a resposta a fitopatógenos. Sua produção tem sido relatada em várias bactérias promotoras do crescimento vegetal (Dugardeyn et al., 2008), porém seu papel durante tal associação ainda não está claramente determinado.

O hormônio citocinina, também produzido por várias espécies de bactérias associadas a plantas, pode funcionar como um sinal químico para a comunicação bactéria-planta ou ainda como uma estratégia que ajuda no processo de invasão da planta hospedeira (Castillo et al., 2015). A produção de citocinina por *Azospirillum sp.* foi demonstrada usando diferentes meios de cultura, com diferentes fontes de carbono (Strzelczyk et al., 1994).

Portanto, o entendimento dos mecanismos desenvolvidos pelas bactérias que resultam na promoção do crescimento vegetal e a identificação de genes que controlam essas características são fundamentais, uma vez que essas informações poderão auxiliar na busca de estratégias para uma agricultura sustentável e na conservação dos recursos naturais.

3.1.2.2. Pirroloquinolina-quinona (PQQ) e seu papel nos processos biológicos

Pirroloquinolina-quinona (4,5-dihidroxi-4, 5- dioxi-1H-pirrolo-[2,3-f]-quinolina-2,7, 9- ácido tricarboxílico), é uma quinona aromática ortho-tricíclica que serve como cofator redox para diferentes desidrogenases bacterianas. É solúvel em água, estável ao calor, tendo capacidade de realizar ciclos redox (Stites et al.,2000). É uma molécula que tem efeitos em processos fisiológicos e bioquímicos, promove benefícios na tolerância a estresses oxidativos (Misra et al., 2012) e, mais recentemente, foi descrita sua função como promotora de crescimento vegetal (Choi et al., 2008).

PQQ foi descrito pela primeira vez como cofator redox de enzimas desidrogenases em bactérias (Salisbury et al., 1979; Westerling et al., 1979). Acredita-se que a maior fonte de PQQ sejam os micro-organismos (Urakami et al., 1992). Em bactérias, esta molécula é cofator de diversas enzimas, como metanol desidrogenases, glicose desidrogenases, álcool desidrogenases, as quais recebem o nome de quinoproteínas (Xiong et al., 2011). Além dessas enzimas, tem sido descrito que enzimas como amino-oxidase desidrogenases requerem PQQ como cofator (McIntire, 1994).

A molécula PQQ tem sido identificada em diferentes alimentos (Kumazawa et al., 1995; Mitchell et al., 1999; Noji et al., 2007) e já foi descrita em mamíferos como uma vitamina do complexo B(Kasahara e Kato, 2003), embora esta descrição ainda seja questionada (Rucker et al., 2005). Além disso, em mamíferos, PQQ regula o crescimento e a diferenciação celular, protege as células contra danos oxidativos e atua em mecanismos de transdução de sinais em vários processos biológicos (Misra et al., 2012; Rucker e Chowanadisai, 2009).

Em bactérias, além de atuar como cofator de enzimas, PQQ tem função antioxidante, atuando também na tolerância a estresses ambientais. Na bactéria

Escherichia coli, PQQ aumentou a tolerância ao estresse oxidativo causado por 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)(Pandey et al., 2015). Ensaios in vitro mostraram que PQQ produz adutos químicos inertes em ligação com espécies reativas de oxigênio (Misra et al., 2004). O papel de PQQ como protetor contra danos oxidativos foi demonstrado na bactéria *Deinococcus radiodurans*, que apresentou resistência às radiações UY e γ , tal resistência se devendo à proteção contra EROs e pela ação de enzimas reguladas por PQQ, que são responsáveis pelo reparo em eventuais quebras no DNA (Rajpurohit et al., 2010).

Uma forma interessante de avaliar as funções gênicas é através do estudo de mutantes defectivos. Estudo avaliando mutantes de *E. intermedium* defectivos para produção de PQQ mostrou que eles perderam a capacidade de inibir o crescimento do fungo patogênico *Magnaporthe grisea*, responsável pela brusone do arroz, o que sugere a ação de PQQ na produção de antifúngicos, além revelar o papel de PQQ na indução de resistência sistêmica em plantas de tabaco (Han et al., 2008). A característica de biocontrole do PQQ foi testada em ensaios em que a expressão do seu operon restaurou a atividade de biocontrole em *R. aquatilis*, um agente de biocontrole para galhas causadas por *Agrobacterium vitis* em uva (Guo et al., 2009).

O processo de biossíntese de PQQ em bactérias ainda não está totalmente elucidado. A maioria das bactérias que sintetizam PQQ têm entre 4 e 7 genes (*pqqABCDEF/G*), que estão organizados em operon. Esse processo já foi estudado em *Acinetobacter calcoaceticus* (Goosen et al., 1989), *Enterobacter intermedium* 60-2G (Kim et al., 2003), *Gluconobacter oxydans* (Hölscher e Görisch, 2006), *Klebsiella pneumoniae* (Meulenber et al., 1992), *Methylbacterium extorquens* (Toyama, Chistoserdova e Lidstrom, 1997) e *Pseudomonas fluorescens* CHA0 (Schnider et al., 1995). Contudo, muitas perguntas sobre as vias de produção e transporte de PQQ ainda necessitam ser respondidas.

Sabe-se que a proteína PQQA atua na síntese de S-adenosil methionina a partir dos aminoácidos tirosina e glutamato. O gene *pqqA* é relativamente conservado, variando apenas seu tamanho, dependendo da espécie. Evidências indicam que *pqqB* não age diretamente na biossíntese da molécula PQQ, sendo responsável pelo transporte do PQQ sintetizado da membrana plasmática para o periplasma, onde se encontra a enzima desidrogenase. O gene *pqqC* participa da etapa final da biossíntese de PQQ, fazendo a conversão do precursor AHQQ em

PQQ. A função do gene *pqqD* permanece indefinida, mas, recentemente, foi mostrada interação física entre a proteína PQQD e PQQE. O *pqqE* é um radical funcional S-adenosil metionina (SAM), enzima capaz de catalisar a redução de SAM a metionina e 5-desoxiadenosina, atuando na primeira etapa da via. O *pqqF* é uma peptidase não essencial à produção de PQQ (Puehringer et al., 2008; Shen et al., 2012).

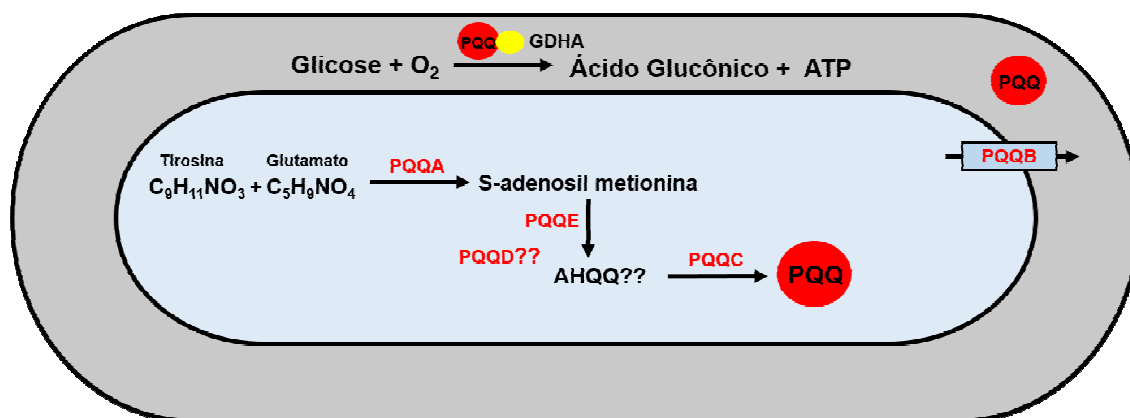


Figura 1 -Modelo proposto da via de biossíntese de PQQ em *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Inicialmente, um precursor glutamato ou tirosina é convertido a S-adenosil-metionina (SAM) pela ação da proteína PQQA. Então, PQQE sintetase transforma SAM em uma forma intermediária de PQQ, chamada de 3a-(2-amino-carboxietil)-4,5-dioxo-4,5,6,7,8,9-hexahidroquinolina-7,9-ácido dicarboxílico (AHQQ), já descrita em outros organismos. Em seguida, PQQC catalisa a última etapa da via de biossíntese da molécula PQQ. A proteína PQQB deve atuar como transportadora de PQQ do citoplasma para o periplasma, onde PQQ vai atuar como cofator da enzima glicose desidrogenase (GDHA). Esse processo respiratório acontece na região periplasmática, sob altas tensões de oxigênio (pO_2), enquanto, no citoplasma, as tensões de O_2 são baixas, permitindo o perfeito funcionamento da nitrogenase, que vai promover a fixação biológica de nitrogênio. Ainda não foi elucidado o papel de PQQD na via de biossíntese de PQQ. PQQ: pirroloquinolina quinona

PQQ atua como molécula promotora do crescimento vegetal. Tal fenômeno resulta de sua atividade antioxidante, da sua participação no processo de solubilização de fosfato, na produção de substâncias antimicrobianas e na atuação no controle de patógenos. Choi et al. (2008) mostraram que PQQ promoveu o crescimento de plantas de pepino e a eficiência de PQQ na

eliminação de H₂O₂ em suas folhas, confirmando seu potencial como molécula antioxidante. Ahmed e Shahad (2010) mostraram que plantas de feijão inoculadas com cepas bacterianas mutadas nos genes da via de síntese de PQQ apresentaram um decréscimo de 22-25% na promoção de crescimento quando comparadas com plantas inoculadas com a cepa selvagem.

3.1.2.3. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Diferentes gêneros de bactérias já foram descritos como endofíticos de gramíneas. Entre as bactérias endofíticas isoladas da cana-de-açúcar, destacam-se *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Cavalcante e Dobereiner, 1988), *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Baldani et al., 1997).

G. diazotrophicus pertence ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rhodospirillales, família Acetobacteraceae, gênero *Gluconacetobacter* (Kerstens et al., 2006). É uma bactéria gram-negativa, aeróbica obrigatória, em forma de bacilos curtos com extremidades arredondadas, tendo sido isolada pela primeira vez de cana-de-açúcar. É uma bactéria ácido-tolerante (Cavalcante e Dobereiner, 1988), sensível a condições de seca, apresentando alta tolerância a tratamentos de calor e a elevadas concentrações de sais em meio de cultura (Tejera et al., 2003). A temperatura ideal de crescimento e fixação de N₂ é 30°C, crescendo bem em altas concentrações de sacarose (30%) (Cavalcante e Dobereiner, 1988).

A associação com *G. diazotrophicus* já foi observada em plantas de café (Jimenez-Salgado et al., 1997), abacaxi (Baldani e Baldani, 2005), arroz (Muthukumarasamy et al., 2005), trigo e sorgo (Luna et al., 2010), entre outras. As principais portas de entrada dessa bactéria nas plantas são: ponta de raízes, células da coifa e meristema, zonas de emergência de raízes laterais, pelos radiculares e estômatos (James et al., 2001; Luna et al., 2010; Rouws et al., 2010). Essa bactéria é encontrada naturalmente em muitas plantas, porém estudos mostram eficiência de colonização quando inoculadas em plantas não hospedeiras naturais como milho (Cocking et al., 2006; Riggs et al., 2001), tomate, feijão, *Arabidopsis* (Cocking et al., 2006) e trigo (Luna et al., 2010; Youssef et al., 2004).

A promoção do crescimento por *G. diazotrophicus* resulta das diferentes características que essa bactéria apresenta. Ela é umas das principais bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico em canaviais (Dobereiner et al., 1995; Dong et al., 1994). Isso acontece principalmente por ser uma bactéria que habita o interior de tecidos vegetais, local onde há baixas tensões de oxigênio, favorecendo a atividade da enzima nitrogenase (Riggs et al., 2001). Além disso, *G. diazotrophicus* produz hormônios promotores do crescimento vegetal (Bastián et al., 1998), como o ácido indol acético (AIA) e giberelinas (Fuentes-Ramirez et al., 1993), ela solubiliza nutrientes como fósforo e zinco (Intorne et al., 2009; Saravanan et al., 2007), produz sideróforo (Logeshwaran et al., 2009), além de atuar no biocontrole de fitopatógenos pela produção de bacteriocina (Blanco et al., 2005).

Uma característica de grande destaque de *G. diazotrophicus* é sua tolerância a estresses ambientais. A capacidade de essa bactéria crescer em meios de cultura com até 30% de sacarose (Stephan et al., 1991) sugere sua alta tolerância a estresse osmótico. Além disso, essa bactéria tem elevada resistência a metais pesados (Intorne et al., 2012), justificando futuras análises de seu papel na proteção de plantas cultivadas em ambientes contaminados.

Após o sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus* (Bertalan, et al., 2009), diferentes estudos de genômica funcional têm sido conduzidos para caracterizar a relevância de cada uma das vias supracitadas para a promoção do crescimento vegetal. Lee et al. (2004) analisaram um banco de mutantes desta bactéria para síntese de AIA e identificaram três mutantes candidatos afetados na produção deste hormônio. Intorne et al. (2009) avaliaram a capacidade de solubilização de zinco e fósforo em mutantes *G. diazotrophicus* PAI5 e identificaram que mutações que afetam a produção de ácido glucônico prejudicam a capacidade de solubilização, sugerindo ainda que a solubilização de zinco e fósforo possa estar associada ao mesmo conjunto de genes. Ao sequenciar esses mutantes, verificou-se que os genes mutados são da via de transporte e biossíntese da molécula PQQ (*pqqB*, *pqqC* e *pqqE*), um cofator de enzimas desidrogenases. Nesta bactéria, PQQ é cofator essencial da enzima glicose desidrogenase (GDH), responsável pela conversão de glicose a ácido glucônico.

Intorne et al. (2012) avaliaram a resistência aos metais zinco, cobalto e fósforo e identificaram um mutante defectivo para a tolerância. A identificação do

gene mutado revelou que a proteína CZC é um fator determinante na resistência a metal em *G. diazotrophicus*. Outro trabalho, utilizando mutantes defectivos no gene que codifica levanasucrase, mostrou o papel dessa molécula na osmoadação, já que o composto levana formado pela ação dessa enzima atua como protetor, sendo utilizado também como substrato para a formação de biofilme, auxiliando na proteção da bactéria contra agentes estressantes (Velazquez-Hernandez et al., 2011).

3.1.2.4. Tolerância a estresses em bactérias promotoras do crescimento vegetal

As PGPBs utilizam diferentes estratégias para se associar, colonizar e promover o crescimento em suas plantas hospedeiras. Ao longo do processo evolutivo, tais bactérias desenvolveram artifícios contra as condições adversas dos ambientes que seus hospedeiros habitam. Entre estes mecanismos, a formação de biofilme é uma estratégia usada pelas bactérias como forma de sobrevivência sob condições adversas (Sandhya et al., 2009; Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

Quando estão sob estresse, PGPB reduzem a produção de etileno, produzem EPS, melhoram a atividade das enzimas antioxidantes e suprimem o crescimento de organismos patogênicos (Dodd et al., 2009; Glick et al., 2007; Nadeem et al., 2010; Sandhya et al., 2009). Além disso, estudos mostram que, pela hidrólise de aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), rizobactérias conseguem atenuar o efeito causado por estresse salino em plantas, diminuindo a produção de etileno e melhorando seu desenvolvimento (Nadeem et al., 2009; Shaharoon et al., 2006).

Estresses ambientais como seca, salinidade, variação de temperatura e metais pesados alteram o balanço osmótico das células, podendo causar perda da turgescência celular. Tal fato, além da desorganização das membranas, pode causar desnaturação ou perda de atividades de proteínas, desencadeando acúmulo de EROs e, conseqüentemente, provocando danos oxidativos às células (Munns e Tester, 2008). Assim, a adaptação de PGPB a condições de estresse osmótico é uma característica importante que deve ser explorada, já que a perda de água e o acúmulo de solutos no ambiente causados pelo estresse afetam importantes funções da bactéria durante o processo de promoção do crescimento.

As bactérias têm basicamente duas maneiras de sobreviver sob condições de estresse osmótico. Uma delas é a manutenção do equilíbrio das concentrações de sais intra e extracelular ou ainda a utilização de solutos orgânicos compatíveis, que auxiliam na manutenção das baixas concentrações de sais no citoplasma (Mustakhimov et al., 2010).

Os solutos compatíveis atuam como osmoprotetores, que conferem tolerância a estresses em procariotos (Zaprasis et al., 2015) e eucariotos (Singh et al., 2015). Em *G. diazotrophicus*, o osmoprotetor glicina betaína suprimiu os efeitos causados por até 100mM de NaCl. Contudo, maior concentração desse agente estressante desencadeou mudanças na morfologia das células e inibição do crescimento (Boniolo et al., 2009). Essa mesma bactéria é descrita como tolerante a altas concentrações de sacarose e metais pesados, sugerindo que ela pode ser utilizada como fonte de genes de tolerância a tais estresses.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e a remoção de EROs (Noctor et al., 2014). Diferentes estresses ambientais provocam alta produção de EROs, causando dano oxidativo à célula, podendo levar à morte (Milisav et al., 2012; Sharma et al., 2012). Um dos mecanismos em *G. diazotrophicus* de combate ao estresse oxidativo causado pelo metabolismo aeróbico, durante a fixação de nitrogênio, ocorre pela expressão de genes responsáveis pela produção de enzimas antioxidantes (Alquéres et al., 2010). As bactérias são capazes de auxiliar as plantas na defesa contra estresses ambientais (Barka et al., 2006; Sziderics et al., 2007). No entanto, mecanismos moleculares envolvidos nas respostas de plantas a condições de estresse, quando associados a bactérias, ainda necessitam ser mais bem caracterizados.

Estudo conduzido com *A. thaliana*, previamente inoculada com *Paenibacillus polymyxa*, exposta a condições de seca ou infectadas com o patógeno *Erwinia carotovora*, sugeriu que os genes da planta envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos podem ser corregulados (Timmusk & Wagner, 1999). Sementes de alface inoculadas com *Azospirillum brasiliense*, expostas a NaCl, apresentaram melhor taxa de germinação e crescimento em relação a plantas não inoculadas (Barassi et al., 2006).

As PGPB também atuam na tolerância à contaminação por metais pesados. O ferro é um elemento essencial às plantas, porém, quando absorvido em altas quantidades, causa estresse oxidativo, que, assim como outros metais,

causa modificações nas enzimas que atuam na desintoxicação causada por EROs (Dimkpa et al., 2009; Sinha & Saxena, 2006; Stobrawa & Lorenc-Plucińska, 2007). No entanto, os sideróforos produzidos pelas bactérias são capazes de suavizar o estresse oxidativo em plantas, visto atuarem como quelantes e reduzirem as concentrações de metais tóxicos na zona da raiz, exercendo o papel de bioprotetor, diminuindo a formação de radicais livres (Dimkpa et al., 2009).

3.1.2.5. *Arabidopsis thaliana*: modelo para estudos de interação planta-bactéria

O estudo da interação entre plantas e bactérias tem sido realizado em diferentes espécies vegetais. Contudo, encontrar um modelo que permita o estudo dos processos envolvidos nesta interação de maneira mais rápida e fácil tem sido o desafio de muitos pesquisadores. Devido a isso, *A. thaliana* surge como alternativa de modelo, uma vez que estudos de esclarecimento de aspectos fundamentais envolvidos com desenvolvimento vegetal, como crescimento de raízes, ação hormonal e vias de sinalização em resposta a condições ambientais (Meinke et al., 1998), já foram realizados com esta espécie.

A. thaliana não é uma planta economicamente importante, mas oferece vantagens para a pesquisa básica em genética e biologia molecular. É um membro da família da mostarda (Cruciferae ou Brassicaceae), com ampla distribuição natural em toda Europa, Ásia e América do Norte (Meinke et al., 1998). Tem ciclo de vida curto, uma importante vantagem em relação a outras culturas. A sequência de processos envolvendo germinação, formação da roseta, florescimento e maturação das primeiras sementes se completa em seis semanas. As plantas maduras atingem entre 15 e 20 cm de altura e produzem centenas de silíquas com mais de 5000 sementes. As sementes têm cerca de 0,5 mm de comprimento e suas flores, cerca de 2 mm (Koorneef & Meinke, 2010). Diferentes ecótipos estão disponíveis para análise experimental, entre eles, o ecótipo Columbia (COL-0) é um dos mais utilizados para estudos genéticos e moleculares, pois seu genoma já está sequenciado (Nishimura & Dangl, 2010). O genoma de *A. thaliana* contém 120 Mb e está organizado em cinco cromossomos, contendo aproximadamente 22.000 genes (Meinke et al., 1998).

Estudos realizados no intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos na interação entre moléculas associadas a micro-organismos e seus receptores

presentes na superfície celular têm utilizado *A. thaliana* como modelo para estudo da resposta imune vegetal (Feng et al., 2012). Pesquisas com *A. thaliana* têm permitido interessantes descobertas relacionadas com vários aspectos da biologia vegetal. Em alguns casos, questionamentos em fisiologia e bioquímica de plantas foram primeiramente respondidos pelas análises moleculares em plantas mutantes para genes envolvidos nas vias em estudo. Similarmente, esta espécie tem sido utilizada em estudos que têm como objetivo entender quais genes bacterianos estão envolvidos na interação com plantas e quais os efeitos desta relação nos aspectos químicos e fisiológicos de ambos os organismos (Mitchell et al., 2015; Zamioudis et al., 2015).

O uso de *A. thaliana* em estudos de colonização por bactérias promotoras do crescimento vegetal já foi reportado em alguns trabalhos (Cohen et al., 2015; Dietel et al., 2013; Maldonado-González., 2015; Xie et al., 2009). As principais características atrativas desta espécie para estudos desta natureza são a facilidade de observação, o estudo do sistema radicular em meios de cultivo vegetal e a possibilidade de utilizar promotores de genes candidatos, fundidos ao gene repórter GUS, para analisar sua expressão em decorrência do processo de interação com a bactéria (Costacurta et al., 1994). Assim, em decorrência dos avanços nos estudos de genômica funcional e da disponibilidade de um vasto número de mutantes de *A. thaliana*, tem sido possível a realização de diversos estudos de interação planta micro-organismo.

