

COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Arabidopsis thaliana* POR  
*Herbaspirillum seropedicae* E SEUS EFEITOS NA PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO VEGETAL E NA REGULAÇÃO DIFERENCIAL DE  
PROTEÍNAS

**MARIANA RAMOS LEANDRO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
NOVEMBRO – 2016

COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Arabidopsis thaliana* POR  
*Herbaspirillum seropedicae* E SEUS EFEITOS NA PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO VEGETAL E NA REGULAÇÃO DIFERENCIAL DE  
PROTEÍNAS

**MARIANA RAMOS LEANDRO**

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

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
NOVEMBRO – 2016

COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE *Arabidopsis thaliana* POR  
*Herbaspirillum seropedicae* E SEUS EFEITOS NA PROMOÇÃO DO  
CRESCIMENTO VEGETAL E NA REGULAÇÃO DIFERENCIAL DE  
PROTEÍNAS

**MARIANA RAMOS LEANDRO**

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

Aprovada em 28 de novembro de 2016.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Alan Trindade Branco (D. Sc. em Biociências e Biotecnologia) – UFES

---

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

---

Prof. Vanildo Silveira (D. Sc. em Biotecnologia) – USP

---

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

*Ao **Renê Antônio de Souza**, meu tio Nê, por ter torcido por mim durante todo o tempo em que estive conosco. Onde quer que esteja, receba meu carinho e minha gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe por se dedicar tanto para garantir a minha educação e por fazer a minha trajetória mais leve. Sem você, nada disso seria possível!

À minha irmã, Carol, por estar sempre presente, acreditando em mim e me dando forças para seguir em frente. Você é o meu maior exemplo!

A toda minha querida família pelo apoio e carinho que sempre destinam a mim, em especial: Tia Dete, Vovó Nazaré, Bisa e Tio Celo.

À Suzane Ariádina pela amizade e por sempre se fazer presente, mesmo na distância, zelando por mim e pelo meu trabalho.

Ao Leandro Fernandes e à Tamires Cruz pela ajuda incondicional na realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos trocados, pela paciência, pelas risadas, pela amizade e pela companhia agradável nas madrugadas, manhãs, tardes e noites de trabalho.

Ao Luciano Vespoli e à Roberta Barbosa pelos ensinamentos, pela companhia agradável no laboratório e pela disposição em me ajudar na realização deste trabalho.

Ao Lucas Passamani e ao Ricardo Reis pelos conhecimentos compartilhados e pela ajuda na realização das análises proteômicas, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Gonçalo Apolinário pelas orientações e pela dedicação destinada ao cumprimento deste trabalho. Cada momento de conversa foi fundamental para meu crescimento profissional. Meu respeito e gratidão.

Aos membros compositores da minha banca de defesa de dissertação, prof. Alan, Prof. Fábio e prof. Vanildo, por aceitarem meu convite e pelas contribuições para melhoria deste trabalho.

A todos os professores Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UENF que contribuíram para a minha formação ao longo desses dois anos de mestrado.

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

À FAPERJ, CNPq e ao INCT/FBN pelo apoio financeiro.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade de realização do Mestrado.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Associações entre plantas e micro-organismos.....	4
2.2 Bactérias promotoras do crescimento vegetal .....	6
2.3 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	8
2.4 Mecanismos moleculares de plantas responsivos a associações com micro-organismos.....	12
2.5 <i>Arabidopsis thaliana</i> : organismo modelo para o estudo da associação entre plantas e micro-organismos .....	15
2.6 Proteômica como ferramenta de auxílio para compreensão das associações entre plantas e micro-organismos.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
4.1 Material biológico .....	21
4.1.1 Micro-organismo e condições de cultivo.....	21
4.1.2 Material vegetal e condições de cultivo .....	22
4.2 Inoculação.....	22
4.3 Avaliações do crescimento vegetal.....	23
4.3.1 Área foliar da roseta .....	23

4.3.2	Matérias fresca e seca .....	23
4.4	Determinação da população microbiana nos tecidos vegetais .....	24
4.5	Análises em microscopia de fluorescência .....	24
4.6	Análise proteômica .....	25
4.6.1	Extração de proteínas totais.....	25
4.6.2	Quantificação do conteúdo de proteínas totais .....	26
4.6.3	Digestão das proteínas.....	26
4.6.4	Análise LC-MS/MS .....	27
4.7	Análises e interpretação dos dados .....	27
5.	RESULTADOS.....	29
5.1	Avaliação da eficiência de <i>H. seropedicae</i> em promover o crescimento em plantas de <i>A. thaliana</i> .....	29
5.2	Avaliação da eficiência de colonização de <i>H. seropedicae</i> em raízes de plantas de <i>A. thaliana</i> .....	30
5.3	Influência da associação com <i>H. seropedicae</i> sobre os perfis proteômicos de folhas de plantas de <i>A. thaliana</i> .....	32
6.	DISCUSSÃO.....	52
7.	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## RESUMO

LEANDRO, MARIANA RAMOS; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Novembro, 2016. Colonização endofítica de *Arabidopsis thaliana* por *Herbaspirillum seropedicae* e seus efeitos na promoção do crescimento vegetal e na regulação diferencial de proteínas. Orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: Valdirene Moreira Gomes e Vanildo Silveira.

A utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal como biofertilizantes é uma alternativa para atenuar a demanda agrícola por fertilizantes minerais. Contudo, para esta prática ser amplamente absorvida pela agricultura, os mecanismos moleculares reguladores-chave do processo de colonização e promoção do crescimento necessitam ser elucidados. Neste cenário, a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* se destaca pela sua eficiência de colonização, seguida do seu potencial em promover o crescimento em diversas culturas de interesse econômico. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da associação entre *H. seropedicae* HRC54 e plantas de *Arabidopsis thaliana* no âmbito da promoção do crescimento vegetal. Os resultados obtidos demonstram que *H. seropedicae* HRC54 possui a capacidade de promover o crescimento vegetal em *A. thaliana*, promovendo um ganho de massa fresca de parte aérea e de raiz de 35% e 42,5%, respectivamente, em relação ao controle. Um ganho de massa também foi observado durante as análises de massa seca, onde as plantas inoculadas obtiveram um ganho de massa seca de parte aérea e de raiz de 64% e 75%, respectivamente. A localização da colonização *H. seropedicae* HRC54 em

raízes de *A. thaliana*, foi avaliada através de microscopia de fluorescência, revelando a presença da bactéria nas regiões de brotamento de raízes laterais e na base de pelos radiculares. Adicionalmente, ensaios de UFC revelaram que a bactéria não coloniza a parte aérea de plantas de *A. thaliana* restringindo-se aos tecidos radiculares, na concentração de  $1,7 \times 10^4$  UFC/g. Visando avaliar as vias moleculares reguladas em plantas de *A. thaliana* quando em associação com *H. seropedicae*, análises proteômicas comparativas revelaram que 21% das proteínas positivamente reguladas em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae* estão relacionadas à manutenção do estado redox celular. Entre estas, as proteínas com maiores níveis de indução possuem localização no cloroplasto, indicando uma alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nesta organela. A análise também revelou 19 proteínas relacionadas à fotossíntese positivamente reguladas pela inoculação, sendo que 15 destas proteínas inerentes aos Fotossistemas I e II. Adicionalmente, proteínas relacionadas ao metabolismo de fitohormônios, processamento de metabólitos secundários e produção de proteínas PR também foram positivamente reguladas durante a associação entre *H. seropedicae* e plantas de *A. thaliana*. Os dados obtidos no presente trabalho servem de insumo para a compreensão dos mecanismos moleculares induzidos em plantas durante a interação com micro-organismos benéficos, contribuindo para estudos que visem a potencialização da utilização de biofertilizantes na agricultura.

Palavras-chave: Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal, proteômica, *A. thaliana*, *H. seropedicae*

## ABSTRACT

LEANDRO, MARIANA RAMOS; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; November, 2016. Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Herbaspirillum seropedicae* and its effects on plant growth promotion and differential protein regulation. Advisor: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Counselors: Valdirene Moreira Gomes and Vanildo Silveira.