Ortíz-Castro et al.(2008) mostraram que uma variedade de N-acyl-homoserina lactona (AHL) produzida por bactérias afeta o crescimento da raiz primária, a formação de raízes laterais e o desenvolvimento de plantas de *A. thaliana*. Além disso, estas moléculas podem aumentar a resistência a estresses bióticos e abióticos, regulando o crescimento e o desenvolvimento desta espécie. Na interação entre *A. thaliana* e *Pseudomonas syringae*, foi verificada exsudação de ácido málico na rizosfera depois da infecção. Sabe-se que o ácido málico atrai bactérias benéficas como *Bacillus subtilis*, que, então, colonizam a rizosfera da planta, formando biofilmes, protegendo as raízes contra a agressão de fitopatógenos (Rudrappa et al., 2008). Este achado mostra que até mesmo a interação entre planta e patógeno pode favorecer de alguma maneira uma posterior interação com micro-organismos benéficos. Estudo caracterizando a interação entre *A. thaliana* e *Bacillus subtilis* (GB03) mostrou que os compostos

voláteis produzidos por esta bactéria aumentaram o crescimento vegetal, mensurado pelo aumento no peso fresco e seco da parte aérea e pelo aumento no número de rosetas, além de parâmetros fisiológicos, como aumento no conteúdo total de clorofila e maior eficiência do fotossistema II (PSII)(Xie et al., 2009).

3.1.2.6. *Arabidopsis thaliana* como modelo para estudo da associação entre plantas e *G. diazotrophicus*

A bactéria *G. diazotrophicus* foi isolada pela primeira vez em plantas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Dobereiner, 1988). Contudo, a utilização desta planta como modelo para estudos da interação não é ideal, uma vez que ela tem ciclo de vida longo e alto porte, dificultando seu crescimento em ambiente controlado. Além disso, tem genoma octaploide e complexo, o que limita a obtenção de mutantes e plantas transgênicas, ferramentas importantes em estudos de interação.

Recentemente, foi constatada promoção do crescimento por *G. diazotrophicus* em plantas de *A. thaliana*. A inoculação com esta bactéria promoveu aumento de 22.6% na massa fresca da parte aérea e aumento nas taxas fotossintéticas vegetais (Rangel de Souza et al., 2015). O uso deste modelo de estudo de interação é interessante, tendo em vista as vantagens já supracitadas para esta planta, que abrem perspectivas de estudos dos mecanismos moleculares envolvidos durante a interação não só com *G. diazotrophicus*, mas também com outras bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Nossa equipe gerou uma biblioteca de mutantes de inserção de *G. diazotrophicus* que já permitiu a identificação de genes envolvidos na solubilização de zinco e fósforo (Intorne et al., 2009) e também na resistência a metais como cádmio, cobalto e zinco (Intorne et al., 2012). A utilização desta biblioteca de mutantes possibilita a identificação de genes importantes para a interação entre *G. diazotrophicus* e *A. thaliana*, vislumbrando elucidar mecanismos moleculares que participam do estabelecimento dessa associação.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Micro-organismos e condições de cultivo

A estirpe selvagem *G. diazotrophicus* PAL5, da Coleção de Culturas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil), foi gentilmente cedida pelo Dr. Fábio L. Olivares, do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBTC/UENF). Os mutantes de *G. diazotrophicus*, defectivos para os genes \blacktriangle *gdhA* e \blacktriangle *pqqB*, \blacktriangle *pqqC* e \blacktriangle *pqqE*, foram obtidos por Intorne et al. (2009), através de mutagênese insercional, utilizando o kit EZ-Tn5 <R6K_{Yori}/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre, Madison, WI, USA). Os genes interrompidos pelo transposon nos mutantes foram identificados pelo sequenciamento das regiões flangeadoras do sítio de inserção do transposon.

As bactérias 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; 3,75 ácido glutâmico; 5 mL azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH. Meio sólido: 15,0 ágar (Rodrigues Neto et al., 1986) e LGI modificado (composição em g.L⁻¹: glicose 10, K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄.7H₂O 0,2; (NH₄)₂SO₄ 1,32; CaCl₂.2H₂O 0,02; NaMoO₄.2H₂O 0,002 e FeCl₃.6H₂O 0,018) e LGI-P (composição em g.L⁻¹: sacarose 100,0; K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄.7H₂O 0,2; CaCl₂.2H₂O 0,2; Na₂MoO₄.H₂O 0,002; FeCl₃.6H₂O 0,01, 5 mL azul de bromotimol 0.5% em KOH 0,2 M; 15 ágar (Cavalcante & Dobereiner, 1988). Ágar (1,6 g.L⁻¹ para meio semissólido e 15 g.L⁻¹ para meio sólido) foi adicionado ao meio de cultura quando necessário. As células foram cultivadas sob constante agitação e temperatura (250 min⁻¹ e 30°C) em agitador-incubador orbital (C25 Incubator, marca New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA) e em placas de Petri, sendo incubadas em estufa bacteriológica, marca Heraeus, a 30 °C.

Para o preparo de culturas estoque, uma colônia isolada de cada estirpe bacteriana foi inoculada em meio DYGS modificado (Rodrigues Neto et al., 1986) e cultivada até atingir densidade óptica (DO_{600nm}) igual a 1,0. A densidade óptica foi determinada pela utilização de um espectrofotômetro marca UV 1800 Shimadzu. Um volume de 750 µL desta cultura foi transferido para tubos tipo

Eppendorf de 1,5 mL aos quais foram adicionados 250 μ L de glicerol 50%. As culturas estoque foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

3.1.3.2. Curvas de crescimento

Para conhecer as fases de crescimento de cada bactéria, foram obtidas curvas de crescimento. Para isto, pré-inóculos foram preparados, adicionando-se 7,5 mL de LGI_m com 750ul das respectivas culturas estoque em tubos Falcon de 50 mL. As células foram cultivadas até atingir a DO_{600nm} de 1,0.

Para o preparo do inóculo, 5 mL do pré-inóculo de cada estirpe bacteriana foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 45 mL de LGI_m líquido e cobertos com mantas de algodão envoltas por gaze. O crescimento das culturas foi acompanhado, retirando-se alíquotas para determinação da DO_{600nm} a cada 2 h nas primeiras 12 h e depois a cada 3 h, até completar 36 horas de cultivo. Após a análise das curvas, foi identificada a DO₆₀₀ ideal referente à fase exponencial de crescimento de cada estirpe bacteriana, utilizada como valor de referência nos ensaios posteriores. Essa DO_{600nm} adotada como ideal para cada bactéria foi correspondente ao meio da fase exponencial, porque neste ponto a cultura está metabolicamente mais ativa.

3.1.3.3. Determinação das concentrações inibitórias para *G. diazotrophicus* dos agentes estressantes

As curvas de inibição do crescimento de *G. diazotrophicus* selvagem foram feitas em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 5 mL de meio LGI_m cada. Foram utilizadas quatro concentrações de cada agente estressante (Tabela 1).

Os solutos Na₂SO₄, sacarose e peg 400 foram preparados com o dobro da concentração final desejada, tendo sido estes estresses e NaCl esterilizados por meio de autoclavagem. Os metais e o paraquat foram esterilizados por filtração.

Foi definido que a concentração inibitória de cada agente estressante seria aquela que reduzisse o crescimento bacteriano em 20-30% em relação àquele obtido na sua ausência. Após avaliar os resultados para a bactéria selvagem, o experimento foi realizado com os mutantes, utilizando apenas a

concentração inibitória definida nas mesmas condições de crescimento descritas acima.

Tabela 1: Concentrações dos agentes estressantes usados nos ensaios de determinação de concentração mínima inibitória.

Agente estressante	Concentrações
Zinco (ZnCl₂)	0,7 mM; 0,8 mM; 0,9 mM ;1,0 mM
Cádmio (CdCl₂.H₂O)	0.07 mM; 0.08 mM; 0.09 mM; 1.0mM
Cobalto (CoCl₂.6H₂O)	1.0 mM; 1.2 mM; 1.6mM; 2.0mM
Paraquat (C₁₂H₁₄Cl₂N₂)	40 µM; 60uM; 70uM; 100uM
Cloreto de sódio (NaCl)	16 mM; 30 mM; 30 mM; 40 mM
Sulfato de sódio (Na₂SO₄)	140 mM; 150 mM; 160 mM; 170 mM
PEG-400	180 mM; 190 mM; 200 mM; 210 mM
Sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁)	700 mM; 730 mM; 750 mM; 800 mM

No intuito de verificar o efeito de PQQ sintético no crescimento da bactéria selvagem e dos mutantes sob estresse por cobalto e paraquat, foi realizado outro experimento. Nesta situação, o ensaio foi realizado em meio líquido nas mesmas condições anteriores, adicionando-se PQQ sintético.

Cada tratamento foi representado por cinco repetições, tendo sido feitos, pelo menos, três ensaios independentes.

3.1.3.4. Tolerância a diferentes temperaturas e a peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Neste ensaio, o inóculo foi cultivado como descrito no tópico anterior. Em seguida, após atingir a DO ideal, foram feitas gotas de 10 µL das bactérias em meio de cultura LGI_m para avaliar a resistência das estirpes a diferentes temperaturas. Então, as placas de Petri foram incubadas em estufa a 25°C, 30°C e 35 °C durante 5 dias e, em função do crescimento bacteriano, foi avaliada a sensibilidade e/ou resistência das estirpes às variadas temperaturas.

Para verificar o efeito de H₂O₂ sobre o crescimento das bactérias, foi realizado o procedimento de disco de difusão em ágar. Após o cultivo já descrito, 100 µL de cada inóculo foram plaqueados em meio DYGS com o auxílio de uma

alça de Drigalski. Feito isso, um disco de papel estéril embebido com 10 μL de solução de H_2O_2 10 mM foi disposto no centro de cada placa de Petri. Passados três dias em estufa, o diâmetro do halo de inibição foi mensurado.

Em ambos os estresses, cada tratamento continha 3 repetições, tendo sido feitos três ensaios independentes.

3.1.3.5. Ensaio de fixação biológica de nitrogênio

Para verificar possíveis alterações na capacidade dos mutantes de fixar nitrogênio, foi feito o cultivo em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo meio LGI_m, até as estirpes atingiram suas $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ideais. Foram feitas três lavagens das culturas bacterianas utilizando solução salina 0.85%. Em seguida, 10 μL desse cultivo foram adicionados no centro de frascos de 10 mL contendo 5 mL do meio LGI-P semissólido. Após 10 dias de cultivo em estufa, a formação da película aerotóxica foi avaliada.

Cada estirpe foi representada por três amostras. Foram feitos três ensaios independentes.

3.1.3.6. Material vegetal e condições de crescimento

Foram utilizadas sementes selvagens de *A. thaliana* (Columbia-0) gentilmente cedidas pela Dra. Jen Sheen (Departamento de genética - Harvard Medical School - USA). As plântulas foram crescidas em placas de Petri contendo meio Murashige e Skoog (MS) ½ força com sacarose 0,5% e MES 0,05% a 22 °C, 60% de umidade relativa e 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz com fotoperíodo de 12h durante 7 dias. As plântulas foram transferidas individualmente para vasos contendo o substrato comercial *West Garden* e irrigadas com uma solução de Hoagland 25% a cada 2 dias durante 60 dias.

3.1.3.7. Inoculação

As estirpes bacterianas foram crescidas em meio DYGS, centrifugadas a 12000g e, após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes com água ultrapura estéril. A $\text{DO}_{600\text{nm}}$ final foi 0,01 equivalente a 10^6 células mL^{-1} . Então, foram adicionados 20 mL de inóculo nas placas de Petri contendo

plântulas com 7 dias de idade. Para o material controle, foi adicionada água ultrapura estéril em igual volume. Após três horas de incubação, as plântulas foram transferidas para vasos com substrato *West Garden* e cultivadas como descrito anteriormente.

Cada estirpe foi representada por 12 amostras. Foram feitos três ensaios independentes.

3.1.3.8. Análise fenotípica de promoção do crescimento vegetal

Após os 60 dias de cultivo em vaso, as amostras foram avaliadas quanto à massa fresca de parte aérea e radicular, que foi determinada por meio de pesagem em balança analítica, imediatamente após a coleta. Foram avaliadas 12 plantas em cada tratamento.

3.1.3.9. Análise da colonização

Para mensurar a colonização bacteriana nas raízes da planta inoculada, foi utilizada uma região mediana da raiz de aproximadamente 1,0 cm raiz. Então, a amostra foi imersa em Cloramina-T durante 1 min e submetida à maceração em H₂O ultrapura estéril. Em seguida, foram feitas diluições seriadas e a amostra foi plaqueada em meio LGI-P, acrescido dos antibióticos Canamicina e Estreptomicina a 50 µg.mL⁻¹, além de extrato vegetal obtido da maceração de plântulas de *A. thaliana* com 12 dias de idade, na proporção de uma parte de extrato para 15 partes de meio. As placas foram mantidas sob temperatura de 30°C durante cinco dias. Após este período, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias.

3.1.3.10. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram testados pela análise de variância (ANOVA). O teste Tukey foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos ao nível de 1% de significância, utilizando o software Genes (versão 2013.5.1)(Cruz, 2013).

3.1.4. RESULTADOS

3.1.4.1. Identificação da fase exponencial de crescimento das bactérias

Para os ensaios de resposta a estresses ambientais e avaliação das características da promoção do crescimento vegetal, é necessário que as bactérias (selvagem e mutantes) estejam em uma mesma condição de crescimento. Neste sentido, foi obtida uma curva de crescimento para a bactéria selvagem e os mutantes $\Delta gdhA$, $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ para identificar a fase exponencial de crescimento, em que as bactérias apresentam maior taxa de multiplicação celular. Após essa etapa, uma DO dentro da fase exponencial foi escolhida para os ensaios posteriores.

Os mutantes $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ são afetados na capacidade de transporte ($pqqB$) e biossíntese ($pqqC$ e $pqqE$) da molécula PQQ. Já $\Delta gdhA$ é mutado na via de produção da enzima GDH-desidrogenase, que tem PQQ como cofator.

Ao analisar o crescimento das bactérias após 36 horas de cultivo, observou-se que o mutante $\Delta gdhA$ (Figura 2B), apresentou crescimento semelhante à bactéria selvagem (Figura 2), com uma fase lag de aproximadamente seis horas e a exponencial de 22. Ao analisar a fase exponencial de crescimento, foi escolhida a DO 1.6 para conduzir os ensaios posteriores para ambas as bactérias.

Os mutantes $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ da via de biossíntese e transporte de PQQ apresentaram padrões de crescimento distintos (Figura 2F). O mutante $\Delta pqqB$ (Figura 2C), tem uma fase lag de 10 horas, semelhante ao $\Delta pqqE$ (Figura 2E). O mutante $\Delta pqqC$ (Figura 2D), tem crescimento lento, que se manteve ao longo das 36 horas, não mostrando a fase lag característica. Os mutantes $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ têm menor crescimento quando comparados à bactéria selvagem. As DOs identificadas para os ensaios posteriores para os mutantes $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ foram 1.2, 0.7 e 1.0, respectivamente.

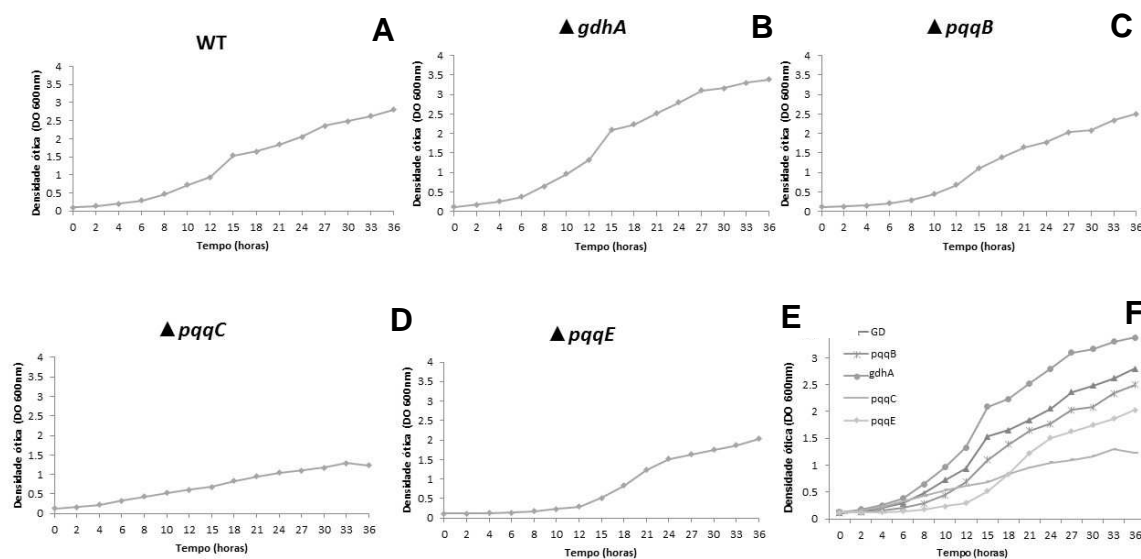


Figura 2 - Fases de crescimento de *G. diazotrophicus* selvagem e dos mutantes Δ gdhA, Δ pqqB, Δ pqqC e Δ pqqE. O ensaio foi conduzido em meio LGI modificado a 30°C, 250 rpm, e as leituras de DO foram feitas durante 36 h de cultivo.

3.1.4.2. Análise das curvas de concentrações de estresses abióticos em *G. diazotrophicus*

Com o objetivo de identificar as concentrações dos agentes estressantes que inibissem 20-30% do crescimento de *G. diazotrophicus*, foi feito um ensaio em meio líquido com diferentes agentes estressantes (Figura 3). Para os metais, foram identificadas as concentrações de 0,9 mM para zinco, de 1,2 mM para cobalto e de 0,09 mM para cádmio. A concentração encontrada para paraquat foi 70 μ M, que inibiu 25% do crescimento bacteriano. Os sais NaCl e Na₂SO₄, nas concentrações de 30 mM e 150 mM, respectivamente, causaram inibição no crescimento de 26%. O peg 400 também na concentração de 200 mM inibiu 25% o crescimento de *G. diazotrophicus*. Para sacarose, a concentração encontrada foi 750 mM, causando taxa de inibição de 30% (Figura 3).

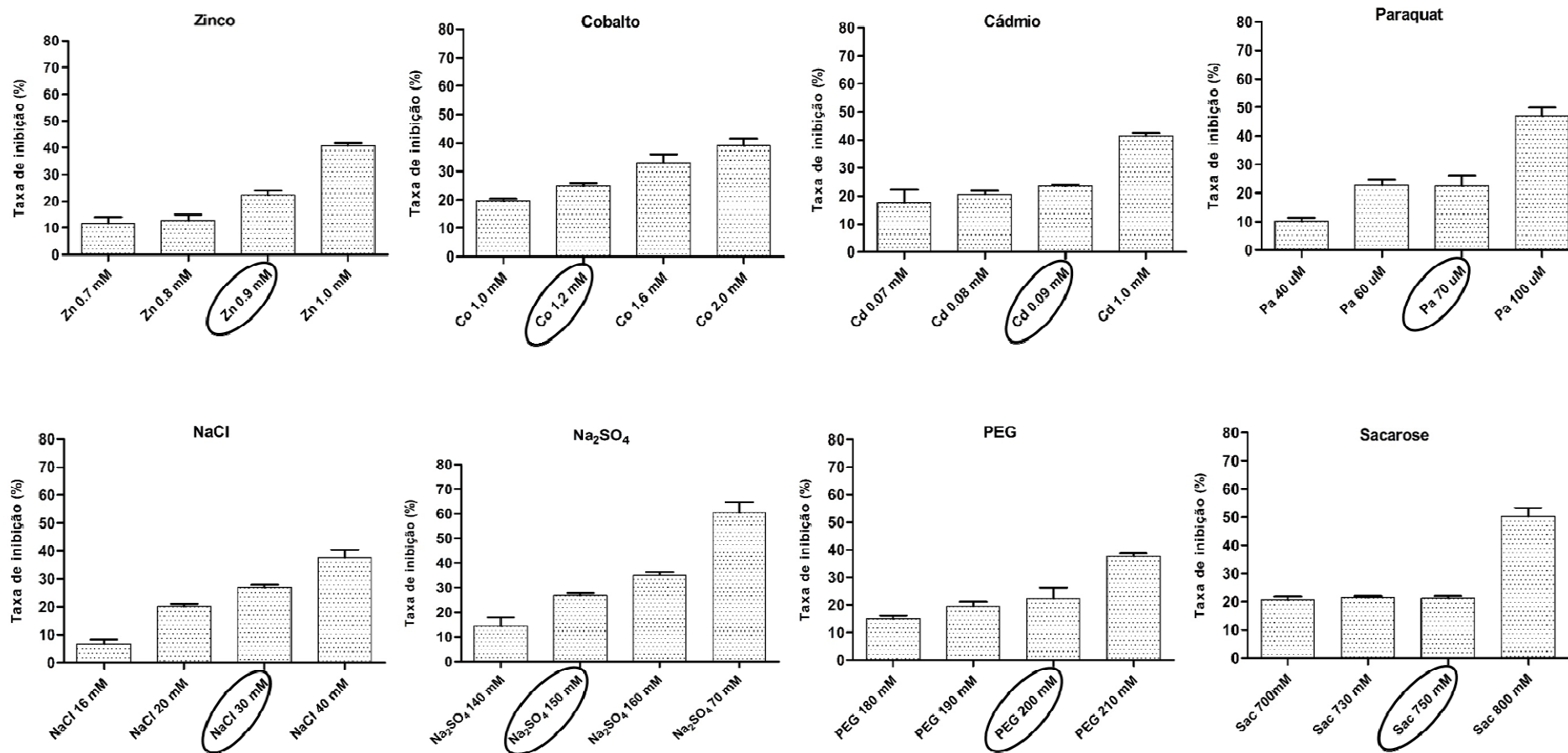


Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações de agentes estressantes sobre o crescimento de *G. diazotrophicus* em meio líquido. Os ensaios foram conduzidos em LGI modificado a 30°C e analisados após 24 horas de crescimento.

3.1.4.3. Importância de PQQ na tolerância a estresses abióticos em *G. diazotrophicus*

Após identificar as concentrações que inibem entre 20-30% o crescimento da bactéria *G. diazotrophicus* selvagem, foi feito ensaio testando essas concentrações de zinco, cobalto, cádmio, paraquat, NaCl, Na₂SO₄, peg e sacarose sobre os mutantes \blacktriangle *gdhA*, \blacktriangle *pqqB*, \blacktriangle *pqqC* e \blacktriangle *pqqE* (Figura 4). Assim, foi possível verificar a importância de PQQ na tolerância a tais estresses abióticos na bactéria.

Como observado na Figura 4, \blacktriangle *gdhA* mostrou notável sensibilidade aos metais, com destaque para zinco. Além disso, foi o mutante mais sensível ao estresse causado por paraquat, com inibição de 88%. No entanto, seu comportamento foi semelhante ao da bactéria selvagem quando exposto a Na₂SO₄ e peg, se mostrando significativamente mais tolerante a NaCl, diferentemente dos demais mutantes.

Em geral, \blacktriangle *pqqB* apresentou maior tolerância aos estresses testados em comparação com os demais mutantes, apresentando perfil similar à bactéria selvagem, com porcentagem de inibição menor que 30% para os três metais e PEG. Quanto ao estresse causado por paraquat, \blacktriangle *pqqB* se mostrou ainda mais tolerante que o controle. Contudo, foi fortemente inibido pelo estresse causado por Na₂SO₄ e sacarose (Figura 4).

O \blacktriangle *pqqC* mostrou elevada sensibilidade aos metais pesados, porém é altamente tolerante a paraquat. Para Na₂SO₄ e peg, também foi observada sensibilidade mais acentuada que o controle, o que não ocorreu para NaCl e sacarose (Figura 4).

O mutante \blacktriangle *pqqE* tem sensibilidade a todos os estresses testados, com inibição maior que 50% a cádmio, paraquat, peg e sacarose. Para NaCl e Na₂SO₄, não foi observada diferença significativa quando comparado a *G. diazotrophicus* selvagem (Figura 4).

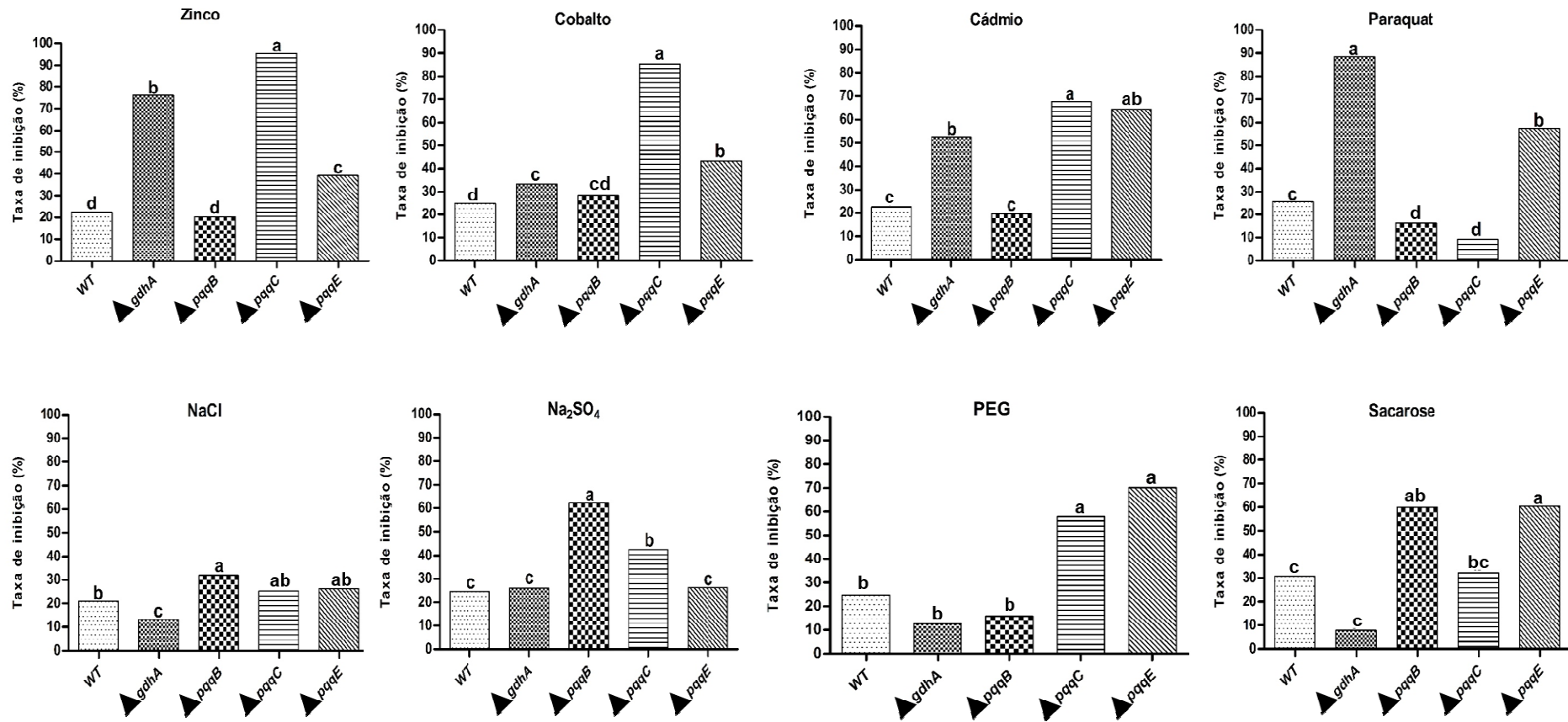


Figura 4 - Análise da tolerância da bactéria selvagem e dos mutantes *gdhA*, *pqqB*, *pqqC* e *pqqE*, aos agentes estressantes zinco, cobalto, cádmio, paraquat, NaCl, Na₂SO₄, peg e sacarose. Os ensaios foram conduzidos em LGI modificado a 30°C e analisados após 24 horas de crescimento. A figura representa o resultado de no mínimo três experimentos independentes. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Para verificar a importância de PQQ na tolerância à temperatura, *G. diazotrophicus* e os mutantes foram incubados a 25, 30 e 35 °C. Notou-se que, em 25 °C, os mutantes $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ na diluição de 10^{-3} apresentaram maior tolerância, com crescimento homogêneo de colônia, diferentemente das outras bactérias. Na temperatura de 30°, ideal para o crescimento dessas bactérias, $\Delta gdhA$ e $\Delta pqqB$ na diluição de 10^{-3} ainda mostraram crescimento prejudicado. Na temperatura de 35°C, observou-se leve crescimento da bactéria selvagem em 10^0 , sugerindo participação dessa molécula na tolerância à temperatura de 35°C (Figura 5).

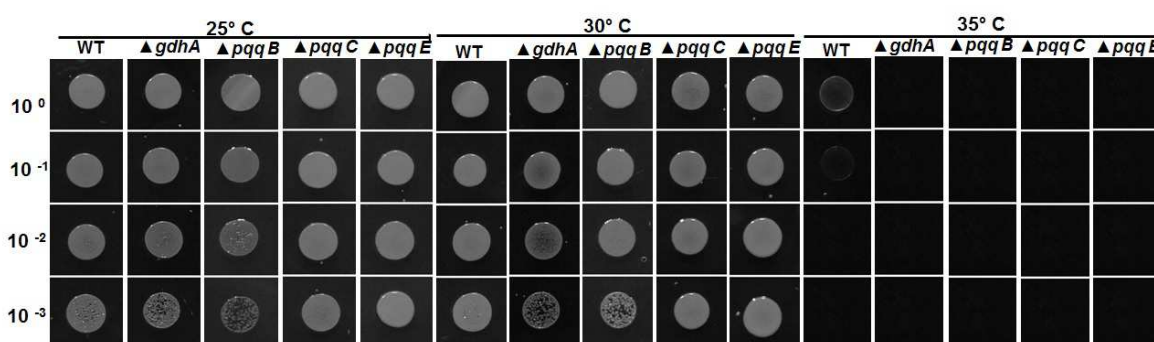


Figura 5 - Importância dos genes de biossíntese e transporte de PQQ na tolerância a temperatura em *G. diazotrophicus* e nos mutantes $\Delta gdhA$, $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$. Os ensaios foram conduzidos em LGI modificado e feita a análise após cinco dias de crescimento (n=3). A figura representa o resultado de no mínimo três experimentos independentes com cinco repetições por tratamento.

Para avaliar a tolerância das bactérias ao estresse oxidativo causado por H_2O_2 , foi feito ensaio de halo de inibição. Todos os mutantes apresentaram maior tolerância à presença de H_2O_2 quando comparados a *G. diazotrophicus* selvagem (Figura 6). Este resultado é contrário àquele obtido para os mutantes sob estresse com paraquat.

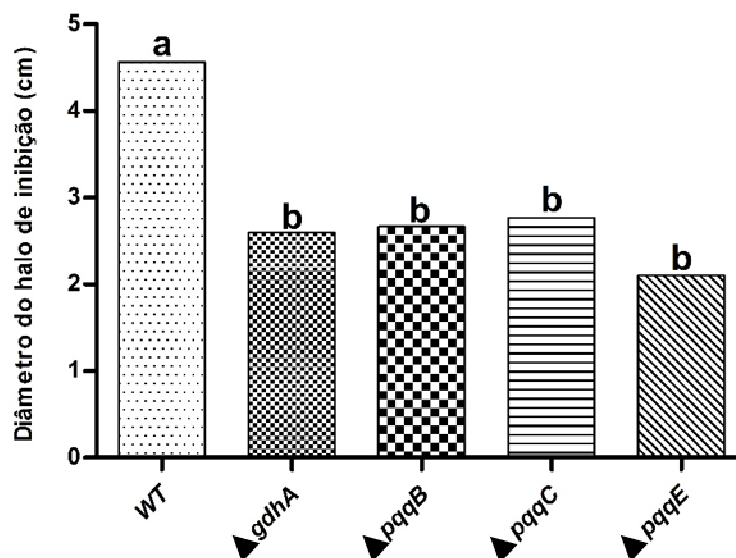


Figura 6 - Tolerância das bactérias a H₂O₂. O ensaio foi conduzido em meio LGI modificado sólido. O halo de inibição foi mensurado após três dias de crescimento a 30 °C em estufa. A figura representa o resultado de no mínimo três experimentos independentes com cinco repetições por tratamento.

Para verificar o efeito antioxidante mediado por PQQ na tolerância das bactérias ao estresse abiótico, foi adicionada molécula sintética às culturas bacterianas na presença do agente estressante gerador de EROs, paraquat. Inicialmente, foi testada com *G. diazotrophicus* selvagem, a adição de duas concentrações de PQQ, 100 µM e 500 µM. Como pode ser observado na Figura 7, com 500 µM de PQQ sintético houve aumento de 20% na tolerância da bactéria ao estresse causado por paraquat. Já na concentração mais baixa, não houve diferença significativa.

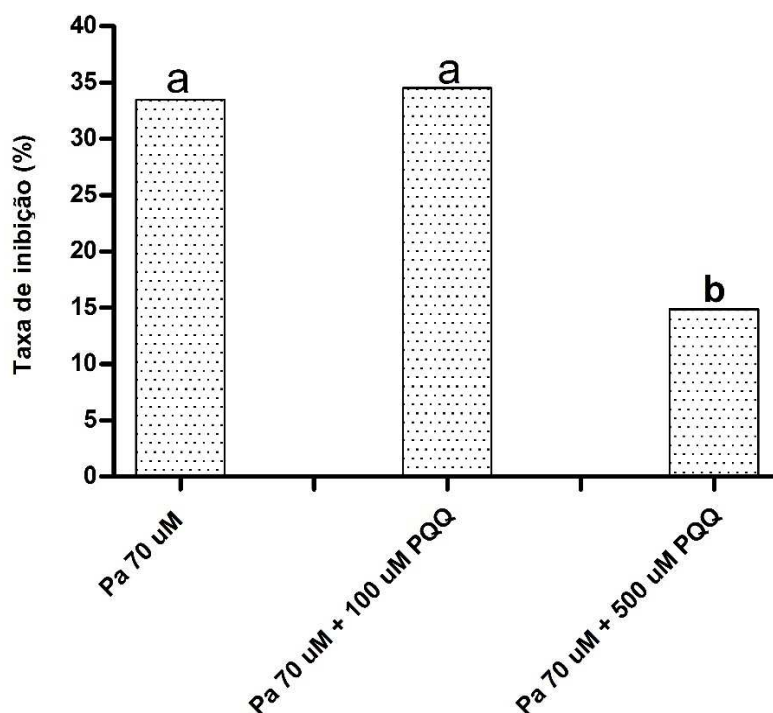


Figura 7 -Efeito de PQQ sintético na tolerância de *G. diazotrophicus* a estresse causado por paraquat. Os ensaios foram conduzidos em meio LGI modificado suplementado com o agente estressante (paraquat) na presença de PQQ sintético. A figura representa o resultado de no mínimo três experimentos independentes com 5 repetições por tratamento. Em cada tratamento, letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Após identificar a concentração de PQQ sintético, que apresentou efeito positivo na tolerância da bactéria selvagem a paraquat, foi feito um ensaio com os mutantes \blacktriangle *gdhA*, \blacktriangle *pqqB*, \blacktriangle *pqqC* e \blacktriangle *pqqE*. Como é verificado na Figura 8, para *G. diazotrophicus* selvagem e o mutante \blacktriangle *gdhA*, a adição de PQQ aumentou a tolerância das bactérias ao estresse causado por paraquat em 20% e 40%, respectivamente. Em contraste, \blacktriangle *pqqB* apresentou aumento considerável na sensibilidade ao paraquat. Os mutantes \blacktriangle *pqqC* e \blacktriangle *pqqE* foram pouco afetados pela presença da molécula sintética, apresentando tendência de aumento na tolerância, sem diferença estatística entre os tratamentos.

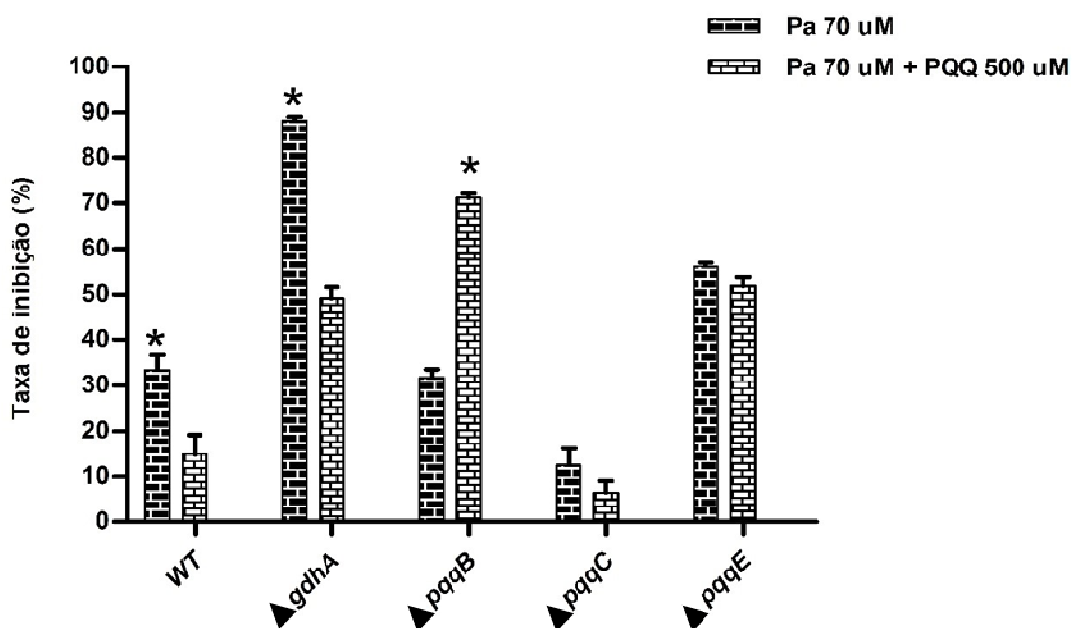


Figura 8 - Efeito do PQQ sintético na tolerância de *G.diazotrophicus* selvagem e dos mutantes Δ *gdhA*, Δ *pqqB*, Δ *pqqC* e Δ *pqqE* ao estresse causado por paraquat. O ensaio foi conduzido em meio LGI modificado líquido suplementado com paraquat e PQQ sintético. A figura representa o resultado de no mínimo três experimentos independentes.

3.1.4.4. Importância de PQQ para a fixação biológica de nitrogênio

Para verificar a importância da molécula PQQ durante o processo de fixação biológica de nitrogênio, foi feito ensaio em meio LGI-P semissólido (Figura 9). A formação da película aerotóxica foi observada apenas na bactéria *G. diazotrophicus* selvagem. Os mutantes Δ *gdhA* e Δ *pqqB*, reduziram o pH do meio, como pode ser observado pela coloração amarelada do meio, característica não observada nos mutantes Δ *pqqC* e Δ *pqqE*. Portanto, a mutação desses genes prejudica a fixação biológica de nitrogênio.

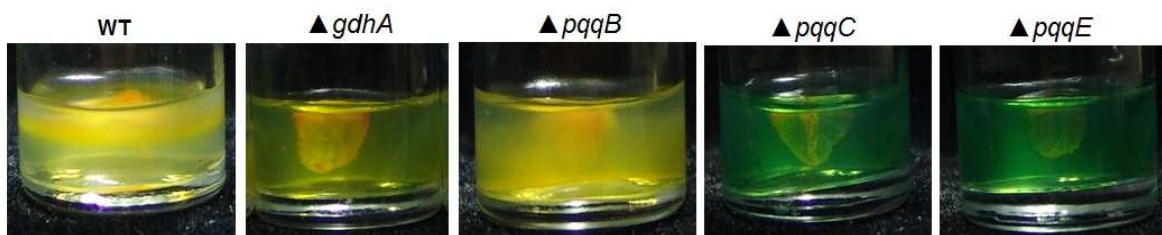


Figura 9- Análise da fixação biológica de nitrogênio em *G. diazotrophicus* e nos mutantes $\Delta gdhA$, $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$. O ensaio foi conduzido avaliando a formação de película aerotóxica típica em meio LGI-P semissólido sem adição de nitrogênio. A avaliação foi feita após 10 dias de crescimento

3.1.4.5. PQQ atua na promoção do crescimento de *A. thaliana*

Com o intuito de verificar o papel da molécula PQQ na interação de *G. diazotrophicus* e mutantes $\Delta gdhA$, $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ com plantas de *A. thaliana*, foi feito um ensaio de colonização (Figura 10). Como pode ser verificado, as plantas inoculadas com os mutantes para a via de biossíntese e transporte de PQQ ($\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$) mostraram menor massa fresca de parte aérea e de raiz de *A. thaliana* (Figuras 10 A e B). Já as plantas inoculadas com $\Delta gdhA$ apresentaram fenótipo de massa fresca de raiz semelhante à bactéria selvagem e um fenótipo intermediário para massa fresca de parte aérea. Plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* selvagem aumentaram em 33% a massa fresca de parte aérea e 12% a de raiz.

Para verificar se os mutantes bacterianos, apesar de não promoverem o crescimento das plantas de *A. thaliana*, apresentaram ou não capacidade de colonizar os tecidos vegetais, foi feito um ensaio de UFC. Ao analisar os dados, observou-se que os mutantes $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ mostraram melhor eficiência na colonização de plantas de *A. thaliana*, Figura 10C, mesmo não promovendo o crescimento vegetal. O mutante $\Delta gdhA$ apresentou menor eficiência de colonização quando comparado aos outros mutantes. Sendo assim, tais mutações não afetam a capacidade de colonização de *G. diazotrophicus*, porém a ausência da molécula PQQ prejudica a capacidade de promoção do crescimento da planta. Os genes de biossíntese e transporte de PQQ, *pqqB*, *pqqC* e *pqqE*, são um fator determinante para promoção do crescimento mediado por *G. diazotrophicus* em plantas de *A. thaliana*, confirmando o papel dessa molécula na promoção do crescimento vegetal.

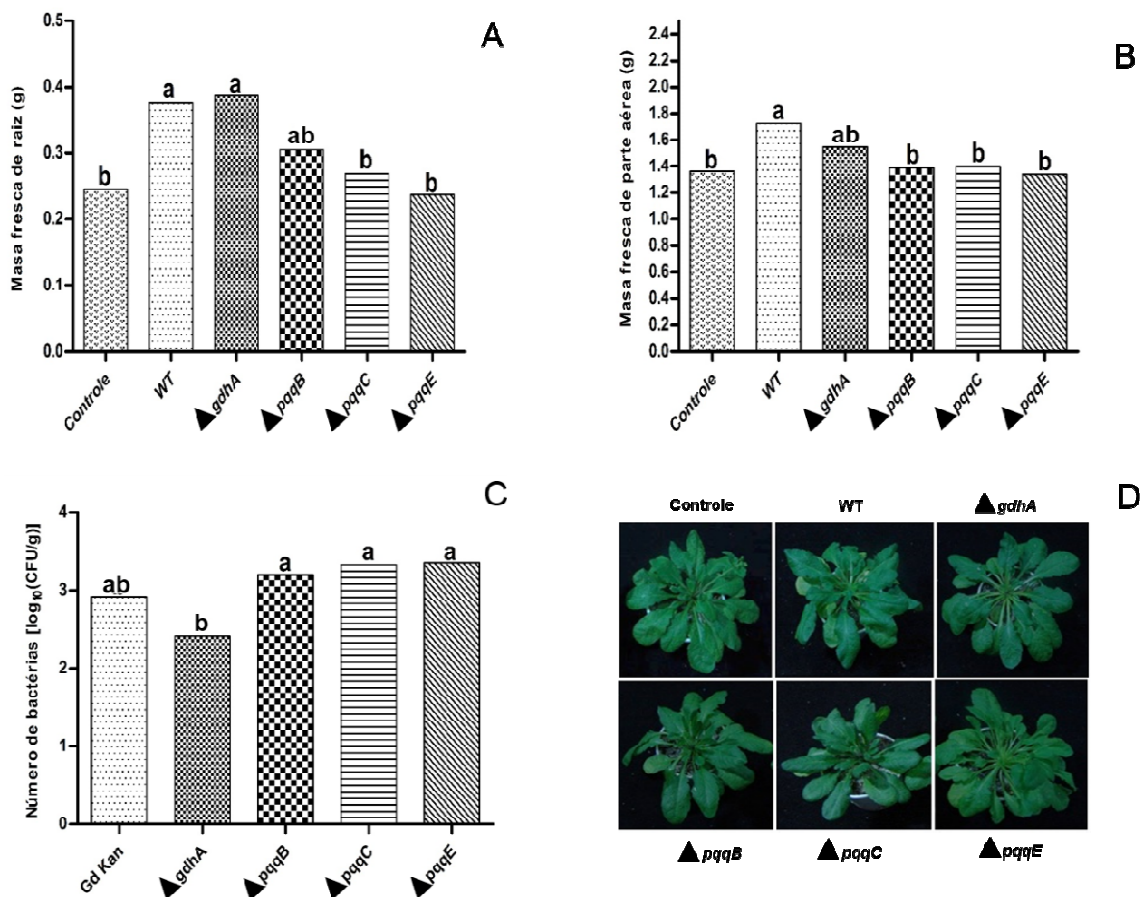


Figura 10 - Análise da promoção do crescimento em plantas de *A. thaliana* inoculadas com as bactérias. As plantas foram inoculadas aos 7 dias com as bactérias *G. diazotrophicus* e mutantes ▲*gdhA*, ▲*pqqB*, ▲*pqqC* e ▲*pqqE*. Após 60 dias, foram analisadas os parâmetros massa fresca de parte aérea (A), massa fresca de raiz (B), colonização pelo ensaio de UFC (C). Em D, imagem das plantas controle e inoculadas. Tratamento com letras diferentes nos gráficos apresenta diferenças significativas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

3.1.5. DISCUSSÃO

O entendimento dos mecanismos utilizados pelas bactérias para promoção do crescimento vegetal tem se tornado um desafio para os pesquisadores, uma vez que fatores ambientais, características da planta hospedeira e da própria bactéria influenciam na colonização e,

consequentemente, na promoção do crescimento vegetal. Entre as diversas PGPB caracterizadas, *G. diazotrophicus* tem se destacado pelo seu alto potencial biotecnológico, tendo sido isolada em diferentes culturas de interesse econômico (Anitha & Thangaraju, 2010; Crespo et al., 2011; Luna et al., 2011; Saravanan et al., 2008). Uma característica interessante desta bactéria é a tolerância a estresses ambientais (Intorne et al., 2009, 2012; Tejera et al., 2003). Neste estudo, utilizando mutantes bacterianos de *G. diazotrophicus*, defectivos para biossíntese e transporte da molécula PQQ, objetivou-se compreender a importância desta molécula na tolerância a estresses abióticos, uma vez que é descrita como protetora contra danos oxidativos (Misra et al., 2012).