The use of plant growth promoting bacteria as biofertilizers is an alternative to attenuate the agricultural demand for mineral fertilizers. However, for this practice to be widely absorbed by agriculture, the key regulatory molecular mechanisms of the process of colonization and growth promotion need to be elucidated. In this scenario, the bacterium *Herbaspirillum seropedicae* stands out for its colonization efficiency, followed by its potential to promote growth in several crops of economic interest. In view of the above, the present work aimed to study the association between *H. seropedicae* HRC54 and *Arabidopsis thaliana* plants in the context of the promotion of plant growth. The results obtained demonstrate that *H. seropedicae* HRC54 has the capacity to promote plant growth in *A. thaliana*, promoting a fresh shoot and root mass gain of 35% and 42.5%, respectively, in relation to the control. A mass gain was also observed during the analyzes of dry mass, where the inoculated plants obtained a dry mass gain of shoot and root of 64% and 75%, respectively. The location of the *H. seropedicae* HRC54 colonization in *A. thaliana* roots was evaluated by fluorescence microscopy, revealing the presence of the bacterium in the shoots of the lateral roots and the base of the roots. Additionally, UFC assays revealed that the bacterium does not colonize the shoot of *A. thaliana*

plants by restricting it to the root tissues at a concentration of  $1.7 \times 10^4$  CFU / g. In order to evaluate the molecular pathways regulated in plants of *A. thaliana* when in association with *H. seropedicae*, comparative proteomic analyzes revealed that 21% of the proteins positively regulated in leaves of *A. thaliana* plants inoculated with *H. seropedicae* are related to the maintenance of the state cellular redox. Among these, the proteins with higher levels of induction are located in the chloroplast, indicating a high production of reactive oxygen species (ROS) in this organelle. The analysis also revealed 19 photosynthesis-related proteins positively regulated by the inoculation, with 15 of these proteins inherent to Photosystems I and II. In addition, proteins related to phytohormone metabolism, processing of secondary metabolisms and production of PR proteins were also positively regulated during the association between *H. seropedicae* and *A. thaliana* plants. The data obtained in the present work serve as input for the understanding of the molecular mechanisms induced in plants during interaction with beneficial microorganisms, contributing to studies aimed at enhancing the use of biofertilizers in agriculture.

Keywords: Plant Growth Promoting Bacteria, proteomics, *A. thaliana*, *H. seropedicae*

## 1 INTRODUÇÃO

A população mundial deverá alcançar o marco de, aproximadamente, 10 bilhões de habitantes em 2050, segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU, 2015). Tal fato acarretará em um aumento expressivo da demanda mundial por energia, água e alimento. No âmbito da produção de alimentos, atualmente a manutenção da produtividade agrícola é obtida através da aplicação de fertilizantes minerais e de outros produtos químicos utilizados, principalmente, como inibidores da ocorrência de pragas e doenças.

O surgimento dos fertilizantes minerais, no final da década de 40, acrescido da chegada de pesticidas, sementes de alto rendimento e da automação de processos agrícolas, constituíram um grande impulso para a agricultura. Este período ficou conhecido como Revolução Verde, onde, de fato, ocorreu uma revolução em todos os processos utilizados na agricultura até então. Como consequência da implementação dessas medidas, ocorreu um salto na produção agrícola. Entre 1950 e 2005, por exemplo, a produção de grãos obteve um aumento de 154%.

No entanto, o uso massivo de fertilizantes minerais é, atualmente, um problema grave para o meio ambiente. Sabe-se que quando fertilizantes nitrogenados entram em contato com o solo e, conseqüentemente, com micro-organismos que nele residem, sofrem uma série de modificações químicas, acarretando na liberação de Óxido Nitroso ( $N_2O$ ) para a atmosfera.  $N_2O$  está entre os gases mais alarmantes do efeito estufa, além de ser um potencial contribuinte

para degradação da camada de ozônio. O aumento do uso destes fertilizantes é, ainda, agravado pela baixa eficiência de absorção pelas plantas em que eles são aplicados (Reddy et al., 2002). Não obstante, o alto custo para a produção de fertilizantes minerais é uma segunda relevante problemática. Tais fatos evidenciam a necessidade de busca por práticas agrícolas mais sustentáveis e menos dispendiosas.

Neste sentido, bactérias promotoras do crescimento vegetal se destacam como uma alternativa na produção agrícola. Essas são capazes de afetar positivamente o crescimento de plantas hospedeiras através de diversos mecanismos diretos e indiretos (Reddy et al. 2010). Entre os mecanismos diretos, destacam-se a produção de fitohormônios, como auxinas, giberilinas e ácido abscísico; a solubilização de nutrientes, como fósforo e zinco; e a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Este último é proposto como o mecanismo de maior relevância, devido a importância do nitrogênio para a produção agrícola. Os micro-organismos capazes de realizar a FBN são denominados diazotróficos. Nos mecanismos indiretos estão incluídas a indução de resistência vegetal a estresses ambientais e o auxílio no biocontrole de pragas e fitopatógenos. Portanto, a utilização destes micro-organismos como bioinoculantes pode propiciar a diminuição da demanda agrícola por fertilizantes minerais.