Um modelo de como acontece a biossíntese da molécula PQQ em *G. diazotrophicus* é proposto (Figura 11). Nesta bactéria, existem cinco genes que participam deste processo *pqqABCDE* e acredita-se que eles estejam organizados em operon (Intorne et al., 2009). Inicialmente um precursor glutamato ou tirosina é convertido a S-adenosil-metionina (SAM) pela ação da proteína PQQA. Como já observado em *Klebsiella pneumoniae*, também uma bactéria gram-negativa, é possível que PQQE sintetase transforme SAM em uma forma intermediária de PQQ, 3a-(2-amino-carboxietil)-4,5-dioxo-4,5,6,7,8,9-hexahidroquinolina-7,9-ácido dicarboxílico (AHQQ) (Meulenberg et al., 1992). PQQC catalisa a última etapa da via de biossíntese da molécula PQQ. Acredita-se que, similarmente a outras bactérias, a proteína PQQB atue como transportadora de PQQ do citoplasma para o periplasma. Ainda não foi elucidado o papel de PQQD na via de biossíntese de PQQ, no entanto, existem evidências de que esta proteína participe de diferentes etapas durante este processo (Puehringer et al., 2008).

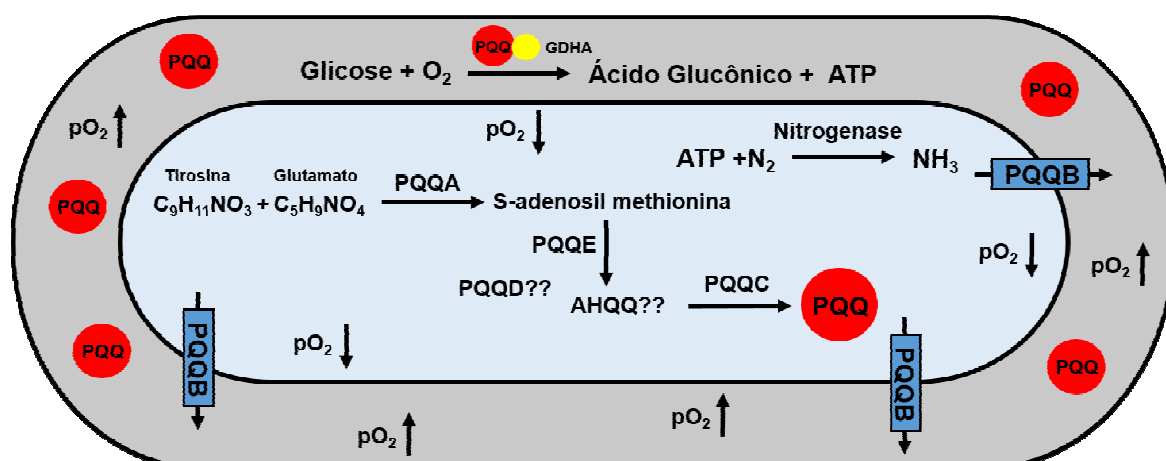


Figura 11 - Modelo proposto da via de biossíntese de PQQ em *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Inicialmente, um precursor glutamato ou tirosina é convertido a S-adenosil-metionina (SAM) pela ação da proteína PQQA. Então, PQQE sintetase transforma SAM em uma forma intermediária de PQQ, chamada de 3a-(2-amino-carboxietil)-4,5-dioxo-4,5,6,7,8,9-hexahidroquinolina-7,9-ácido dicarboxílico (AHQQ), já descrita em outros organismos. Em seguida, PQQC catalisa a última etapa da via de biossíntese da molécula PQQ. A proteína PQQB deve atuar como transportadora de PQQ do citoplasma para o periplasma, onde PQQ vai atuar como cofator da enzima glicose desidrogenase (GDHA). Esse processo respiratório acontece na região periplasmática, sob altas tensões de oxigênio (pO_2), enquanto no citoplasma, as tensões de O_2 são baixas, permitindo o perfeito funcionamento da nitrogenase, que vai fazer a fixação biológica de nitrogênio. Ainda não foi elucidado o papel de PQQD na via de biossíntese de PQQ. PQQ: pirroloquinolina quinona

Após a obtenção da curva de crescimento microbiano, foi possível observar menor crescimento dos mutantes quando comparados à bactéria selvagem. Resultado semelhante foi observado para mutantes de *E. coli* defectivos na via de biossíntese de PQQ, em que mostraram atraso na fase lag e, conseqüentemente, um menor crescimento (Andreeva et al., 2011). Sun et al. (2014), estudando a produção de PQQ em *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* recombinantes, demonstraram que a produção de PQQ é proporcional à concentração de glicose, afirmando a existência de um sinergismo entre a biossíntese de PQQ, metabolismo de glicose e a proliferação celular nestas bactérias. No nosso estudo, os mutantes $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$, defectivos para a biossíntese e transporte de PQQ, apresentaram menor crescimento em comparação ao mutante $\Delta gdhA$ e à bactéria selvagem, sugerindo a importância dessa via no metabolismo de glicose e, conseqüente, multiplicação celular em *G. diazotrophicus*.

No intuito de verificar o papel da molécula PQQ na tolerância a estresses abióticos em *G. diazotrophicus*, foi feito ensaio em meio líquido suplementado com diferentes agentes estressantes. O mutante $\Delta gdhA$ apresentou sensibilidade aos metais pesados e a paraquat. O gene *gdhA* codifica uma enzima glicose desidrogenase, que tem como cofator a molécula PQQ em *G. diazotrophicus*. Essa enzima é responsável pela conversão de glicose a ácido glucônico (Rucker et al., 2009). Possivelmente, a ausência dessa enzima no periplasma desencadeia aumento da glicólise dentro da célula. Aumento na atividade celular para degradação da glicose e presença do agente estressante paraquat podem induzir produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, o PQQ presente no interior da célula é insuficiente para desintoxicar a célula dos EROs produzidos, refletindo uma maior sensibilidade desse mutante ao estresse oxidativo provocado por paraquat.

Os mutantes $\Delta pqqB$, $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ apresentaram respostas diferentes quando submetidos aos agentes estressantes testados. O mutante $\Delta pqqB$ mostrou maior tolerância aos estresses causados por metais e paraquat. Acredita-se que o gene *pqqB* codifique uma proteína que atua no transporte de PQQ da membrana plasmática para o periplasma (Figura 11), não interferindo diretamente na produção da molécula (Shen et al., 2012). Diante disso, o resultado sugere que, com acúmulo de PQQ no citoplasma bacteriano, a molécula atue como antioxidante, protegendo a célula contra os danos oxidativos causados diretamente por paraquat e indiretamente por cádmio, cobalto e zinco.

O mutante $\Delta pqqC$ foi tolerante ao paraquat. Este gene codifica uma proteína que atua na última etapa de biossíntese da molécula PQQ (Puehringer et al., 2008). Os resultados sugerem que o produto intermediário (sem a ação do catalisador PQQC) dessa proteína tem características que protegem a célula contra o estresse oxidativo (Figura 11). Já o $\Delta pqqE$ apresentou alta taxa de inibição (57%) ao paraquat. Esse gene codifica uma enzima sintetase que atua na primeira etapa da via de biossíntese da molécula PQQ (Figura 11) (Puehringer et al., 2008). Sendo assim, no mutante $\Delta pqqE$, não há produção PQQ, o que explica sua sensibilidade ao estresse oxidativo. Os mutantes $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ apresentaram sensibilidade aos metais pesados, o que não foi observado para o mutante $\Delta pqqB$. Tal fato sugere que a molécula PQQ, além de atuar contra o

estresse oxidativo, também protege a célula de danos causados por metais pesados.

A molécula PQQ é descrita como antioxidante. Foi observado em células de *E. coli* transgênica que a expressão de genes da síntese de PQQ afetou a tolerância a estresse oxidativo e a atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase (Khairnar et al., 2003). Mishra et al.(2004), tendo mostrado que a radioproteção e a proteção a estresse oxidativo, causadas por PQQ em bactérias, são consequência da habilidade dessa molécula atuar como antioxidante, removendo as espécies reativas de oxigênio.

G. diazotrophicus já foi relatada como tolerante a estresse salino (Hartmann et al., 1991). Observou-se que somente $\Delta pqqB$ apresentou sensibilidade ao NaCl, sugerindo que a molécula PQQ não participa diretamente na proteção contra estresse iônico e osmótico causado por este sal.

Estudos revelam que estresses iônico e osmótico em bactérias podem desencadear formação de EROs (França et al., 2007; Shirkey et al., 2000). Nossos resultados sugerem que PEG, um estressor osmótico, desencadeia formação de EROs em *G. diazotrophicus*, porque os mutantes $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$, que não são capazes de sintetizar a molécula antioxidante PQQ, apresentaram sensibilidade quando expostos a PEG. No entanto, o mesmo não foi observado para NaCl, em que os mutantes $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$ apresentaram a mesma tolerância observada na bactéria selvagem. Esses dados sugerem que o NaCl causa apenas estresse iônico e osmótico em *G. diazotrophicus*, não acarretando formação de EROs.

A adição de PQQ sintético inibiu o crescimento do mutante $\Delta pqqB$, sugerindo que a molécula PQQ atua como agente estressante para esta estirpe. Interessante notar que, na bactéria selvagem e no mutante $\Delta gdhA$, a adição de PQQ causou aumento na tolerância a paraquat, uma vez que essas bactérias sintetizam PQQ, e provavelmente tenham ocorrido acúmulo dessa molécula e, conseqüentemente, maior proteção contra estresse oxidativo. Já para os mutantes $\Delta pqqC$ e $\Delta pqqE$, a presença de PQQ sintético não interferiu na tolerância. Para $\Delta pqqC$, isso pode ter acontecido porque esse mutante já apresentava uma alta tolerância a paraquat. Assim, estudos objetivando entender o mecanismo de atuação de PQQ sintético devem ser conduzidos no intuito de

identificar os mecanismos de ação dessa molécula na tolerância a estresses osmótico e iônico.

Ao analisar a capacidade de fixar nitrogênio, pode-se observar que todos os mutantes perderam essa característica na ausência de PQQ. A enzima glicose desidrogenase, na ausência do cofator PQQ, perde sua atividade, que é transformar glicose em ácido glucônico no espaço periplasmático (Figura 11). Com isso, outras enzimas atuam nesse processo, aumentando a atividade metabólica e a produção EROs, o que, provavelmente, inibe a atividade da nitrogenase e, conseqüentemente, a fixação biológica de nitrogênio (Alquères et al., 2010). Logo, a molécula PQQ é importante para o processo de FBN em *G. diazotrophicus*, provavelmente, em decorrência de seu papel como molécula antioxidante.

Nos ensaios em que foi utilizado H_2O_2 como agente estressante, todos os mutantes mostraram maior tolerância em relação à selvagem, mostrando que, para este estresse, PQQ não apresenta atividade antioxidante. Assim, novos ensaios devem ser conduzidos no propósito de entender quais processos são afetados pelo peróxido de hidrogênio em *G. diazotrophicus*, que expliquem sua sensibilidade e, ao mesmo tempo, compreendam por que razão, para este agente estressante, a molécula PQQ não atua como antioxidante.

Para identificar o papel de PQQ durante a interação bactéria-planta, foi feito um ensaio de promoção do crescimento em *A. thaliana*. Os mutantes para via de PQQ não promoveram crescimento de *A. thaliana* quando comparados à bactéria selvagem. Choi et al. (2008) verificaram que a adição de PQQ sintético promoveu crescimento de plantas de pepino. Além disso, neste mesmo estudo, a inoculação de *Pseudomonas fluorescens*, bactéria produtora de PQQ, aumentou o peso da planta, o número total de flores e frutos em plantas de tomate em cultivo hidropônico. A molécula PQQ é também importante na promoção do crescimento de feijão por *Pseudomonas aeruginosa* (Ahmed & Shahad, 2010). Portanto, os dados obtidos neste estudo ratificam a hipótese de PQQ como molécula promotora de crescimento vegetal.

Assim, os dados obtidos nesse estudo abrem perspectivas interessantes para uso de micro-organismos produtores de PQQ na agricultura, visto que, além de apresentar função na promoção do crescimento vegetal, esta molécula desempenha papel importante na tolerância a estresses ambientais, podendo se

tornar uma ferramenta importante na busca de sistemas agrícolas sustentáveis e produtivos. No entanto, novos estudos devem ser feitos para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese de PQQ bem como os fatores envolvidos na interação de plantas com bactérias produtoras da molécula PQQ.

3.1.6 CONCLUSÕES

- ✓ Os *mutantes* \blacktriangle *gdhA*, \blacktriangle *pqqB*, \blacktriangle *pqqC* e \blacktriangle *pqqE* apresentam taxa de multiplicação celular diferentes.
- ✓ Mutações nos genes *pqqC* e \blacktriangle *pqqE* da via de biossíntese PQQ aumentam a sensibilidade da bactéria aos estresses provocados por metais e paraquat.
- ✓ PQQ exógeno aumenta a tolerância de *G. diazotrophicus* ao estresse causado por paraquat, revelando que PQQ atua como molécula protetora contra estresse oxidativo.
- ✓ Mutações nos genes de biossíntese e transporte de PQQ prejudicam a fixação biológica de nitrogênio.
- ✓ Plantas inoculadas com bactérias mutantes para via de biossíntese e transporte de PQQ apresentaram menor massa fresca de parte aérea e raiz, revelando o papel dessa molécula como promotora do crescimento em *A. thaliana*.
- ✓ Mutantes da via de biossíntese e transporte de PQQ colonizam plantas de *A. thaliana*, porém não atuam na promoção do crescimento.

3.2. Pirroloquinolina quinona (PQQ): fator de promoção do crescimento em plantas de *Arabidopsis thaliana*

3.2.1. INTRODUÇÃO

As plantas necessitam de diversos compostos tais como água, nutrientes e hormônios para seu crescimento e desenvolvimento. A maior parte das substâncias indispensáveis para seu desenvolvimento é produzida pelos próprios vegetais, enquanto outras necessitam ser adquiridas de fontes externas. A associação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal auxilia direta e indiretamente o melhor desenvolvimento da planta hospedeira. Tais bactérias são capazes de disponibilizar para planta diferentes compostos capazes de promover crescimento vegetal, como a pirroloquinolina quinona (PQQ). Este composto, exclusivamente produzido por algumas espécies de micro-organismos, é um cofator de enzimas desidrogenases bacterianas, desempenha função antioxidante, atua no controle de patógenos e participa na solubilização de fosfato (Misra et al., 2012).

PQQ tem importância não só para as bactérias que as produzem, mas também para plantas e animais. Em decorrência da associação entre plantas e bactérias, PQQ tem sido identificado em uma variedade de plantas (Kumazawa et al., 1995; Mitchell et al., 1999; Noji et al., 2007) e também já foi descrito como uma vitamina do complexo B (Kasahara e Kato, 2003). Estudos conduzidos em animais mostram que PQQ participa de diferentes funções biológicas,

beneficiando a sobrevivência das células, visto que melhora a sobrevivência neonatal e a performance reprodutiva, além de proteger as células de eventos cardíacos e neurológicos (Rucker e Chowanadisai, 2009). Uma das descobertas mais surpreendentes com PQQ nos últimos anos é sua capacidade de estimular a biogênese mitocondrial, atuando contra o envelhecimento celular e os efeitos danosos provenientes deste processo (Chowanadisai et al., 2010).

Embora PQQ seja importante para plantas e animais, a maioria dos estudos com esta molécula é feita em sistemas animais. Seu papel em plantas foi pouco explorado, apesar de já ter sido relatado o potencial dessa molécula para estes sistemas. PQQ foi caracterizado como uma molécula promotora do crescimento vegetal em pepino, feijão e tomate (Choi et al., 2008; Ahmed e Shahab, 2010). Além disso, foi relatada sua participação na solubilização de fósforo (Han et al., 2008) e demonstrado que genes relacionados à biossíntese de PQQ, quando expressos em *Azotobacter*, ampliaram seu potencial de uso como biofertilizante (Sashidhar e Podile, 2010).

A participação de PQQ na tolerância a estresses ambientais tem sido descrita principalmente para estresse oxidativo em bactérias (Khairnar et al, 2003), em plantas (Choi et al., 2008) e em mamíferos (He et al., 2003), visto que, devido a seu potencial antioxidante, PQQ atua na limpeza de espécies reativas de oxigênio (Choi et al., 2008).

Portanto, pelas suas interessantes características, PQQ tem um grande potencial a ser explorado em sistemas vegetais. Elucidar como esta molécula atua na promoção do crescimento vegetal e quais os mecanismos moleculares envolvidos nesta característica podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias no sentido de melhorar a produtividade em sistemas agrícolas.

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. Pirroloquinolina-quinona (PQQ) e a promoção do crescimento vegetal

Pirroloquinolina quinona [4, 5-di-hidro-4, 5-dioxo1H-pirrolo [2, 3-f] quinolina-2, 7, 9-ácido tricarbóxico] é uma quinona ortoaromática, tricíclica, que atua como cofator redox de várias desidrogenases bacterianas (Ahmed & Shahad, 2010). Apresenta solubilidade em água, estabilidade ao calor e é capaz de catalisar contínuos ciclos redox, bem como reações de desaminação oxidativa (Rucker et al., 2009). Trata-se de uma molécula versátil, que atua em processos fisiológicos e bioquímicos, tais como na tolerância a estresse oxidativo e na promoção do crescimento vegetal (Misra et al., 2012).

PQQ é uma molécula encontrada exclusivamente em alguns micro-organismos. A associação destes micro-organismos produtores de PQQ com plantas é responsável pela detecção desta molécula em uma variedade de alimentos, tais como batata, banana, tomate e maçã (Kumazawa et al., 1995; Mitchell et al., 1999; Noji et al., 2007). Além disso, PQQ tem sido classificada como uma vitamina do complexo B (Kasahara e Kato, 2003), ainda que esta descrição seja questionada por alguns pesquisadores (Rucker et al., 2005). Em mamíferos, o PQQ participa na regulação do crescimento e diferenciação celular, na proteção das células contra danos oxidativos, atua em mecanismos de transdução de sinais em vários processos biológicos (Misra et al., 2012; Rucker e Chowanadisai, 2009) e reverte efeitos deletérios provenientes do processo de envelhecimento (Chowanadisai et al., 2009).

Em plantas, PQQ atua como uma molécula capaz de promover crescimento vegetal, como resultado de sua atividade antioxidante, da sua participação no processo de solubilização de fosfato, na participação na produção de substâncias antimicrobianas e na sua atuação no controle de patógenos. Choi et al. (2008) demonstraram que PQQ promoveu crescimento de plantas de *Cucumis sativus*, pela defesa de células contra os danos causados por H₂O₂, ratificando seu potencial como molécula antioxidante. Bactérias portadoras de genes da biossíntese completa de PQQ, quando inoculadas em plantas, mostraram atividade na promoção do crescimento vegetal (Ahmed & Shahad, 2010).

A participação de PQQ na solubilização foi identificada em bactérias que utilizam a holoenzima GDH-PQQ para solubilizar tanto fósforo orgânico como inorgânico e assim promover crescimento vegetal (Han et al., 2008). Rizobactérias transformadas com os genes da via de biossíntese de PQQ

também apresentaram fenótipo de solubilização de fosfato mineral (MPS) (Sashidhar e Podile, 2010). Wagh et al. (2014) fizeram a expressão heteróloga de genes da biossíntese de PQQ em *Herbapirillum seropedicae*, sendo, posteriormente, também observado o fenótipo de solubilização de fosfato.

3.2.2.2. Papel dos hormônios no crescimento das plantas

Assim como PQQ atua no crescimento vegetal, existem outras substâncias que também desempenham esse papel, como os hormônios. Fitormônios são compostos químicos produzidos em pequenas quantidades e que têm atividade em baixas concentrações, sendo responsáveis por controlar e regular várias funções relacionadas ao crescimento, metabolismo e reprodução tecido-específico em plantas. Durante muito tempo, eram descritos apenas cinco classes de hormônios em plantas - auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno. Entretanto, outros hormônios foram descobertos posteriormente, como estrigolactonas, brassinosteroides, jasmonatos, ácido salicílico, poliaminas e óxido nítrico (Spaepen, 2015).

As auxinas são envolvidas em muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento, como alongamento do caule e raiz, estimulação da divisão celular, indução do crescimento de raízes laterais e adventícias, atuação na dominância apical, na diferenciação de tecidos vasculares, no gravitropismo e no fototropismo. O hormônio citocinina promove divisão celular e diferenciação de tecidos meristemáticos de caules e raízes, estando envolvido no processo de atraso da senescência, na formação de órgãos, desenvolvimento de raízes e pelos radiculares e na expansão foliar. As giberelinas estão envolvidas em processos de divisão celular e alongamento durante todos os estágios de desenvolvimento das plantas (da germinação da semente até o crescimento dos frutos). Além disso, o balanço com outros hormônios é determinante para o papel das giberelinas. O ácido abscísico (ABA) induz a abertura e o fechamento estomático, o amadurecimento dos frutos e inibe a germinação de sementes. É envolvido também na dormência do embrião e na proteção contra estresses abióticos. O único hormônio gasoso é o etileno (ET), que atua na regulação de processos fisiológicos como a germinação de sementes, expansão celular, senescência e abscisão. Também atua na defesa da planta contra patógenos e em condições de estresses abióticos (Davies, 2010).