Em cana-de-açúcar os diazotróficos de maior relevância para a FBN são *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum* spp. (Dobereiner et al., 1995; Boddey et al., 1995; Boddey 1999; Baldani et al., 1997; Reis et al., 2000). Em plantas de milho e arroz a FBN já foi relatada como proveniente de espécies de *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (James, 2000; Patriquin et al. 1983; Boddey et al. 1995; Triplett 1996; Malik et al. 1997; Stoltzfus et al. 1997; Yanni et al. 1997; James et al. 1999; Bhattacharjee et al. 2008).

Entre as bactérias diazotróficas mencionadas, as pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* se destacam pelo seu potencial de incremento de produtividade e crescimento em diversas culturas de interesse econômico, como arroz, milho e cana-de-açúcar (Boddey et al. 1995; James 2000; James et al. 2002; Elbeltagy et al. 2001; Gyaneshwar et al. 2002; Roncato-Maccari et al. 2003a). Adicionalmente, sabe-se que, em contraste com outras bactérias diazotróficas promotoras do crescimento, algumas bactérias do gênero *Herbaspirillum* contêm genes

codificantes homólogos para o sistema de secreção do tipo III (SST3), como no caso das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisulbalbicans*.

O SST3 é uma maquinaria altamente especializada, utilizada para secreção de moléculas efetoras para o interior da célula do hospedeiro (Tang et al., 2006). Este sistema já foi identificado em organismos patogênicos e não patogênicos. No geral, as moléculas efetoras secretadas possuem a capacidade de subverter o sistema de defesa da célula hospedeira, favorecendo o processo de colonização. Neste sentido, a natureza *quasi*-patogênica de algumas estirpes do gênero *Herbaspirillum* acrescida de sua alta capacidade de invasão nas células hospedeiras faz da interação *Herbaspirillum*-planta um modelo interessante para compreensão acerca dos mecanismos inerentes à associação endófito-planta.

Estudos utilizando plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*, têm aumentado significativamente a compreensão acerca da percepção e sinalização da imunidade vegetal durante a associação com micro-organismos (Schwessinger et al. 2015). Devido ao seu pequeno porte, seu ciclo de vida curto e a facilidade de obtenção de mutantes em vias bioquímicas específicas, plantas de *A. thaliana* são uma ferramenta em potencial para o auxílio em estudos de associações planta-micro-organismos. Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstram a colonização e a promoção do crescimento de *A. thaliana* pela bactéria promotora do crescimento *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Devido ao interesse em potencializar a utilização de bioinoculantes e ampliar o uso desta ferramenta biotecnológica na agricultura, o entendimento acerca dos mecanismos moleculares inerentes à associação bactéria-planta e do conjunto de vias reguladas é essencial. Neste contexto, o presente trabalho objetivou o estudo do efeito da colonização da bactéria diazotrófica *H. seropedicae* em plantas de *A. thaliana*, verificando seus efeitos na fisiologia e promoção do crescimento, além da análise do conjunto de proteínas diferencialmente reguladas durante este processo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Associações entre plantas e micro-organismos