Entre os novos hormônios identificados, ácido salicílico, brassinosteroides e jasmonatos têm sido bem caracterizados. O ácido salicílico (SA) participa em diversos processos celulares, como na germinação de sementes, estabilização de plântulas, crescimento de células, respiração, abertura estomática, expressão de genes associados à senescência, termotolerância basal e nodulação em plantas leguminosas (Vlot, Dempsey e Klessig, 2009). Além disso, atua na reação a estresses bióticos e abióticos e ativa sistemas antioxidantes (Bandurska et al., 2013).

Os brassinosteroides regulam o crescimento e desenvolvimento das plantas e desempenham papel essencial nos estágios iniciais de crescimento vegetal, controlando processos como germinação de sementes, estiolamento, crescimento vegetativo, desenvolvimento estomático, florescimento e fertilidade (Clouse, 2011; Zhu et al., 2013).

Ácido jasmônico (JA) e seus derivados modulam aspectos relacionados ao amadurecimento dos frutos, produção de pólen viável, desenvolvimento reprodutivo, crescimento de raiz e na defesa contra insetos e patógenos (Browse, 2009).

3.2.2.3. Hormônios e regulação da resposta imune

Além de serem essenciais durante todo o desenvolvimento vegetal, os fitormônios também estão envolvidos nos processos de defesa vegetal. Quando submetidas a estresses bióticos e abióticos, as plantas sofrem alterações na concentração e sensibilidade hormonais, acionando uma série de respostas de defesa. Dependendo da infecção e do patógeno, a planta é estimulada a sintetizar um ou mais hormônios (Alcázar et al., 2011; De Vos et al., 2005) e esta regulação permite que as plantas rapidamente se adaptem a estresses de uma maneira mais eficiente (Pieterse et al., 2009).

A descoberta inicial da participação dos fitormônios na imunidade vegetal vem de estudos com *A. thaliana* e com tabaco (*Nicotiana tabacum*). Utilizando linhagens mutantes e transgênicas destas plantas, deficientes na biossíntese, percepção ou sinalização de hormônios, foi possível mostrar as graves alterações nos níveis de resistência a patógenos. A partir destes estudos, descobriu-se que patógenos com estilo de vida biotrófico são geralmente sensíveis a respostas de defesa reguladas por SA, enquanto patógenos necrotróficos e insetos herbívoros

são controlados por respostas de defesa desencadeadas por JAs e ET (Glazebrook, 2005; Howe, 2004; Thomma et al., 2001).

O SA é o hormônio mais importante na sinalização de resistência a doenças (Vlot et al., 2009). A biossíntese de SA é desencadeada durante o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes na superfície celular vegetal. Além disso, também ocorre indução da síntese de SA após o reconhecimento de moléculas efetoras patogênicas por proteínas de reconhecimento vegetal (Mishina e Zeier, 2007).

Jasmonatos e seus metabólitos são sintetizados através da via de biossíntese de oxilipina, contra o ataque de patógenos e insetos (Gfeller et al., 2010). Exercem controle direto sobre a produção de compostos químicos de defesa que conferem resistência a diversos organismos associados a vegetais, desde patógenos microbianos até vertebrados herbívoros (Campos et al., 2014). Evidências indicam que a síntese de jasmonatos é controlada a nível pós-transcricional, via ativação de enzimas de biossíntese preexistentes (Wasternack e Hause, 2013).

Diversos estudos mostram que as vias de SA e JA/ET são antagônicas (Koornneef et al., 2008; Mur et al., 2006; Spoel et al., 2007), embora evidências de sinergismo já tenham sido também relatadas em alguns trabalhos, como, por exemplo, um estudo que mostrou que interações entre SA e JA parecem otimizar a resposta imune contra *Pseudomonas syringae* (Spoel et al., 2003). No entanto, na natureza, as plantas são simultânea e sequencialmente atacadas por diferentes patógenos, que têm os mais variados estilos de vida e estratégias de infecção. Assim, o antagonismo entre SA e JA/ET representa um poderoso mecanismo que prioriza uma via sobre a outra, otimizando a resposta de defesa vegetal (Pieterse et al., 2012).

Embora esteja bem caracterizado na literatura que SA, JAs e ET formam o eixo central da resposta imune (Howe, 2004; Loake & Grant, 2007; Pozo et al., 2004; van Loon et al., 1998; von Dahl & Baldwin, 2007), posteriormente descobriu-se que outros hormônios vegetais, como ABA (Asselbergh et al., 2008; Mauch-Mani & Mauch, 2005), auxinas (Navarro et al., 2006; D. Wang et al., 2007), giberelinas (Navarro et al., 2008) e brassinosteroides (Nakashita et al., 2003; Shan et al., 2007), também atuam regulando a resposta imune. A participação

destes hormônios na modulação da resposta de defesa vegetal vem sendo elucidada nos últimos anos, sabendo-se, hoje, que desempenham diversos papéis durante a resposta imune, atuando em conjunto com o eixo SA – JA/ET (Navarro et al., 2008; Pieterse et al., 2009).

A resposta imune vegetal se caracteriza pela abertura de canais de íons na membrana plasmática, acidificação do citoplasma, ativação de quinases, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), produção de fitoalexinas e outras fitotoxinas, lignificação de tecidos, calose e outros reforços da parede celular, ativação de fatores de transcrição e transcrição de genes de defesa (Göhre & Robatzek, 2008; Grant & Lamb, 2006).

Entre as respostas características da ativação do sistema imune vegetal, a produção de EROs tem sido extensivamente estudada nos últimos anos. Em geral, tanto estresses bióticos quanto abióticos induzem aumento da produção destas espécies (Fujita et al., 2006). EROs são redes sinalizadoras, altamente conservadas em organismos aeróbios, que controlam diferentes processos biológicos como crescimento e desenvolvimento (Mittler et al., 2011). EROs têm várias funções na resposta de defesa da planta, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser diretamente tóxico ao patógeno ou ainda estar envolvido com o fortalecimento da parede celular, uma vez que é necessário para a biossíntese de lignina (Torres et al., 2006). Entretanto, o acúmulo de EROs pode se tornar tóxico e por este motivo as células dispõem de mecanismos para detoxificar eficientemente estes radicais, incluindo enzimas antioxidantes que impedem a ação tóxica das EROs sobre as células vegetais. Entre estas enzimas, destacam-se as peroxidases, catalases, superóxido dismutases e glutathionas transferases (Apel & Hirt, 2004).

3.2.2.4. Proteômica

Nos últimos anos, as técnicas de microarray e sequenciamento de transcritos têm sido amplamente utilizadas para caracterizar os transcriptomas de diferentes culturas com os mais diversos objetivos, como, por exemplo, compreender suas respostas moleculares às diversas condições ambientais a que estão expostas (Rensink e Buell, 2005; Varshney et al., 2009). Porém, os dados de expressão gênica isoladamente não são suficientes para mostrar a complexidade das diferentes respostas vegetais. Análises de biologia molecular e

bioinformática têm revelado que os níveis de transcrição observados em alguns organismos nem sempre são correlacionados com o perfil de proteínas encontrados nas amostras estudadas (de Godoy et al., 2008; Ghazalpour et al., 2011). Assim, a identificação e a quantificação de proteínas sob diferentes condições tornam-se um campo de estudo imprescindível para a completa compreensão das respostas vegetais.

O termo proteômica refere-se à descrição das proteínas de um organismo. Trata-se de um conjunto de técnicas que permitem identificar e caracterizar o nível de modulação das proteínas e as modificações em resposta a estímulos externos. Inicialmente, os estudos das proteínas baseavam-se apenas nos resultados de análises de perfis proteicos em eletroforese bidimensional. No entanto, após diversos avanços tecnológicos, principalmente das técnicas de sequenciamento, tem sido possível a identificação do perfil de proteínas através da espectrometria de massas (MS) (Vanderschuren et al., 2013). As vantagens desta técnica em relação às tradicionais no estudo de proteínas incluem uma ampla cobertura e a possibilidade de caracterizar modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína e formação de complexos proteicos (Baginsky, 2008). Além disso, os dados gerados por espectrometria podem ser confrontados com bancos de dados computacionais que têm milhares de sequências peptídicas e nucleotídicas, passíveis de serem convertidas em sequências de aminoácidos.

As análises proteômicas têm sido utilizadas para verificar a dinâmica das proteínas durante a respostas de plantas a estresses bióticos e abióticos (Vanderschuren et al., 2013). Diversos estudos de proteômica foram conduzidos em plantas de arroz (*Oryza sativa*) e *A. thaliana* para avaliar respostas a estresses abióticos como frio, calor, seca, salinidade, ozônio, hipóxia, anoxia, herbicidas, condições inadequadas de luz, desbalanço na nutrição mineral, metais pesados, radioatividade e ferimentos mecânicos (Kosová et al., 2011). Além disso, estudos da interação planta-patógeno também têm utilizado a proteômica como ferramenta de estudo para avaliar a expressão das proteínas e elucidar as complexas redes de resposta da defesa vegetal (Mukherjee et al., 2010).

Neste cenário, a proteômica tem um importante papel no entendimento acerca dos sistemas biológicos, uma vez que complementa as análises de transcriptômica e metabolômica. Portanto, a proteômica tornou-se uma ferramenta chave nos estudos dos sistemas biológicos, fornecendo informações

quantitativas e estruturais das proteínas, que são as principais moléculas determinantes das funções na célula (Baginsky, 2008).

3.2.2.5. *Arabidopsis thaliana* e seus mutantes para vias hormonais

A *Arabidopsis thaliana* tem sido utilizada como um sistema modelo em estudos de várias áreas da Biologia Vegetal, principalmente pelas características, que são de grande relevância na pesquisa, como o pequeno porte, ciclo de vida curto (5 a 6 semanas), alta fecundidade, genoma sequenciado (apresentando cinco cromossomos), habilidade para crescer em condições controladas e facilidade para geração de linhas mutantes e transgênicas (Page & Grossniklaus, 2002). Tais características são fundamentais nos estudos de genética, biologia molecular e desenvolvimento vegetal, fornecendo informações sobre ação hormonal e vias de sinalização em resposta a condições ambientais (Koornneef & Meinke, 2010).

A utilização de *A. thaliana* como modelo de estudo em genética molecular permitiu um avanço na área de obtenção de mutantes e transgênicos para diferentes processos biológicos, como, por exemplo, para as vias hormonais. A abordagem de pesquisa que utiliza mutantes hormonais é uma ferramenta de grande importância na elucidação dos diferentes mecanismos envolvidos na biossíntese e ação dos hormônios em plantas.

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de *A. thaliana* (COL-0), do transgênico *NahG*, bem como dos demais mutantes utilizados (*abi4*, *aux1.7*, *ein2.1*, *ein3.1*, *npr1*, *eds1* e *sid 2.2*) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Frederick Ausubel (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). As sementes foram submetidas à desinfestação superficial em etanol 95% durante 1 min, seguida de solução de hipoclorito de sódio 50%, sob agitação, por 10 min. O excesso desses reagentes foi removido

mediante seis lavagens em água ultra-pura estéril. As sementes permaneceram imersas em água durante 48 h sob temperatura de 4 °C, antes da semeadura.

3.2.3.2. Curva com PQQ sintético

Após o período de quebra de dormência, as sementes foram germinadas em placas de seis poços em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) meia força, com sacarose 0.5% e tampão MÊS 0.05%, acrescido dos diferentes valores da curva de PQQ sintético (Marca Sigma), de 0, 1000, 2000, 3000, 4000 ou 5000 nM. As placas foram mantidas sob temperatura de 23 °C, 60% de umidade relativa, 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de energia luminosa, com fotoperíodo de 12/12h. Após 12 dias, foi feita a avaliação das plantas. Os parâmetros analisados foram: comprimento da raiz principal, com auxílio de um paquímetro; número de raízes laterais; e massa fresca de planta inteira, utilizando balança analítica.

3.2.3.3. Confirmação da promoção do crescimento de Col-0 com PQQ sintético

Após identificação, foi feito o ensaio de confirmação da concentração de PQQ sintético, que apresentou efeito de promoção do crescimento em *A. thaliana*. Posteriormente, foi feito o ensaio de promoção com os mutantes de (*abi4*, *aux 1.7*, *ein2.1*, *ein3.1*, *npr1*, *eds1* e *sid 2.2*) e com o transgênico *NahG*. Todos os ensaios foram feitos nas mesmas condições descritas para a curva de PQQ, utilizando as concentrações de PQQ sintético (Marca Sigma) de 0, 3000nM.

3.2.3.4. Análise proteômica

3.2.3.4.1. Extração de proteínas totais

Para as análises das proteínas diferencialmente reguladas por PQQ, foi feita a extração em três amostras controle e em três amostras tratadas com 3000 nM de PQQ, cada amostra composta por três plântulas de *A. thaliana* de 12 dias. Seguiu-se a metodologia descrita por Balbuena et al.(2011) para a extração das proteínas totais dos tecidos. As amostras foram maceradas em microtubos de 1,5mL, usando pistilo contendo 1mL de tampão de extração TCA/Acetona (TCA

10% em acetona com 20mM de dithiothreitol -DTT). Em seguida, foram incubadas por 60 minutos a -20°C e, posteriormente, centrifugadas a 12.000g, a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com acetona gelada contendo 20mM de DTT. Após nova centrifugação a 12.000g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet secou à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Os pellets foram então ressuspensos em 0,5mL de tampão ureia/tiourea (7M ureia, 2M tiourea, 1% DTT, 2% triton-100, 0,5% pharmalyte, 1mM de phenylmethanesulfonylfluoride - PMSF) e mantidos sob agitação até completa homogeneização das amostras. As amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 5 minutos, a 4°C, e o sobrenadante proveniente desta centrifugação foi coletado e armazenado a -20°C.

3.2.3.4.2. Quantificação do conteúdo de proteínas totais

Para a quantificação das proteínas totais das amostras, utilizamos 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.

3.2.3.4.3. Digestão das proteínas

Antes da etapa de digestão com tripsina, as amostras foram precipitadas com metanol e clorofórmio. Para tal, inicialmente o volume das amostras foi ajustado para 100 µL, adicionado de 400 µL de metanol e então as amostras foram vortexadas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de clorofórmio, e as amostras, novamente vortexadas. Para separação das fases, 300 µL de água foram adicionados a cada amostra. Posteriormente, foi feita uma centrifugação a 14000 rpm durante 10 minutos. A fase superior foi descartada e adicionados 300 µL de metanol. Uma nova centrifugação foi feita, e o sobrenadante foi descartado. O pellet secou a temperatura ambiente.

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 minutos em um EppendorfThermomixer® 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 agitaço. Adicionaram-se 2,5 mL de iodoacetamida 300 mM, seguido de agitaço e incubação no escuro durante 30 min a temperatura ambiente. A digestão foi feita pela adição de 20 µL de solução de tripsina (50 ng mL⁻¹) (V5111, Promega, Madison, WI, EUA) preparada em bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram incubadas a 37°C *overnight*. Em seguida, para a precipitação do RapiGest®, 10 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) foram adicionados e incubados a 37°C durante 90 min, seguido por um passo de centrifugaço de 30 min a 15000 g. As amostras foram transferidas para tubos "Total Recovery Vials" (Waters).

3.2.3.4.4. 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 acoplado 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 MassLinx 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 com o coeficiente de variação e o nível de expressão, sendo então selecionadas as proteínas que apresentaram um coeficiente de variação abaixo de 0,5 e uma diferença de no mínimo 1,5 vezes na expressão. As proteínas selecionadas foram então submetidas à caracterização funcional, utilizando o programa Blast2Go (www.blast2go.com), e as proteínas diferencialmente expressas relacionadas a estresses bióticos foram visualizadas, utilizando o programa MapMan(Thimm et al., 2004).

3.2.3.5. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram testados pela análise de variância (ANOVA). O teste Scott-Knott foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos ao nível de 1% de significância, utilizando o software Genes (versão 2013.5.1) (Cruz, 2013).

3.2.4. RESULTADOS

3.2.4.1. Promoção do crescimento de *A. thaliana* por PQQ sintético

Para verificar se PQQ sintético promove crescimento de *A. thaliana*, plântulas do ecótipo COL-0 foram testadas na presença de diferentes concentrações de PQQ, adicionado desde o início da germinação, em meio líquido.

Após 12 dias de cultivo, foram feitas análises de massa fresca total de todos os tratamentos. Foi observado que as concentrações de 1000 e 2000nM não induziram efeito no crescimento das plantas (Figura 1). A promoção do crescimento foi observada em plantas de *A. thaliana* na presença de concentrações de 3000, 4000 e 5000 nM de PQQ sintético, que forneceram respostas semelhantes (Figura 1). Diante dos resultados obtidos, a concentração escolhida para os ensaios subsequentes foi de 3000nM.

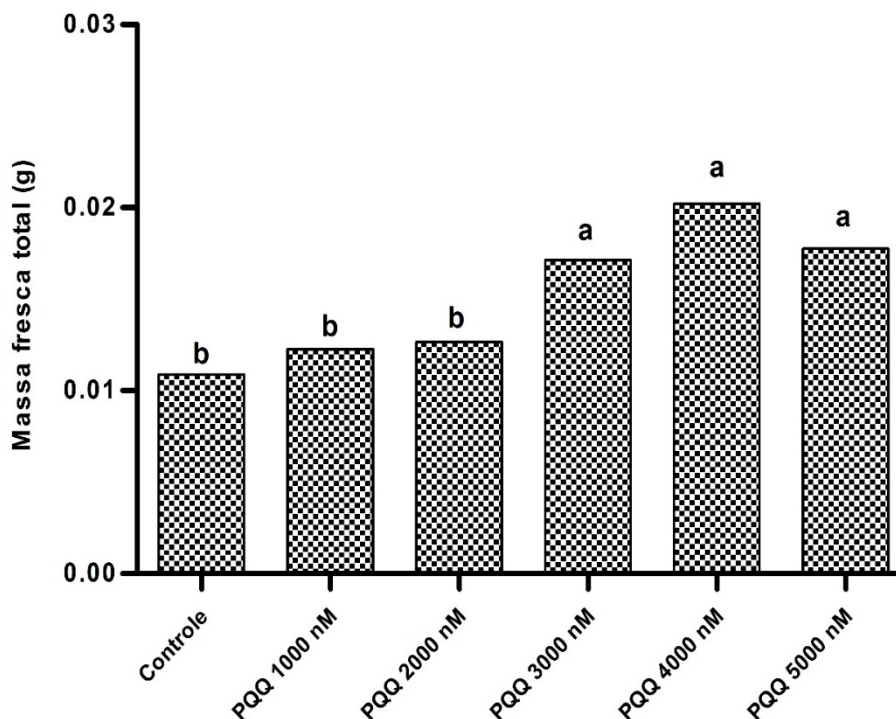


Figura 1 - Efeito de diferentes concentrações de PQQ sintético no crescimento de plantas de *A. thaliana*, ecótipo COL-0. Massa fresca total de plântulas de COL-0 crescidas durante 12 dias em contato com 0, 1000, 2000, 3000, 4000 ou 5000 nM de PQQ sintético.

3.2.4.2. Efeito do PQQ sobre o comprimento da raiz principal, número de raízes laterais e massa fresca total

O efeito do PQQ sobre a massa fresca total, comprimento de raiz principal e número de raízes laterais de plântulas de *A. thaliana* foi avaliado após 12 dias de cultivo *in vitro*.

Não foram observadas diferenças entre o controle e o tratamento com PQQ para os parâmetros comprimento de raiz principal e número de raízes laterais (Figura 2). Porém, a presença da molécula PQQ no meio de cultura promoveu um acréscimo de massa fresca total de 37% nas plantas tratadas quando comparadas às plantas controle (Figura 2), confirmando ser esta molécula promotora de crescimento vegetal em *A. thaliana*.

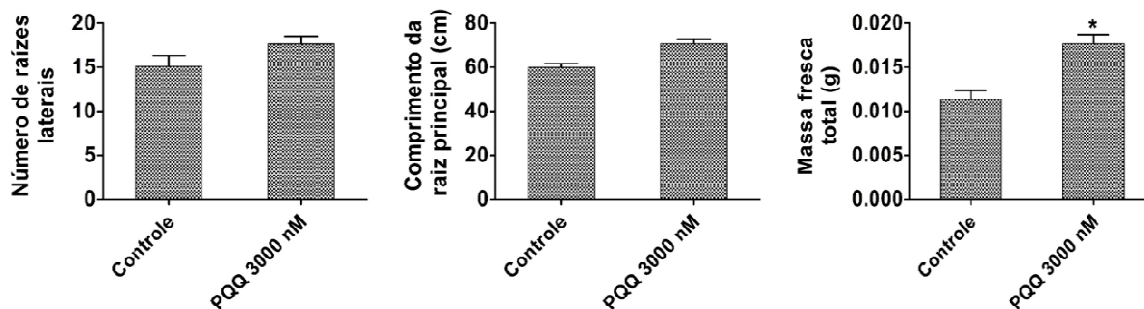


Figura 2 - Efeito de PQQ sintético em diferentes parâmetros de crescimento de plantas de *A. thaliana*, ecótipo COL-0. Comprimento da raiz principal (A), número de raízes laterais (B) e massa fresca total (C) de plântulas de Col-0 crescidas durante 12 dias em contato com 3000nM de PQQ sintético.

3.2.4.3. Análise Proteômica

Visando a caracterizar o perfil de proteínas reguladas em plântulas de *A. thaliana* expostas a PQQ, foram conduzidas análises de proteômica comparativa através de espectrometria de massas. Para estas análises, foi feita extração de proteínas de plântulas cultivadas por 12 dias na presença de 3000nM de PQQ sintético. Foram consideradas diferencialmente expressas as proteínas que apresentaram níveis de indução ou de repressão maiores ou iguais a 1,5 vezes em relação às plantas controle. Foram identificadas 1175 proteínas totais, destas 375 foram diferencialmente reguladas por PQQ, sendo 193 reprimidas e 182 induzidas.

As proteínas diferencialmente expressas foram submetidas à análise funcional, utilizando a plataforma Blast2Go. As proteínas foram classificadas de acordo com o processo biológico do qual participam, podendo uma mesma proteína participar de mais de um processo. Verificou-se semelhança nos processos celulares induzidos e reprimidos, com diferenças apenas na porcentagem de regulação. Os principais processos regulados, com regulação acima de 60%, foram: processos biossintéticos, de metabólicos celulares, primários e de substâncias orgânicas, metabólicos de compostos de nitrogênio e em resposta a estresse (Figuras 3 e 4).

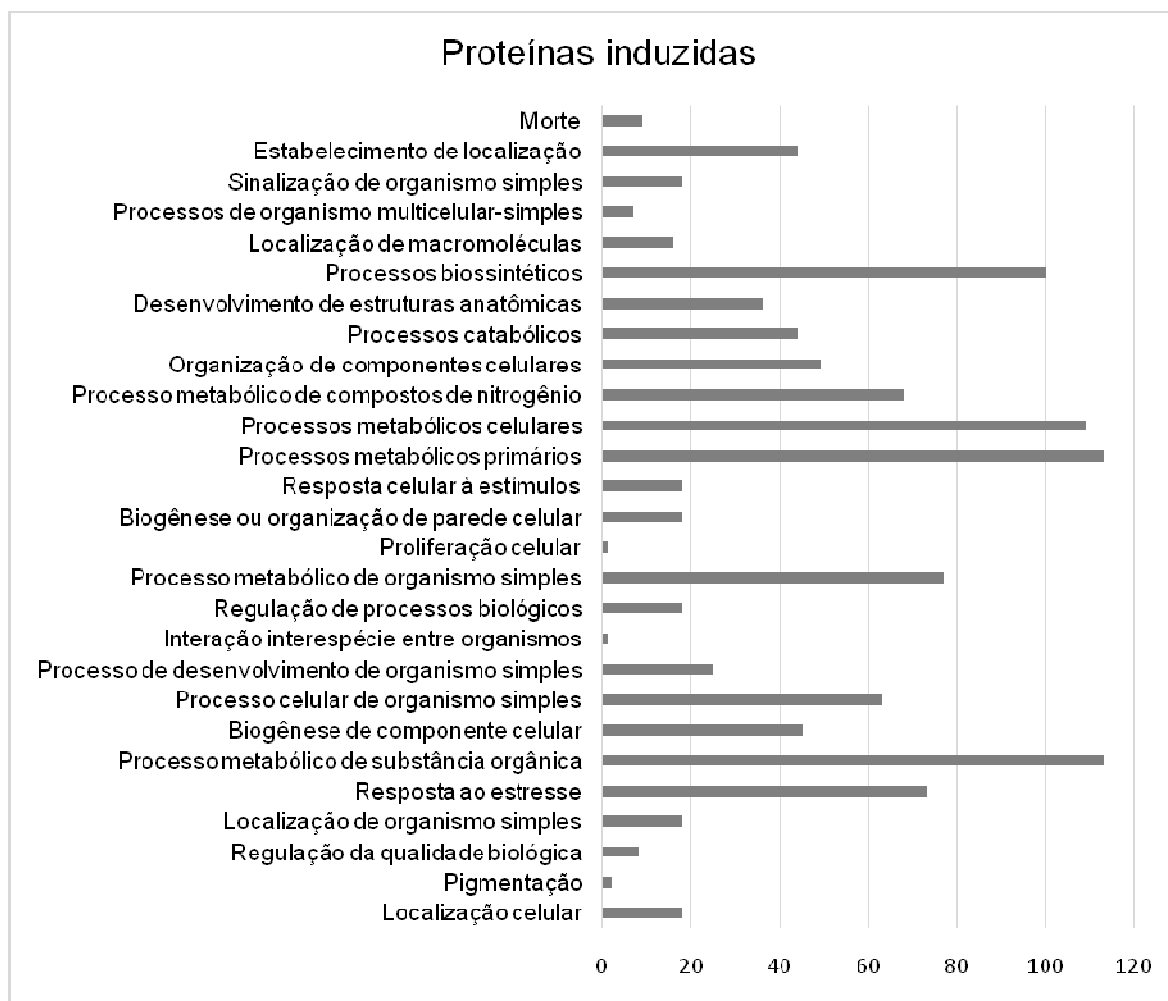


Figura 3 - Classificação funcional das proteínas induzidas por PQQ em *Arabidopsis thaliana*. Anotação funcional das proteínas classificadas como induzidas em plântulas de COL-0, crescidas durante 12 dias, em contato com 3000nM de PQQ sintético, em comparação com as plantas controle.



Figura 4 - Classificação funcional das proteínas reprimidas por PQQ em *Arabidopsis thaliana*. Anotação funcional das proteínas classificadas como reprimidas em plântulas de COL-0, crescidas durante 12 dias, em contato com 3000nM de PQQ sintético, em comparação com as plantas controle.

Ao avaliar os dados de proteômica através do software MapMan, para vias relacionadas aos processos metabólicos em geral, foi demonstrada a regulação de proteínas relacionadas a diferentes processos celulares. Foram identificadas 24 proteínas relacionadas ao ciclo de Calvin, das quais 19 foram reprimidas. Entre as proteínas identificadas, estão as ribuloses e frutose bifosfato. Nas vias de fotorrespiração, das 11 proteínas identificadas, somente duas foram induzidas. Ao analisar as proteínas de parede celular, foram encontradas 14 proteínas induzidas (Figura 5).

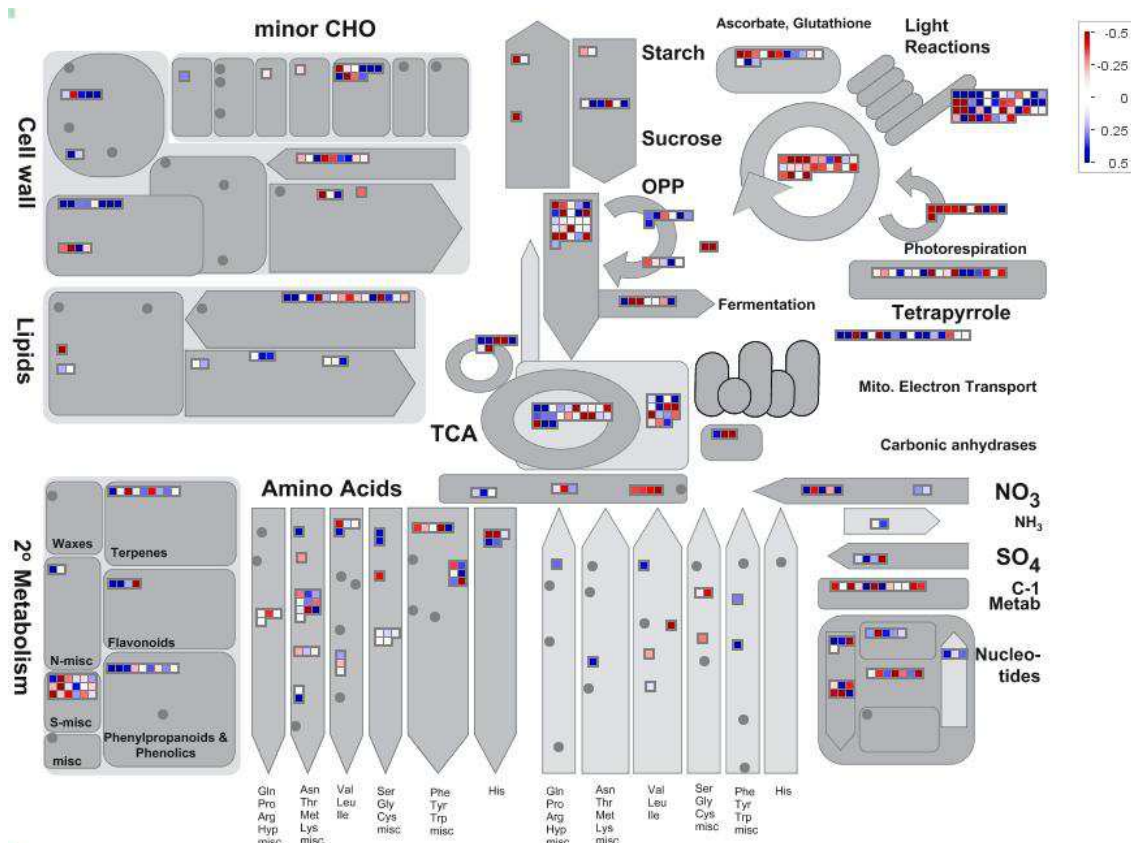


Figura 5 - MapMan das proteínas diferencialmente reguladas por PQQ relacionadas à metabolismo. MapMan “metabolism overview” das proteínas diferencialmente expressas em plântulas de 12 dias de *A. thaliana* Col-0 tratadas com 3000 nM por 12 dias. Proteínas induzidas são indicadas em azul e reprimidas, em vermelho.

Ao analisar os dados de Mapman para categorização por estresse biótico, verifica-se relação entre crescimento vegetal e defesa das plantas, com indução das proteínas relacionadas aos hormônios de crescimento e a repressão de proteínas de defesa. Interessantemente, oito proteínas Glutathione-S-transferases foram identificadas. Destas proteínas, sete apresentaram repressão pela adição da molécula PQQ. Proteínas de sinalização e as relacionadas a estresse abiótico apresentaram padrões de indução e repressão, não sendo observada resposta definida. Foram identificadas 38 proteínas relacionadas ao estado redox, sendo 15 induzidas. Entre as proteínas envolvidas com estresse oxidativo, encontramos oxirredutases, catalases, glutathionas, peroxidases, superóxido dismutase e redutases.

Quanto às vias hormonais, observou-se indução de cinco proteínas relacionados à auxina, uma para ABA, seis para ácido jasmônico e, para etileno,

duas proteínas apresentaram forte repressão, sendo uma ACC sintase e a outra da família de estresse universal. Foram identificadas quatro proteínas PR, sendo uma proteína LRR relacionada à resistência a doenças, uma com função desconhecida, enquanto duas ATPases foram reprimidas. Das onze proteínas peroxidases identificadas, seis foram induzidas e cinco, reprimidas.

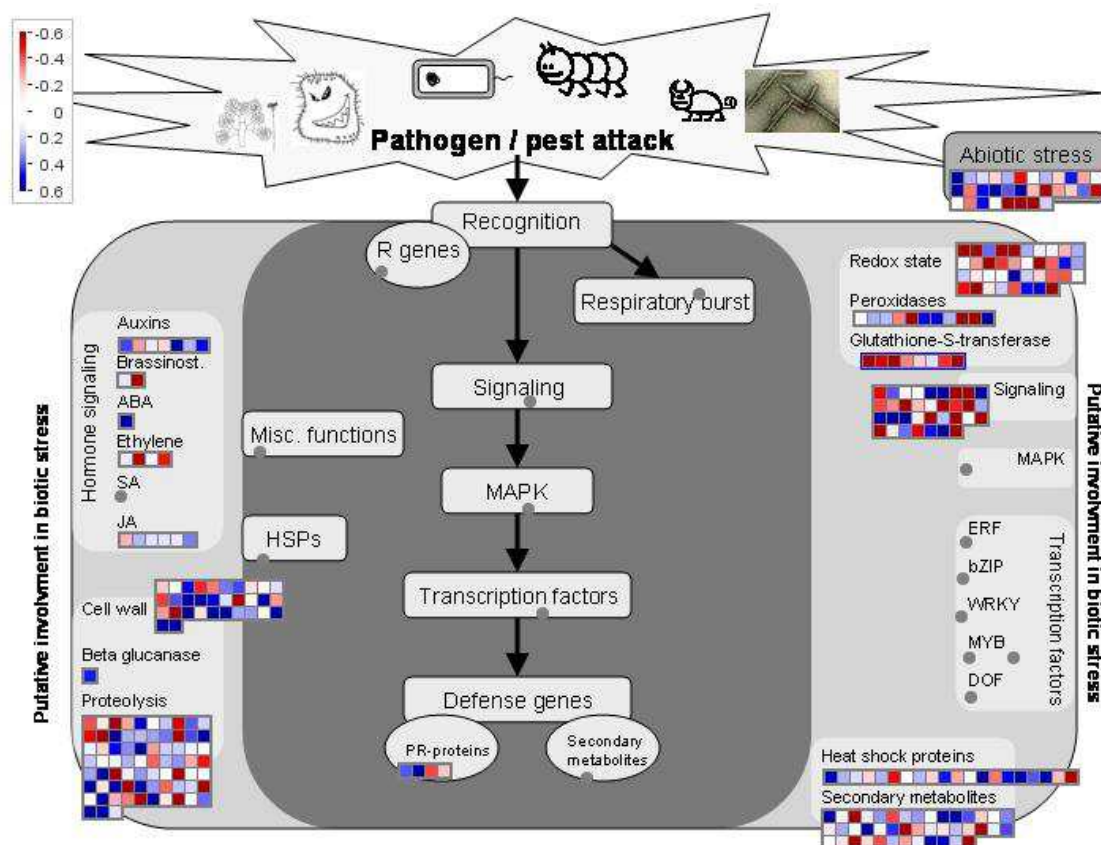


Figura 6 - MapMan das proteínas diferencialmente reguladas por PQQ envolvidas na resposta a estresses bióticos. MapMan “biotic stress” das proteínas diferencialmente expressas em plântulas de 12 dias de *A. thaliana* Col-0 tratadas com 3000 nM por 12 dias. Proteínas induzidas são indicadas em azul e reprimidas, em vermelho.

3.2.4.4. Participação das vias hormonais na resposta de *A. thaliana* ao PQQ

A promoção do crescimento de *A. thaliana* (COL-0) foi induzida pela concentração de 3000nM de PQQ. Neste contexto, avaliou-se a importância de vias hormonais no processo de promoção do crescimento, através de ensaios de

promoção do crescimento induzida por PQQ, em diferentes mutantes de *A. thaliana* afetados em diferentes vias hormonais.

Ao analisar a massa fresca total, observou-se que os mutantes *aux1.7*, *abi4*, *ein2.5* e o transgênico *NahG*, tratados com PQQ, apresentaram maior massa fresca total quando comparados ao tratamento controle. Os ganhos no peso foram de 36,2%, 27%, 43,3%, 14,6% e 14,5% respectivamente. Foi observado que as plantas mutantes apresentaram maior crescimento quando comparadas ao ecótipo COL-0. Interessantemente, os mutantes *eds-1*, *npr1* e *sid2.2*, todos da via do ácido salicílico, e o mutante *ein3-1*, da via do etileno, não apresentaram diferença no parâmetro de massa fresca total, sugerindo que a via desses hormônios é importante para a promoção do crescimento em resposta ao PQQ em *A. thaliana* (Figura 7).

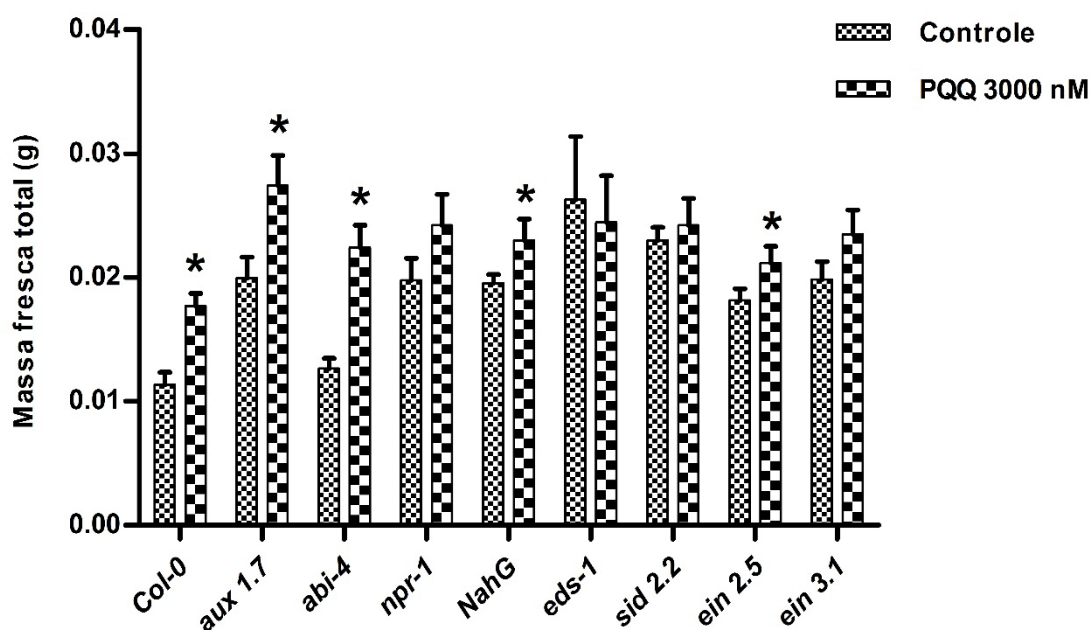


Figura 7 - Análise do efeito de PQQ sintético na massa fresca total de plantas de *A. thaliana*, ecótipo COL-0 e mutantes hormonais. A molécula PQQ, na concentração de 3000 nM, foi adicionada ao meio MS e, após 12 dias, avaliada a massa fresca total.

Para o parâmetro comprimento de raiz, foram observadas diferenças nos mutantes *aux1.7* e *abi4*, em que a adição da molécula PQQ promoveu maior

crescimento da raiz principal. Já para os mutantes *NahG* e *npr1*, o efeito foi contrário, tendo ocorrido inibição do crescimento radicular na presença da molécula (Figura 8).

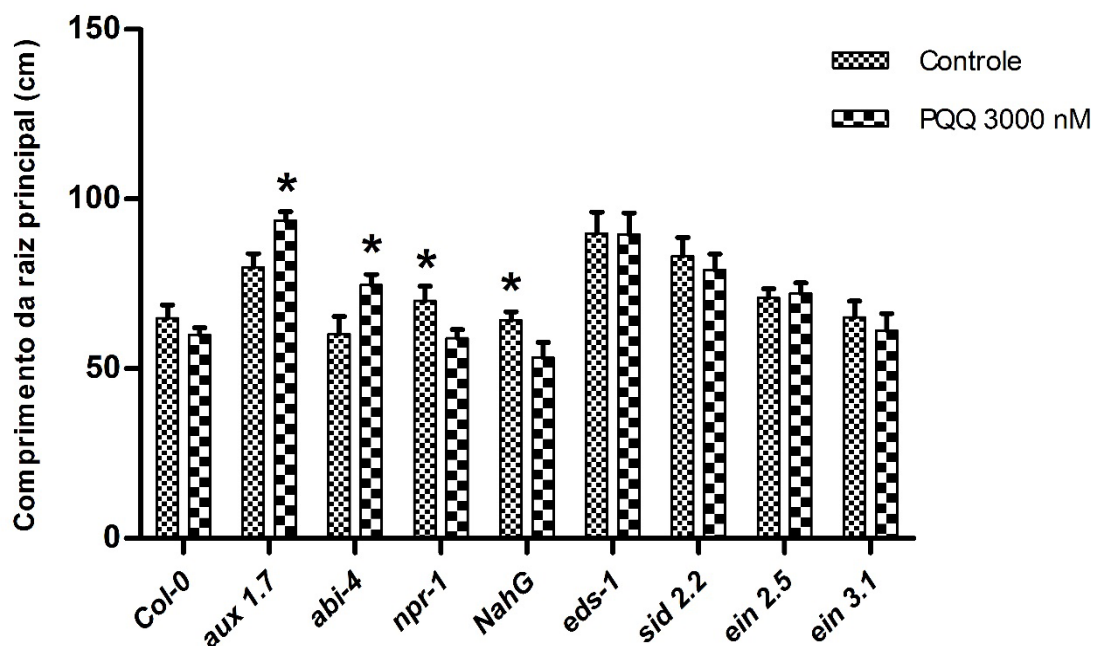


Figura 8 - Análise do efeito de PQQ sintético no comprimento de raiz principal em plantas de *A. thaliana*, ecótipo COL-0 e mutantes hormonais. A molécula PQQ, na concentração de 3000nM, foi adicionada ao meio MS e, após 12 dias, foi avaliado o comprimento da raiz principal.

Para o parâmetro “número de raízes laterais”, a maioria dos mutantes não apresentou diferenças em relação à planta selvagem COL-0. Entretanto, para o mutante *abi4* e o transgênico *NahG*, houve resposta distinta, com maior número de raízes laterais na presença de PQQ sintético (Figura 9).

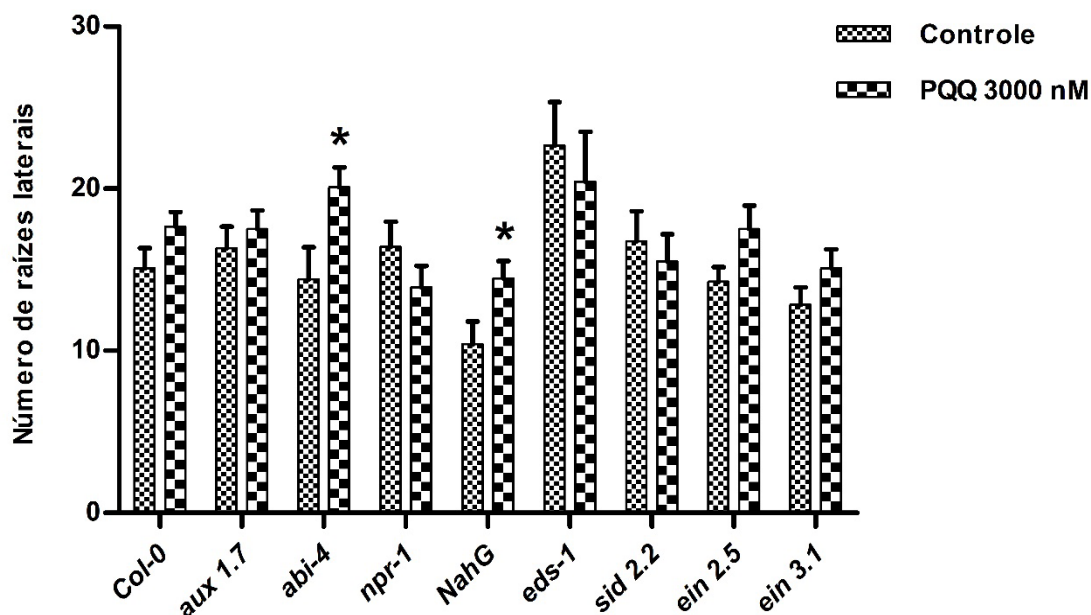


Figura 9 - Análise do efeito de PQQ sintético no número de raízes laterais em plantas de *A. thaliana*, ecótipo COL-0 e mutantes hormonais. A molécula PQQ, na concentração de 3000nM, foi adicionada ao meio MS e, após 12 dias, foi avaliado o número de raízes laterais.