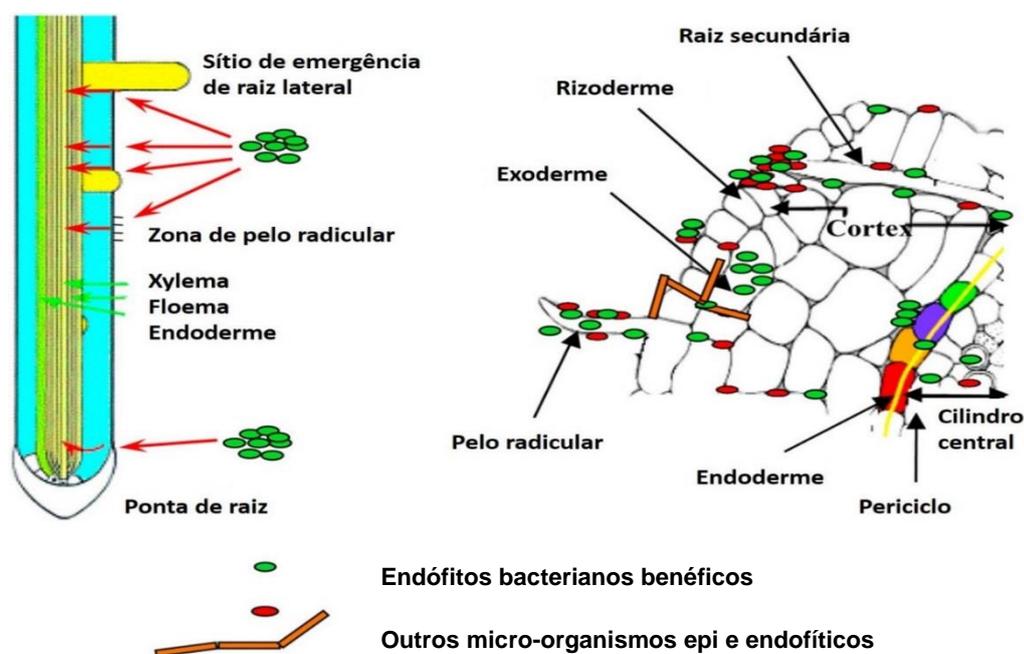
Devido à sua natureza séssil, plantas terrestres estão constantemente expostas a diversos fatores abióticos e bióticos que ditam sua performance de desenvolvimento. Dentre os fatores abióticos, destacam-se as mudanças climáticas, as variações nutricionais no solo, a disponibilidade hídrica, entre outros. Os fatores bióticos incluem as associações com vírus, bactérias, fungos, insetos e herbívoros.

Diversas alterações morfológicas e bioquímicas são descritas em plantas como inerentes ao processo de adaptação a interferências abióticas. Estudos demonstram, por exemplo, alterações na arquitetura radicular como consequência da baixa disponibilidade hídrica, além de sinalizações hormonais específicas, levando ao fechamento estomático e à diminuição da taxa de transpiração.

Não obstante, concomitantemente aos fatores abióticos, fatores bióticos desempenham um papel chave no desempenho vegetal. Sabe-se que os solos abrigam uma vasta diversidade de espécies de micro-organismos. Estudos de metagenômica demonstram que a diversidade genética da microbiota destes ecossistemas pode chegar a milhares de espécies por grama de solo. Contudo, devido à dificuldade de isolamento e cultivo destes micro-organismos, o conhecimento acerca da diversidade das espécies ainda é muito pequeno.

Habitualmente, estes micro-organismos se encontram com maior concentração entorno de sistemas radiculares de plantas, e associadas a estes

(Figura 1), que no restante do perfil do solo. Isto se deve ao fato da rizosfera conter exsudados provenientes das plantas, como alguns açúcares e aminoácidos, que, por quimiotaxia, atraem as bactérias colonizadoras da rizosfera (rizobactérias) (Baldri *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Regiões de colonização de bactérias endofíticas e epifíticas na raiz da planta hospedeira. Adaptado de Reinhold-Hurek and Hurek (1998).

As associações entre plantas e os micro-organismos presentes no solo são de naturezas diversas, abrangendo intervalos entre associações compatíveis e incompatíveis. As associações compatíveis podem levar a efeitos neutros, deletérios ou benéficos para as plantas hospedeiras. Contudo, neste ponto, pode-se dizer que existe um ponto de fusão entre os fatores bióticos e abióticos. Isto se deve ao fato dos efeitos das associações entre plantas e micro-organismos serem, muitas vezes, dependentes de fatores abióticos. Sabe-se, por exemplo que, a depender da condição nutricional do solo, micro-organismos podem deixar de ter efeitos benéficos, passando a ter efeito neutro sobre a planta hospedeira.

Os micro-organismos que interferem negativamente no desenvolvimento das plantas hospedeiras são geralmente bactérias e fungos patogênicos

(fitopatógenos), oomicetos e nematoides. Já os micro-organismos benéficos incluem as bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas), bactérias e rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e fungos endo e ectomicorrízicos. Os micro-organismos benéficos são os que possuem o maior apelo para a produção agrícola, em especial, os micro-organismos diazotróficos. A utilização destes em associação com plantas tende a diminuir a demanda agrícola por fertilizantes minerais, atenuando, assim, os impactos deletérios provenientes do massivo uso destes compostos.