3.2.5. DISCUSSÃO

A importância da molécula PQQ tem sido estudada nos últimos anos, uma vez que ela participa de vários processos em animais, vegetais e humanos (Misra et al., 2012). A principal característica desta molécula é seu efeito antioxidante (Singh et al., 2015). Seu papel como molécula promotora do crescimento vegetal já foi descrito em pepino, tomate e feijão (Choi et al., 2008; Ahmed e Shahab, 2010). Porém, ainda não se sabe qual mecanismo de ação da molécula e responsável por tal efeito.

Acredita-se que a atividade antioxidante da molécula PQQ seja essencial para promoção do crescimento vegetal. Foi verificado em folhas de pepino que o tratamento com PQQ sintético foi efetivo na eliminação de peróxido de hidrogênio (Choi et al., 2008). PQQ é, pelo menos, 100 vezes mais eficiente na capacidade redox quando comparado ao ácido ascórbico, isoflavonoides e compostos fenólicos (Stites et al., 2000). Outro importante processo no qual PQQ atua, que

pode estar envolvido na promoção do crescimento, é a solubilização de fosfato. Esta molécula já foi descrita como participante do processo de solubilização de fósforo em solos (Wagh et al., 2014), além de agir como cofator da enzima GDH-desidrogenase em algumas espécies bacterianas. Tal enzima é responsável pela conversão de glicose a ácido glucônico no espaço periplasmático destes microorganismos, levando a uma diminuição do pH do ambiente em que vivem, favorecendo, assim, a solubilização de nutrientes (Han et al., 2008).

No presente estudo, foi mostrado que PQQ promove crescimento de plantas de *A. thaliana* (COL-0). As análises de classificação funcional das proteínas reguladas por PQQ mostram que esta molécula participa de diferentes processos na célula, como resposta a estresses, processos metabólicos e biossintéticos.

Para estudar o envolvimento de PQQ no metabolismo celular bem como na resposta da planta a estresses, os dados obtidos foram carregados no software MapMan, tendo sido gerados os diagramas das proteínas envolvidas com estresse biótico e visão geral do metabolismo. É importante ressaltar que, apesar de o MapMan ser comumente utilizado para visualizar dados de transcriptômica e sequenciamento, é perfeitamente possível utilizar este software para visualizar dados oriundos de proteômica. Neste sentido, nosso trabalho é o primeiro a utilizar tal abordagem para analisar as proteínas identificadas em um estudo. As análises de Mapman confirmam os dados de classificação funcional, mostrando que o PQQ atua induzido e reprimindo proteínas relacionadas a diferentes processos, com ênfase nas vias relacionadas à resposta a estresse oxidativo.

Estas análises também permitiram identificar que proteínas glutationa-S-transferases foram reprimidas pela presença da molécula PQQ. Plantas de *A. thaliana* têm 55 glutationa-S-transferases solúveis (Dixon e Edwards, 2010). Esta proteína é identificada na família de proteínas que atuam na detoxificação celular envolvida na tolerância a estresse. Adicionalmente, tais proteínas atuam metabolizando vários compostos exógenos tóxicos (xenobióticos) pela conjugação com glutationa redutase (Xu et al., 2015). Possivelmente, PQQ atenua a ação dessas proteínas, pela sua atuação em processos antioxidantes. Tal fenômeno explica a redução na abundância das proteínas envolvidas com processos redox e também das peroxidases.

As peroxidases são proteínas antioxidantes, que protegem as células contra peroxidação de muitos compostos (Matamoros et al., 2015). Assim como no nosso estudo, análises de proteômica permitiram identificar peroxidases tipo III em plantas de *A. thaliana* e mostraram que sua expressão é altamente específica (Francoz et al., 2015).

Nossas análises proteômicas revelaram também que PQQ reprimiu proteínas relacionadas ao ciclo de Calvin e à fotorrespiração. Liu et al. (2015), utilizando análises de transcriptômica e proteômica em plantas de trigo sob estresse, observaram que sistemas antioxidantes regulam genes relacionados à taxa fotossintética e ao transporte de elétrons. Além disso, as análises proteômicas revelaram que proteínas relacionadas à defesa contra estresse oxidativo, à síntese de ATP e à fotossíntese foram igualmente moduladas pelo estresse causado pelo frio. A repressão das proteínas relacionadas ao ciclo de Calvin e à fotorrespiração, possivelmente, está relacionada à característica antioxidante de PQQ. Estes processos metabólicos são potenciais produtores de EROs para o ambiente celular.

Já foi demonstrado que moléculas oxidantes, como H_2O_2 , aumentam significativamente as taxas fotossintéticas, a concentração de carbono interno, a condutância estomática e o conteúdo de clorofila (Khan et al., 2015). Possivelmente, devido à sua característica antioxidante, PQQ desempenha efeito antagônico nestes processos.

Foi observado que a molécula PQQ induz a expressão de proteínas relacionadas às vias hormonais. Ao analisar o efeito de PQQ sintético nos diferentes mutantes de *A. thaliana*, foi revelado que mutantes para a via de ácido salicílico não apresentaram fenótipo de crescimento induzido por PQQ, sugerindo que este hormônio regula a ação de PQQ. O ácido salicílico participa na regulação de processos biológicos em plantas, incluindo defesa (Kumar et al., 2015), além de atuar no estabelecimento da resistência sistêmica adquirida (Gao et al., 2015). Já foi verificado que este hormônio aumentou a atividade de diferentes enzimas antioxidantes em trigo (Wang et al., 2014). Além disso, o tratamento pós-colheita com ácido salicílico aumentou o potencial antioxidante de frutos de cereja (Dokhanieh et al., 2013). Tal fato sugere que, no presente estudo, a mutação na via de produção de ácido salicílico afeta a performance de PQQ, por isso não foi observado efeito desta molécula em tais mutantes.

A análise do efeito de mutações em vias hormonais na resposta da planta ao tratamento com PQQ revelou a importante participação das vias de produção de ácido salicílico na ação desta molécula. O efeito de PQQ na promoção do crescimento foi abolido nos mutantes defectivos *eds1* e *sid2.2* para a produção de ácido salicílico. Tal dado sugere que a ação de PQQ decorre do desligamento de parte da resposta de defesa ativada por SA. Nos mutantes em que tal via se encontra desligada, o PQQ foi inefetivo. Tal dado corrobora os dados de proteômica, que revelaram desligamento da resposta a estresse oxidativo em plantas tratadas. Cabe ressaltar que as vias de resposta a ácido salicílico também incluem as vias de resposta a estresse oxidativo.

Portanto, os dados obtidos neste estudo confirmam o papel de PQQ como molécula promotora do crescimento vegetal. Análises proteômicas revelaram a regulação de vias específicas, com ênfase nas proteínas de defesa oxidativa. Estudos com mutantes de *A. thaliana*, defectivos para vias hormonais, revelaram participação do ácido salicílico na resposta a PQQ, em sintonia com os dados de análises proteômicas.

3.2.6. CONCLUSÕES

- ✓ PQQ atua como molécula promotora do crescimento vegetal em plantas de *A. thaliana* Col-0.
- ✓ PQQ regula processos celulares envolvidos na resposta ao estresse, nos processos biossintéticos e metabólicos primários.
- ✓ Proteínas de resposta ao estresse oxidativo são reprimidas pela adição da molécula PQQ em plantas de *A. thaliana*.
- ✓ Proteínas de resposta à vias hormonais são reprimidas pela adição da molécula PQQ em plantas de *A. thaliana*.
- ✓ A molécula PQQ reprime proteínas de resposta ao ciclo de Calvin e fotorrespiração quando adicionada a plântulas de *A. thaliana*.

- ✓ A via de ácido salicílico participa da regulação da resposta ao PQQ em plantas de *A. thaliana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, N. & Shahad, S. (2010). Involvement of Bacterial Pyrroloquinoline in Plant Growth Promotion: A Novel Discovery. *World Applied Sciences Journal*8: 57–61.
- Alcázar, R., Reymond, M., Schmitz, G. & de Meaux, J. (2011). Genetic and evolutionary perspectives on the interplay between plant immunity and development. *Current opinion in plant biology*14(4): 378–84.
- Alquéres, S.M.C., Oliveira, J.H.M., Nogueira, E.M., Guedes, H. V, Oliveira, P.L., Câmara, F., ... Martins, O.B. (2010). Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Archives of microbiology*192(10): 835–41.
- Andreeva, I.G., Golubeva, L.I., Kuvaeva, T.M., Gak, E.R., Katashkina, J.I. & Mashko, S. V. (2011). Identification of Pantoea ananatis gene encoding membrane pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent glucose dehydrogenase and pqqABCDEF operon essential for PQQ biosynthesis. *FEMS microbiology letters*318(1): 55–60.
- Anitha, K.G. & Thangaraju, M. (2010). Growth promotion of rice seedlings by *Gluconacetobacter diazotrophicus* under in vitro conditions. *Journal of Cell & Plant Sciences*1(1): 6–12.

- Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*55: 373–99.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D. & Höfte, M. (2008). Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*21(6): 709–19.
- Bacon, C.W., Palencia, E.R. & Hinton, D.M. (2015). Abiotic and biotic plant stress-tolerant and beneficial secondary metabolites produced by endophytic *Bacillus* species. In *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* (163–177). Athens: USDA.
- Baginsky, S. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass spectrometry reviews*28(1): 93–120.
- Balbuena, T., Jo, L., Pieruzzi, F. & Dias, L. (2011). Differential proteome analysis of mature and germinated embryos of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*72: 302–311.
- Baldani, J., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goe, S.R. & Döbereiner, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*29(5-6): 911–922.
- Baldani, J.I. & Baldani, V.L.D. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in gramminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*77: 549–579.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L. & Dobereiner, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*36(1): 86–93.
- Bandurska, H., Niedziela, J. & Chadzinikolau, T. (2013). Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*213: 98–105.

- Barassi, C.A., Ayrault, G., Creus, C.M., Sueldo, R.J. & Sobrero, M.T. (2006). Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae*109(1): 8–14.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V. & Baraldi, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*24(1): 7–11.
- Bertalan, M., Albano, R., de Pádua, V., Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., ... Ferreira, P.C.G. (2009). Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC genomics*10: 450.
- Blanco, Y., Blanch, M., Piñón, D., Legaz, M.-E. & Vicente, C. (2005). Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *Journal of bioscience and bioengineering*99(4): 366–371.
- Boniolo, F.S., Rodrigues, R.C., Delatorre, E.O., da Silveira, M.M., Flores, V.M.Q. & Berbert-Molina, M.A. (2009). Glycine betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. *Current microbiology*59(6): 593–599.
- Bruijn, F.J. De. (2015). Biological Nitrogen Fixation. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (215–224). Castanet-Tilosan Cedex: Springer International Publishing.
- Çakmakçı, R., Erat, M., Erdoğan, Ü. & Dönmez, M.F. (2007). The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*170(2): 288–295.
- Calderan-Rodrigues, M.J., Jamet, E., Bonassi, M.B.C.R., Guidetti-Gonzalez, S., Begossi, A.C., Setem, L.V., ... Labate, C.A. (2014). Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. *Proteomics*14(6): 738–49.

- Campos, M.L., Kang, J.-H. & Howe, G.A. (2014). Jasmonate-triggered plant immunity. *Journal of chemical ecology*40(7): 657–75.
- Carneiro, J.M.T., Madrid, K.C., Maciel, B.C.M. & Arruda, M.A.Z. (2015). *Arabidopsis thaliana* and omics approaches: a review. *Journal of Integrated OMICS*5(1): 1–16.
- Castillo, P., Molina, R., Andrade, A., Vigliocco, A., Alemano, S. & Cassán, F.D. (2015). Handbook for *Azospirillum*. *Springer International Publishing* 115–138.
- Cavalcante, V. a & Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*108(1): 23–31.
- Cheng, X., Voort, M. Van Der & Raaijmakers, J.M. (2015). Gac-mediated changes in pyrroloquinoline quinone biosynthesis enhance the antimicrobial activity of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 7: 139–147.
- Choi, O., Kim, J., Kim, J.-G., Jeong, Y., Moon, J.S., Park, C.S. & Hwang, I. (2008). Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. *Plant physiology*146(2): 657–68.
- Choudhary, D.K., Kasotia, A., Jain, S., Vaishnav, A., Kumari, S., Sharma, K.P. & Varma, A. (2015). Bacterial-Mediated Tolerance and Resistance to Plants Under Abiotic and Biotic Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation* 1–25.
- Chowanadisai, W., Bauerly, K.A., Tchapanian, E., Wong, A., Cortopassi, G.A. & Rucker, R.B. (2010). Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1alpha expression. *The Journal of biological chemistry*285(1): 142–52.
- Chung, E.J., Hossain, M.T., Khan, A., Kim, K.H., Jeon, C.O. & Chung, Y.R. (2015). *Bacillus oryzicola* sp. nov., an Endophytic Bacterium Isolated from the Roots of Rice with Antimicrobial, Plant Growth Promoting, and Systemic Resistance Inducing Activities in Rice. *The plant pathology journal*31(2): 152–64.

- Clouse, S.D. (2011). Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant cell*23(4): 1219–1230.
- Cocking, E.C., Stone, P.J. & Davey, M.R. (2006). Intracellular colonization of roots of Arabidopsis and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*42(1): 74–82.
- Cohen, A.C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F.J., Moreno, D., Boccanlandro, H., ... Piccoli, P.N. (2015). *brasiliense* ameliorates the response of Arabidopsis thaliana to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia plantarum*153(1): 79–90.
- Cojho, E.H., Reis, V.M., Schenberg, A.C.G. & Dobereiner, J. (1993). Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an Amylolytic Yeast in Nitrogen-Free Batch Culture. *FEMS Microbiology Letters*106(3): 341–346.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangl, H. & Sessitsch, A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial ecology*62(1): 188–97.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C. & Ait Barka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and environmental microbiology*71(4): 1685–93.
- Costacurta, A., Keijers, V. & Vanderleyden, J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasiliense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular & general genetics* : MGG243(4): 463–472.
- Crespo, J.M., Boiardi, J.L. & Luna, M.F. (2011). Mineral phosphate solubilization activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. *Agricultural Sciences*02(01): 16–22.
- Cruz, C.D. (2013). GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*35: 271–276.

- Davies, P.J. (ed.). (2010). The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In *Plant Hormones* (1–802). Dordrecht: Springer Netherlands.
- De Godoy, L.M.F., Olsen, J. V, Cox, J., Nielsen, M.L., Hubner, N.C., Fröhlich, F., ... Mann, M. (2008). Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature*455(7217): 1251–4.
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., ... Pieterse, C.M.J. (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*18(9): 923–37.
- Demidchik, V. (2014). Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*109: 212–228.
- Dietel, K., Beator, B., Budiharjo, A., Fan, B. & Borriss, R. (2013). Bacterial Traits Involved in Colonization of *Arabidopsis thaliana* Roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *The plant pathology journal*29(1): 59–66.
- Dimkpa, C., Weinand, T. & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment*32(12): 1682–1694.
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatos, A., Büchel, G. & Kothe, E. (2009). Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *Journal of applied microbiology*107(5): 1687–1696.
- Dixon, D.P. & Edwards, R. (2010). Glutathione transferases. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*8: 1–15.
- Döbereiner, J. (1992). Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e Cultura*44(5): 310–313.
- Dobereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. & Brazil, C.N. de P. de A. (1995). *Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas.*

- Dodd, I.C., Jiang, F., Teijeiro, R.G., Belimov, A.A. & Hartung, W. (2009). The rhizosphere bacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 containing ACC deaminase does not increase systemic ABA signaling in maize (*Zea mays* L.). *Plant signaling & behavior*4(6): 519–21.
- Dokhanieh, A.Y., Aghdam, M.S., Fard, J.R. & Hassanpour, H. (2013). Postharvest salicylic acid treatment enhances antioxidant potential of cornelian cherry fruit. *Scientia Horticulturae*154: 31–36.
- Dong, Z., Canny, M.J., McCully, M.E., Roboredo, M.R., Cabadilla, C.F., Ortega, E. & Rodes, R. (1994). A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). *Plant Physiology*105(4): 1139–1147.
- Dugardeyn, J., Vandenbussche, F. & Van Der Straeten, D. (2008). To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *Journal of experimental botany*59(1): 1–16.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D. & Hashem, A. (2015). Pseudomonas induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to Fusarium root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi Journal of Biological Sciences* 1–7.
- Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S., Turan, M. & Sahin, F. (2003). The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu). *Crop and Pasture Science*54(4): 377–380.
- FAO. (2012). FAO Statistical Yearbook 2012: World Food and Agriculture (312-352).
- Feng, X., Yang, R., Zheng, X. & Zhang, F. (2012). Identification of a novel nuclear-localized adenylate kinase 6 from *Arabidopsis thaliana* as an essential stem growth factor. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*61: 180–186.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D.E. & Gresshoff, P.M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology*52(1): 61–76.

- Ferreira, A., Quecine, M.C., Lacava, P.T., Oda, S., Azevedo, J.Lã°. & Araujo, W.L. (2008). Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiology Letters*287(1): 8–14.
- França, M.B., Panek, A.D. & Eleutherio, E.C.A. (2007). Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*146(4): 621–31.
- Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*321(1-2): 35–59.
- Francis, I., Holsters, M. & Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental microbiology*12(1): 1–12.
- Francoz, E., Ranocha, P., Nguyen-Kim, H., Jamet, E., Burlat, V. & Dunand, C. (2015). Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry*112: 15–21.
- Fuentes-Ramirez, L.E., Jimenez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I.R. & Caballero-Mellado, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*154(2): 145–150.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*9(4): 436–42.
- Gaiero, J.R., McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.J., Best, A.S. & Dunfield, K.E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American journal of botany*100(9): 1738–50.
- Gamalero, E. & Glick, B.R. (2011). Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management* (17–46).

- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P. & Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*06: 228.
- Gao, T., Foulston, L., Chai, Y., Wang, Q. & Losick, R. (2015). Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. *MicrobiologyOpen*4(3): 452–64.
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R. & Farmer, E.E. (2010). Jasmonate biochemical pathway. *Science signaling*3(109): 1–7.
- Ghazalpour, A., Bennett, B., Petyuk, V.A., Orozco, L., Hagopian, R., Mungrue, I.N., ... Lusic, A.J. (2011). Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS genetics*7(6): 1–17.
- Gill, S.S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*48(12): 909–30.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*43: 205–27.
- Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*169(1): 30–9.
- Glick, B.R. (2015). Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. In *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* (1–28). Switzerland: Springer International Publishing.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*119(3): 329–339.
- Göhre, V. & Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual review of phytopathology*46: 189–215.
- Goosen, N., Horsman, H.P., Huinen, R.G. & van de Putte, P. (1989). *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-

- quinoline-quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*171(1): 447–55.
- Grant, M. & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current opinion in plant biology*9(4): 414–20.
- Güneş, A., Turan, M., Güllüce, M. & Şahin, F. (2014). Nutritional content analysis of plant growth-promoting rhizobacteria species. *European Journal of Soil Biology*60: 88–97.
- Guo, Y. Bin, Li, J., Li, L., Chen, F., Wu, W., Wang, J. & Wang, H. (2009). Mutations that disrupt either the pqq or the gdh gene of *Rahnella aquatilis* abolish the production of an antibacterial substance and result in reduced biological control of grapevine crown gall. *Applied and environmental microbiology*75(21): 6792–803.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., ... He, Y. (2010). Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource technology*101(22): 8599–605.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. & Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*43(10): 895–914.
- Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*11(7): 1034–43.
- Han, S.H., Kim, C.H., Lee, J.H., Park, J.Y., Cho, S.M., Park, S.K., ... Kim, Y.C. (2008). Inactivation of pqq genes of *Enterobacter intermedium* 60-2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance. *FEMS microbiology letters*282(1): 140–6.
- Hartmann, A., Prabhu, S.R. & Galinski, E.A. (1991). Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant and Soil*137: 105–109.
- He, K., Nukada, H., Urakami, T. & Murphy, M.P. (2003). Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems. *Biochemical pharmacology*65(1): 67–74.

- Hölscher, T. & Görisch, H. (2006). Knockout and overexpression of pyrroloquinoline quinone biosynthetic genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of bacteriology*188(21): 7668–76.
- Howe, G.A. (2004). Jasmonates as Signals in the Wound Response. *Journal of Plant Growth Regulation*23(3): 223–237.
- Hussein, K.A. & Joo, J.H. (2015). Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* (1738-2203).
- IFA. (2014). International Fertilizer Industry Association. *IFADATA*.
- Intorne, A.C., de Oliveira, M.V. V, de M Pereira, L., de Souza Filho, G.A., Oliveira, M.V. V, Pereira, L.D.M. & Souza Filho, G.A. (2012). Essential role of the *czc* determinant for cadmium , cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *International Microbiology*15(2): 69–78.
- Intorne, A.C., de Oliveira, M.V. V, Lima, M.L., da Silva, J.F., Olivares, F.L. & de Souza Filho, G.A. (2009). Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of microbiology*191(5): 477–483.
- James, E.K., Olivares, F.L., de Oliveira, a L., dos Reis, F.B., da Silva, L.G. & Reis, V.M. (2001). Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of experimental botany*52(357): 747–760.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L.E., Tapia-Hernandez, a, Mascarua-Esparza, M. a, Martinez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J. (1997). *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*63(9): 3676–3683.
- Kandel, S.L., Herschberger, N., Kim, S.H. & Doty, S.L. (2015). Diazotrophic Endophytes of Poplar and Willow for Growth Promotion of Rice Plants in Nitrogen-Limited Conditions. *Crop Science*55(4): 1765.