## **2.2 Bactérias promotoras do crescimento vegetal**

Bactérias que, direta ou indiretamente, contribuem para o crescimento vegetal recebem a classificação de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV). As BPCV possuem a capacidade de colonizar diferentes porções dos tecidos vegetais, sem manifestar patogenicidade aparente (Lugtenberg and Kamilova, 2009).

Além disso, estes micro-organismos são caracterizados como portadores de uma gama de mecanismos que auxiliam no desenvolvimento das plantas hospedeiras, como a fixação biológica de nitrogênio (Baldani et al., 1997), o controle biológico de doenças (Verma et al., 2001) e o aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos (Hellmann et al., 1997).

A complementação ou substituição de fertilizantes minerais pela FBN realizada por bactérias diazotróficas representa uma alternativa econômica e sustentável para a agricultura. Apesar de mais de 70% da atmosfera ser composta por nitrogênio (N), este se encontra de uma forma não-assimilável para as plantas. O N atmosférico precisa, primeiramente, ser reduzido a amônia para que, então, possa ser metabolizado pelas plantas. Após este processo, o N passa a ser componente integral de proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas (Bockman, 1997). Os micro-organismos diazotróficos mais utilizados na agricultura são os rizóbios. Porém, estes possuem um limitado número de plantas hospedeiras.

Bactérias diazotróficas fixam o nitrogênio atmosférico através da atividade da enzima nitrogenase, uma metaloenzima. Os genes envolvidos na biossíntese da nitrogenase (*nif*) em diferentes organismos diazotróficos estão arranajados em um

único *cluster* de aproximadamente 20-24 kb, com sete operons. Tomados em conjunto, tais operons originam 20 proteínas distintas. Devido à complexidade do sistema *nif*, estratégias de manipulação genética visando a mimetização da fixação de nitrogênio ainda não obtiveram sucesso.

Adicionalmente, sabe-se que a modulação dos níveis de fitohormônios nos tecidos vegetais é, também, um meio utilizado pelas BPCV durante promoção do crescimento vegetal. Os fitohormônios auxinas, citocininas, giberilinas, etileno e ácido abscísico possuem papéis chave na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (Salisbury & Ross, 1992).

As BPCV podem ser classificadas de acordo com a região da planta em que elas possuem a capacidade de colonizar. Desta forma, estes micro-organismos podem ser denominados epifíticos ou endofíticos. Bactérias epifíticas são caracterizadas por colonizarem a superfície de tecidos vegetais (Petrini et al., 1991), enquanto bactérias endofíticas habitam o interior dos tecidos, sem que estes apresentem danos aparentes (Petrini et al., 1991).

Apesar desta classificação, não existe um limite claro de distinção entre esses grupos de bactérias, visto que algumas populações bacterianas podem migrar entre a colonização endofítica e epifítica (Hallmann et al., 1997). Esta migração se dá, principalmente, devido a variações em condições ambientais que podem favorecer a entrada de bactérias oportunistas epifíticas no interior dos tecidos das plantas hospedeiras (Azevedo et al., 1998).

Em contraste com as bactérias que colonizam as plantas de forma epifítica, como no caso das bactérias colonizadoras da rizosfera, as bactérias endofíticas habitam um ambiente que lhes fornece proteção e as privam da competição por nutrientes (Olivares, 1996). Entre as bactérias endofíticas, destacam-se as pertencentes ao grupo das bactérias diazotróficas associativas. Estes micro-organismos, além de possuírem a capacidade de colonizar o interior de tecidos vegetais específicos, realizam a fixação biológica de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), deixando-o disponível de uma forma assimilável pelas plantas ( $NH_3$ ) e, conseqüentemente, contribuem para o desenvolvimento destas (Baldani et al., 1997).

Para comprovar a colonização endofítica, as ferramentas mais utilizadas são a identificação bacteriana por técnicas imunológicas ou de hibridização *in situ*; ou, ainda, pela marcação das bactérias com gene *reporter*. Esta última tem sido

amplamente utilizada para localização de endófitos e elucidação da sua dinâmica no interior dos tecidos vegetais; e consiste na marcação da bactéria com genes *reporter* de expressão constitutiva codificantes de proteínas fluorescentes. Após o processo de inoculação na planta hospedeira, é possível, através da utilização de microscopia de fluorescência, identificar os locais de colonização bacteriana.

Diversas gramíneas de importância econômica, como cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. L.) e arroz (*Oryza sativa* L.), são alvos de estudos quanto à ocorrência de interações benéficas que resultam na promoção do crescimento vegetal. Tais estudos permitiram a descoberta de uma gama de endófitos capazes de promover o crescimento da planta hospedeira, tais como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE E DOBERËINER, 1988), *Azospirillum brasilense* (WEBER et al., 1999), *Burkholderia* sp. (WEBER et al., 1999), *Herbaspirillum seropedicae* (OLIVARES et al., 1996; WEBER et al., 1999) e *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* (OLIVARES et al., 1996).

Nos últimos 20 anos houve um incremento no interesse acerca da utilização de BPCV como ferramenta para a agricultura sustentável. Esse interesse leva a um conjunto de esforços em busca da elucidação dos mecanismos fundamentais envolvidos na associação planta-micro-organismo que culmina na promoção do crescimento vegetal. A compreensão da genética e bioquímica inerentes a estes mecanismos é essencial para viabilizar utilização massiva das BPCV no ambiente.

### **2.3 *Herbaspirillum seropedicae***

No ano de 1986, Baldani et al. isolaram cepas bacterianas cujo conteúdo do material genômico, a morfologia e as condições de crescimento não eram característicos de nenhuma bactéria descrita até então. Estas bactérias foram, então, classificadas em um novo gênero, denominado *Herbaspirillum* (*herba* = planta herbácea que não produz tecidos lenhosos persistentes; *spirillum* = pequeno espiral; *Herbaspirillum* = pequenas bactérias em forma de espiral provenientes de plantas herbáceas). Este gênero é caracterizador bactérias com células gram-negativas, vibrióides (bacilos curvados) e, em alguns casos, células em formato espiral.

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe das Betaproteobactérias e abrange 14 espécies. Entre estas, algumas são capazes de fixar biologicamente o

nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbicas, sendo, assim, diazotróficas. As estirpes bacterianas deste gênero que possuem o maior acervo de trabalhos na literatura são *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, um mutante espontâneo da estirpe Z78 (ATCC 35893) isolada de sorgo, cujo genoma foi sequenciado (Pedrosa, 2011); e a estirpe *H. seropedicae* Z67 (ATCC 35892), isolada de arroz (Baldani et al., 1986).

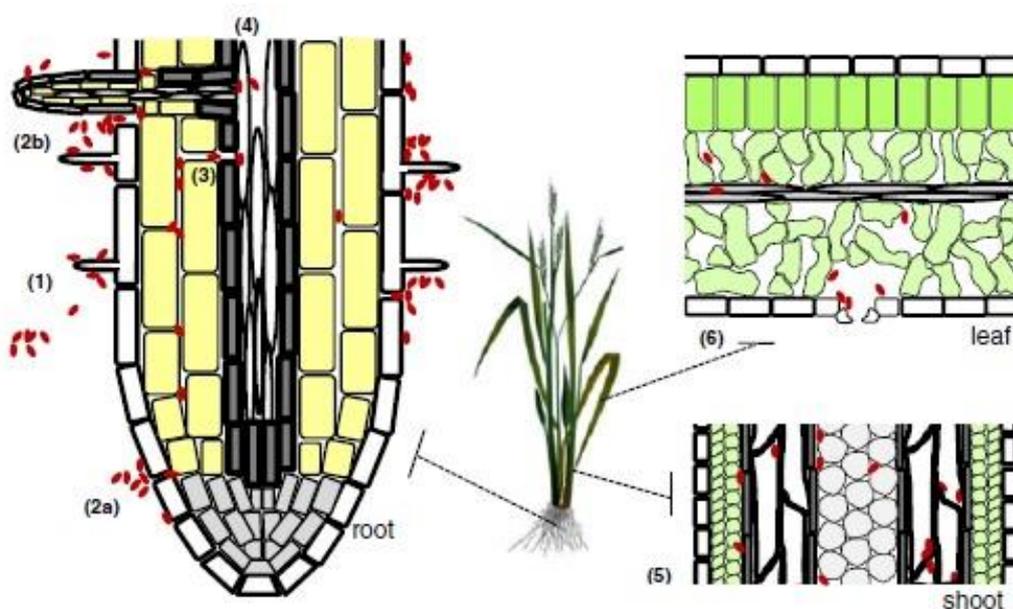
Apesar de serem amplamente conhecidas devido a associações com plantas, 9 entre as 14 espécies pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* não se associam com plantas. Estas são encontradas vivendo de forma livre em ambientes aquáticos e em solos poluídos e não poluídos. Além disso, alguns membros desse gênero, principalmente os mais usualmente descritos como colonizadores de plantas, também são encontrados em outros *habitats*, como em aneurismas aórticos em humanos (da Silva et al., 2006), assim como em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (Chen et al., 2011; Ziga et al., 2010). Contudo, não se sabe ao certo a influência da presença destes micro-organismos no desenvolvimento destas doenças. Trabalhos supõem que estas bactérias podem ser patógenos oportunistas (Berg et al., 2005).