- Karakurt, H., Kotan, R., Dadasoglu, F., Aslantas, R., Sahin, F., Dadasoglu, F., ... Şahin, F. (2011). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya). *Turkish Journal of Biology*35(3): 283–291.
- Kasahara, T. & Kato, T. (2003). Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature*422(6934): 832.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K. & Swings, J. (2006). The Family Acetobacteraceae: The Genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes* (163–200). New York, NY: Springer New York.
- Khairnar, N.P., Misra, H.S. & Apte, S.K. (2003). Pyrroloquinoline-quinone synthesized in *Escherichia coli* by pyrroloquinoline-quinone synthase of *Deinococcus radiodurans* plays a role beyond mineral phosphate solubilization. *Biochemical and biophysical research communications*312(2): 303–8.
- Khan, T.A., Yusuf, M. & Fariduddin, Q. (2015). Seed treatment with H₂O₂ modifies net photosynthetic rate and antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants. *Israel Journal of Plant Sciences*62(3): 167–175.
- Kim, C.H., Han, S.H., Kim, K.Y., Cho, B.H., Kim, Y.H., Koo, B.S. & Kim, Y.C. (2003). Cloning and Expression of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Genes from a Phosphate-Solubilizing Bacterium *Enterobacter intermedium*47: 457–461.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F.C., Van Loon, L.C. & Pieterse, C.M.J. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant physiology*147(3): 1358–68.
- Koornneef, M. & Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant journal : for cell and molecular biology*61: 909–921.

- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T. & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics*74(8): 1301–22.
- Kumar, R.R., Sharma, S.K., Goswami, S., Verma, P., Singh, K., Dixit, N., ... Rai, R.D. (2015). Salicylic acid alleviates the heat stress-induced oxidative damage of starch biosynthesis pathway by modulating the expression of heat-stable genes and proteins in wheat (*Triticum aestivum*). *Acta Physiologiae Plantarum*37(8): 143.
- Kumazawa, T., Sato, K., Seno, H., Ishii, A. & Suzuki, O. (1995). Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods. *The Biochemical journal*307 (Pt 2: 331–3.
- Kurepin, L. V, Zaman, M. & Pharis, R.P. (2014). Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. *Journal of the science of food and agriculture*94(9): 1715–22.
- Lee, S., Escamilla, J.E. & Kennedy, C. (2004). Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis Is Deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* Strains with Mutations in Cytochrome c Biogenesis Genes 186(16): 5384–5391.
- Liu, H., Sadygov, R.G. & Yates, J.R. (2004). A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Analytical chemistry*76(14): 4193–201.
- Liu, H., Sultan, M.A., Liu, X.L., Zhang, J., Yu, F. & Zhao, H.. (2015). Physiological and Comparative Proteomic Analysis Reveals Different Drought Responses in Roots and Leaves of Drought-Tolerant Wild Wheat (*Triticum boeoticum*). (K. Wu, ed.)*PLOS ONE*10(4): 1–29.
- Loake, G. & Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence--the players and antagonists. *Current opinion in plant biology*10(5): 466–72.
- Logeshwaran, P., Thangaraju, M. & Rajasundari, K. (2009). Hydroxamate Siderophores of Endophytic Bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* Isolated from Sugarcane Roots. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*3(4): 3564–3567.

- Lopes, R.B.M., de Oliveira Costa, L.E., Vanetti, M.C.D., de Araújo, E.F. & de Queiroz, M.V. (2015). Endophytic Bacteria Isolated from Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Exhibiting High Variability Showed Antimicrobial Activity and Quorum Sensing Inhibition. *Current microbiology*71(4): 509–16.
- López-Fernández, S., Compant, S., Vrhovsek, U., Bianchedi, P.L., Sessitsch, A., Pertot, I. & Campisano, A. (2015). Grapevine colonization by endophytic bacteria shifts secondary metabolism and suggests activation of defense pathways. *Plant and Soil*.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*63: 541–56.
- Luna, M., Bernardelli, C.E., Galar, M.L. & Boiardi, J.L. (2006). Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. *Current microbiology*52(3): 163–8.
- Luna, M.F., Aprea, J., Crespo, J.M. & Boiardi, J.L. (2011). Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied Soil Ecology* (0).
- Luna, M.F. & Boiardi, J.L. (2007). Growth yields and glucose metabolism of N₂-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus* at different culture pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*24(4): 587–590.
- Luna, M.F., Galar, M.L., Aprea, J., Molinari, M.L. & Boiardi, J.L. (2010). Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnology letters*32(8): 1071–1076.
- Ma, Y., Oliveira, R.S., Nai, F., Rajkumar, M., Luo, Y., Rocha, I. & Freitas, H. (2015). The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil. *Journal of environmental management*156: 62–9.
- Maldonado-González, M.M., Bakker, P.A.H.M., Prieto, P. & Mercado-Blanco, J. (2015). *Arabidopsis thaliana* as a tool to identify traits involved in *Verticillium dahliae* biocontrol by the olive root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Frontiers in microbiology*6: 266.

- Maldonado-González, M.M., Schilirò, E., Prieto, P. & Mercado-Blanco, J. (2015). Endophytic colonization and biocontrol performance of *Pseudomonas fluorescens* PICF7 in olive (*Olea europaea* L.) are determined neither by pyoverdine production nor swimming motility. *Environmental microbiology*17(9): 3139–53.
- Mareque, C., Taulé, C., Beracochea, M. & Battistoni, F. (2014). Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Annals of Microbiology*65(2): 1057–1067.
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö. & Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils*30(5-6): 433–439.
- Matamoros, M.A., Saiz, A., Penuelas, M., Bustos-Sanmamed, P., Mulet, J.M., Barja, M. V., ... Becana, M. (2015). Function of glutathione peroxidases in legume root nodules. *Journal of Experimental Botany*66(10): 2979–2990.
- Matsushita, K., Toyama, H., Yamada, M. & Adachi, O. (2002). Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*58(1): 13–22.
- Mauch-Mani, B. & Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current opinion in plant biology*8(4): 409–14.
- McIntire, W.S. (1994). Quinoproteins. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*8(8): 513–21.
- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*282: 662,679–682.
- Mercier, J. & Lindow, S.E. (2000). Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*66(1): 369–374.

- Meulenbergh, J.J., Sellink, E., Riegman, N.H. & Postma, P.W. (1992). Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon. *Molecular & general genetics* : MGG232(2): 284–94.
- Milisav, I., Poljsak, B. & Suput, D. (2012). Adaptive response, evidence of cross-resistance and its potential clinical use. *International journal of molecular sciences*13(9): 10771–806.
- Mishina, T.E. & Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*50(3): 500–13.
- Misra, H.S., Khairnar, N.P., Barik, A., Priyadarsini, K.I., Mohan, H. & Apte, S.K. (2004). Pyrroloquinoline-quinone : a reactive oxygen species scavenger in bacteria 578: 26–30.
- Misra, H.S., Rajpurohit, Y.S. & Khairnar, N.P. (2012). Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *Journal of biosciences*37(2): 313–25.
- Mitchell, A.E., Jones, A.D., Mercer, R.S. & Rucker, R.B. (1999). Characterization of pyrroloquinoline quinone amino acid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk. *Analytical biochemistry*269(2): 317–25.
- Mitchell, K., Brown, I., Knox, P. & Mansfield, J. (2015). The role of cell wall-based defences in the early restriction of non-pathogenic hrp mutant bacteria in Arabidopsis. *Phytochemistry*112: 139–50.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., ... Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science*16(6): 300–9.
- Mukherjee, A.K., Carp, M.-J., Zuchman, R., Ziv, T., Horwitz, B.A. & Gepstein, S. (2010). Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *Journal of Proteomics*73(4): 709–720.

- Munns, R. & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 59, 651–681).
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. & Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant physiology*140(1): 249–62.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*15: 473–497.
- Mustakhimov, I.I., Reshetnikov, A.S., Glukhov, A.S., Khmelenina, V.N., Kalyuzhnaya, M.G. & Trotsenko, Y.A. (2010). Identification and characterization of EctR1, a new transcriptional regulator of the ectoine biosynthesis genes in the halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *Journal of bacteriology*192(2): 410–7.
- Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vadivelu, M., Janssens, D., Hoste, B., ... Caballero-Mellado, J. (2005). Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Systematic and Applied Microbiology*28(3): 277–286.
- Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M. & Arshad, M. (2009). Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. *Canadian journal of microbiology*55(11): 1302–9.
- Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M., Asghar, H.N. & Arshad, M. (2010). Rhizobacteria Capable of Producing ACC-deaminase May Mitigate Salt Stress in Wheat. *Soil Science Society of America Journal*74(2): 533.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., ... Yoshida, S. (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *The Plant journal : for cell and molecular biology*33(5): 887–98.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P. & Jones, J.D.G. (2008). DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the

- Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology*18(9): 650–655.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., ... Jones, J.D.G. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science (New York, N.Y.)*312(5772): 436–9.
- Nishimura, M.T. & Dangl, J.L. (2010). Arabidopsis and the plant immune system. *The Plant journal : for cell and molecular biology*61(6): 1053–1066.
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C. & Mhamdi, A. (2014). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*112: 33–53.
- Noji, N., Nakamura, T., Kitahata, N., Taguchi, K., Kudo, T., Yoshida, S., ... Asami, T. (2007). Simple and sensitive method for pyrroloquinoline quinone (PQQ) analysis in various foods using liquid chromatography/electrospray-ionization tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*55(18): 7258–63.
- Ogut, S., Kucukoner, E., Gultekin, F. & Gurbuz, N. (2014). A Study of Long-Term Pesticide Application Amongst Agricultural Workers: Total Antioxidant Status, Total Oxidant Status and Acetylcholinesterase Activity in Blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*85(1): 155–159.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M. & Sahin, F. (2006). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*111(1): 38–43.
- Ortíz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M. & López-Bucio, J. (2008). N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment*31(10): 1497–509.
- Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J. & Dowling, D.N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*6: 745.

- Page, D.R. & Grossniklaus, L. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*3(2): 124–136.
- Pandey, S., Singh, A. & Chaudhari, N. (2015). Protection Against 1, 2-Dimethylhydrazine-Induced Systemic Oxidative Stress and Altered Brain Neurotransmitter Status by Probiotic *Escherichia coli* CFR 16 Secreting Pyrroloquinoline Quinone 690–697.
- Panhwar, Q.A., Othman, R., Rahman, Z.A., Meon, S. & Ismail, M.R. (2012). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. *Afr J Biotechnol. African Journal of Biotechnology*11(11): 2711–2719.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*68(8): 3795–801.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*5(5): 308–16.
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. & Van Wees, S.C.M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*28: 489–521.
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C. & Pieterse, C.M.J. (2004). Jasmonates—Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*23(3): 211–222.
- Puehringer, S., Metlitzky, M. & Schwarzenbacher, R. (2008a). The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited : A structural approach 11: 1–11.
- Puehringer, S., Metlitzky, M. & Schwarzenbacher, R. (2008b). The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach. *BMC biochemistry*9(1): 8.
- Raaijmakers, J.M. & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*50: 403–24.

- Rado, R., Andrianarisoa, B., Ravelomanantsoa, S., Rakotoarimanga, N., Rahetlah, V., Fienena, F.R. & Andriambelason, O. (2015). Biocontrol of potato wilt by selective rhizospheric and endophytic bacteria associated with potato plant. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*15(1): 9762–9776.
- Rajpurohit, S. & Misra, S. (2010). Characterization of a DNA damage-inducible membrane protein kinase from *Deinococcus radiodurans* and its role in bacterial radioresistance and DNA strand break repair. *Molecular microbiology*77(6): 1470–82.
- Rajpurohit, Y.S., Desai, S.S. & Misra, H.S. (2012). Pyrroloquinoline quinone and a quinoprotein kinase support gamma radiation resistance in *Deinococcus radiodurans* and regulate gene expression 1–14.
- Rangel de Souza, A.L.S., de Souza, S.A., de Oliveira, M.V.V., Ferraz, T.M., Figueiredo, F.A.M.M.A., da Silva, N.D., ... Souza Filho, G.A. (2015). Endophytic colonization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in *Arabidopsis thaliana* and its effect on plant growth promotion, plant physiology and activation of plant-defense. *Plant and Soil* 1–14.
- Rensink, W.A. & Buell, C.R. (2005). Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends in plant science*10(12): 603–9.
- Richardson, A.E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*28(9): 897–906.
- Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M. & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*321(1-2): 305–339.
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M. & Triplett, E.W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Functional Plant Biology*28(9): 829–836.
- Robinson, R.J., Fraaije, B.A., Clark, I.M., Jackson, R.W., Hirsch, P.R. & Mauchline, T.H. (2015). Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum*

aestivum) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant and Soil* 1–16.

Rodrigues Neto, J., Malavolta, V.A. & Victor, O. (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathologia* 12: 16.

Rodríguez, H. & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* 17(4-5): 319–339.

Rouws, L.F.M., Meneses, C.H.S.G., Guedes, H. V, Vidal, M.S., Baldani, J.I. & Schwab, S. (2010). Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gusA reporter genes. *Letters in applied microbiology* 51(3): 325–30.

Rucker, R., Chohanadisai, W. & Nakano, M. (2009). Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic* 14(3): 268–77.

Rucker, R., Storms, D., Sheets, A., Tchapanian, E. & Fascetti, A. (2005). Biochemistry: is pyrroloquinoline quinone a vitamin? *Nature* 433(7025): 1–11.

Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Paré, P.W. & Bais, H.P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology* 148(3): 1547–1556.

Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. & Dowling, D.N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters* 278(1): 1–9.

Sabier Sae, K., Abdulla Ah, S., Ahmaed Has, I. & Hamed Ahme, P. (2015). Effect of Bio-fertilizer and Chemical Fertilizer on Growth and Yield in Cucumber (*Cucumis sativus*) in Green House Condition. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 18(3): 129–134.

Salisbury, S.A., Forrest, H.S., Cruse, W.B.T. & Kennard, O. (1979). A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases. *Nature* 280(5725): 843–844.

- Sandhya, V. & Ali, S.Z. (2015). The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. *Microbiology*84(4): 512–519.
- Sandhya, V., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G. & Venkateswarlu, B. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas spp.* on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation*62(1): 21–30.
- Sandhya, V., SK. Z., A., Grover, M., Reddy, G. & Venkateswarlu, B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils*46(1): 17–26.
- Santi, C., Bogusz, D. & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*111(5): 743–67.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M. & Sa, T.M. (2008). Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microbial ecology*55(1): 130–140.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M. & Thangaraju, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*66(9): 1794–1798.
- Sashidhar, B. & Podile, A.R. (2010). Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of applied microbiology*109(1): 1–12.
- Schmid, M. & Hartmann, A. (2007). Molecular Phylogeny and Ecology of Root Associated Diazotrophic α - and β -Proteobacteria. In C. Elmerich & W. E. Newton (eds.), *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations* (Vol. 5, 21–40). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Schnider, U., Keel, C., Voisard, C., Défago, G. & Haas, D. (1995). Tn5-directed cloning of pqq genes from *Pseudomonas fluorescens* CHA0: mutational

- inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. *Applied and environmental microbiology*61(11): 3856–64.
- Sekhar, A.C. & Thomas, P. (2015). Isolation and Identification of Shoot-Tip Associated Endophytic Bacteria from Banana cv. Grand Naine and Testing for Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *American Journal of Plant Sciences*06(07): 943–954.
- Shaharoon, B., Arshad, M. & Zahir, Z.A. (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Letters in applied microbiology*42(2): 155–9.
- Shan, L., He, P. & Sheen, J. (2007). Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. *Cell host & microbe*1(3): 167–74.
- Sharma, A., Johri, B., Sharma, A. & Glick, B. (2003). Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry*35(7): 887–894.
- Sharma, P., Jha, A., Dubey, R. & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 1–26.
- Shen, Y.-Q., Bonnot, F., Imsand, E.M., RoseFigura, J.M., Sjölander, K. & Klinman, J.P. (2012). Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. *Biochemistry*51(11): 2265–75.
- Shirkey, B., Kovarcik, D.P., Wright, D.J., Wilmoth, G., Prickett, T.F., Helm, R.F., ... Potts, M. (2000). Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (Cyanobacteria) after years of desiccation. *Journal of bacteriology*182(1): 189–97.
- Singh, A.K., Pandey, S.K., Saha, G. & Gattupalli, N.K. (2015). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) producing *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) alleviates age associated oxidative stress and hyperlipidemia, and improves mitochondrial function in ageing rats. *Experimental gerontology*66: 1–9.

- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V.P. & Prasad, S.M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*14(3): 407–426.
- Sinha, S. & Saxena, R. (2006). Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*62(8): 1340–1350.
- Spaepen, S. (2015). Principles of Plant-Microbe Interactions. *Springer International Publishing* 247–256.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S. & Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*104(47): 18842–7.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., ... Pieterse, C.M.J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant cell*15(3): 760–70.
- Stasovski, E. & Peterson, C.A. (1993). Effects of drought and subsequent rehydration on the structure, viability and permeability of *Allium cepa* adventitious roots. *Canadian Journal of Botany*71: 700–707.
- Stephan, M.P.P., Oliveira, M., Teixeira, K.R.S.R.S., Martinez-Drets, G. & D'Ábrego, J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*77(1): 67–72.
- Stets, M.I., Alqueres, S., Souza, E.M. de, Pedrosa, F. de O., Schmid, M., Hartmann, A. & Cruz, L.M. (2015). Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 in wheat roots by strain-specific qPCR. *Applied and environmental microbiology*81(19): 6700–6709.
- Stites, T.E., Mitchell, A.E. & Rucker, R.B. (2000). Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors. *The Journal of nutrition*130(4): 719–27.

- Stobrawa, K. & Lorenc-Plucińska, G. (2007). Changes in antioxidant enzyme activity in the fine roots of black poplar (*Populus nigra* L.) and cottonwood (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsch) in a heavy-metal-polluted environment. *Plant and Soil*298(1-2): 57–68.
- Strzelczyk, E., Kampert, M. & Li, C.Y. (1994). Cytokinin-like substances and ethylene production by Azospirillum in media with different carbon sources. *Microbiological Research*149(1): 55–60.
- Sun, J., Han, Z. & Ge, X. (2014). Distinct Promoters Affect Pyrroloquinoline Quinone Production in Recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* 451–456.
- Tawatsin, A. (2015). Pesticides used in Thailand and toxic effects to human health. *Medical Research Archives* (3): 1–10.
- Tejera, N. a., Ortega, E., Gonzalez-Lopez, J. & Lluch, C. (2003). Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Journal of Applied Microbiology*95(3): 528–535.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., ... Stitt, M. (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*37(6): 914–39.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F. & Cammue, B.P. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current opinion in immunology*13(1): 63–8.
- Timmusk, S. & Wagner, E.G. (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 : MPMI*12(11): 951–959.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *PLANT PHYSIOLOGY*141(2): 373–378.

- Toyama, H., Chistoserdova, L. & Lidstrom, M.E. (1997). Sequence analysis of pqq genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate. *Microbiology (Reading, England)*143 (Pt 2: 595–602.
- Turan, M., Ataoğlu, N. & Şahin, F. (2008). Evaluation of the Capacity of Phosphate Solubilizing Bacteria and Fungi on Different Forms of Phosphorus in Liquid Culture. *Journal of Sustainable Agriculture*28: 99–108.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A. & Pieterse, C.M. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*36: 453–83.
- Vanderschuren, H., Lentz, E., Zainuddin, I. & Gruissem, W. (2013). Proteomics of model and crop plant species: status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *Journal of proteomics*93: 5–19.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.-F., Curie, C. & Lemanceau, P. (2007). Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*20(4): 441–7.
- Varshney, R.K., Nayak, S.N., May, G.D. & Jackson, S.A. (2009). Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in biotechnology*27(9): 522–30.
- Velazquez-Hernandez, M.L., Baizabal-Aguirre, V.M., Cruz-Vazquez, F., Trejo-Contreras, M.J., Fuentes-Ramirez, L.E., Bravo-Patino, A., ... Valdez-Alarcon, J.J. (2011). *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Archives of Microbiology*193(2): 137–149.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A. & Klessig, D.F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*47: 177–206.
- Von Dahl, C.C. & Baldwin, I.T. (2007). Deciphering the Role of Ethylene in Plant–Herbivore Interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*26(2): 201–209.
- Wagh, J., Shah, S., Bhandari, P., Archana, G. & Kumar, G.N. (2014). Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (pqq) gene cluster confers mineral

- phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Applied microbiology and biotechnology*98: 5117–5129.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H. & Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current biology : CB*17(20): 1784–90.
- Wang, Y., Zhang, H., Hou, P., Su, X., Zhao, P., Zhao, H. & Liu, S. (2014). Foliar-applied salicylic acid alleviates heat and high light stress induced photoinhibition in wheat (*Triticum aestivum*) during the grain filling stage by modulating the psbA gene transcription and antioxidant defense. *Plant Growth Regulation*73(3): 289–297.
- Wasternack, C. & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*111(6): 1021–58.
- Westerling, J., Frank, J. & Duine, J.A. (1979). The prosthetic group of methanol dehydrogenase from X: Electron spin resonance evidence for a quinone structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*87(3): 719–724.
- Williams, K.R. (2010). Fertilizers, Then and Now. *Journal of Chemical Education*87(2): 135–138.
- Xia, Y., DeBolt, S., Dreyer, J., Scott, D. & Williams, M.A. (2015). Characterization of culturable bacterial endophytes and their capacity to promote plant growth from plants grown using organic or conventional practices. *Frontiers in plant science*6: 490.
- Xie, J., Thapa, R., Reverdatto, S., Burz, D.S. & Shekhtman, A. (2009). Screening of small molecule interactor library by using in-cell NMR spectroscopy (SMILI-NMR). *Journal of medicinal chemistry*52(11): 3516–3522.
- Xiong, W., Cheng, K., Cui, T., Godlewski, G., Rice, K.C., Xu, Y. & Zhang, L. (2011). Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nature chemical biology*7(5): 296–303.

- Xu, J., Xing, X.-J., Tian, Y.-S., Peng, R.-H., Xue, Y., Zhao, W. & Yao, Q.-H. (2015). Transgenic Arabidopsis Plants Expressing Tomato Glutathione S-Transferase Showed Enhanced Resistance to Salt and Drought Stress. *PLoS one*10(9): 1–16.
- Yadav, I.C., Devi, N.L., Syed, J.H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G. & Jones, K.C. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of The Total Environment*511: 123–137.
- Youssef, H.H., Fayed, M., Monib, M. & Hegazi, N. (2004). *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biology and Fertility of Soils*39(6): 391–397.
- Zamioudis, C., Korteland, J., Van Pelt, J.A., van Hamersveld, M., Dombrowski, N., Bai, Y., ... Pieterse, C.M.J. (2015). Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 in Arabidopsis roots during onset of induced systemic resistance and iron deficiency responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 309–322.
- Zaprasis, A., Bleisteiner, M., Kerres, A., Hoffmann, T. & Bremer, E. (2015). Uptake of amino acids and their metabolic conversion into the compatible solute proline confers osmoprotection to *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*81(1): 250–9.
- Zhu, J.-Y., Sae-Seaw, J. & Wang, Z.-Y. (2013). Brassinosteroid signalling. *Development (Cambridge, England)*140(8): 1615–20.