Uma grande variedade de plantas já foi descrita como hospedeira de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, sendo que a maior parte destas associações ocorre com gramíneas. O primeiro isolamento destes micro-organismos foi feito a partir de raízes esterilizadas de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (Baldani et al., 1986; Olivares et al., 1996), além de folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) (Pimentel et al., 1991).

As associações *Herbaspirillum*-planta envolvem uma série de etapas que, em geral, resultam na promoção do crescimento vegetal. Este processo tem sido estudado em maior profundidade para as bactérias *H. seropedicae*, *H. rubrisulbalbicans* e *H. frisingense*. Entre estas, *H. seropedicae* se destaca devido à sua colonização rápida em uma grande variedade de plantas hospedeiras. Estudos com plantas de cana-de-açúcar e arroz, por exemplo, demonstram que a inoculação com *H. seropedicae* leva a um expressivo incremento na biomassa total (Boddey et al. 1995; Baldani et al. 2000; James et al. 2002; Gyaneshwar et al. 2002).

Estudos sugerem que a associação de *H. seropedicae* com plantas tem início a partir de sua atração para as raízes, visto que estas fornecem carbono para

a bactéria. Subsequentemente, ocorre a adesão da bactéria à superfície radicular, seguida de sua colonização através pontos de emergência de raízes laterais (Figura 2).



**Figura 2.** Colonização de plantas por *Herbaspirillum seropedicae*. A associação entre *H. seropedicae* (pontos vermelhos) e plantas começa pela aderência da bactéria à superfície radicular, preferencialmente nas regiões que contêm pelos radiculares (1). A maior parte da população bacteriana permanece na superfície radicular, mas algumas bactérias penetram por discontinuidades da epiderme, como a zona de alongação (2a) e regiões de brotamento de raiz lateral (2b). Posteriormente há uma rápida ocupação dos espaços intercelulares, podendo haver colonização do xilema (3). Algumas bactérias, então, se movem através do xilema em direção à parte aérea (4), podendo colonizar brotos (5) e folhas (6) (Souza et al., 2012).

Trabalhos com plantas de cana-de-açúcar cultivadas de forma estéril demonstram a eficiência de *H. seropedicae* na colonização de vasos do xilema nas regiões de junção de raízes laterais (James & Olivares, 1998). Um processo semelhante foi descrito por James et al. (2002), onde observou-se que uma população epifítica de *H. seropedicae* Z67 é capaz de entrar no xilema de raízes de plantas de arroz a partir de zonas de brotamento de raízes laterais. Adicionalmente, a migração pelo xilema e a posterior colonização da parte aérea por *H. seropedicae* já foi demonstrado em plantas de arroz (Gyaneswar et al., 2002).

Ainda que, sob condições laboratoriais, muitos trabalhos tenham demonstrado que zonas de brotamento de raízes laterais são rotas para entrada de bactérias, McCully (2001) sugeriu que este processo é pouco comum em raízes de plantas saudáveis no campo. Em tal trabalho, ele infere que o processo de colonização de raízes envolve, provavelmente, enzimas de degradação da parede celular, como pectinases e celulases.

A produção de enzimas de degradação da parede celular já foi relatada na estirpe bacteriana *H. seropedicae* Z67 (James et al., 2002). Por outro lado, análises *in silico* do genoma de *H. seropedicae* SmR1 não demonstraram a existência de genes codificantes para nenhuma das enzimas de degradação de parede celular descritas. Apesar disso, esta estirpe possui a capacidade de colonizar endofiticamente diversas plantas hospedeiras sob condições laboratoriais (Roncato-Maccari et al., 2003a).

Após a colonização na planta hospedeira, diversos mecanismos já foram sugeridos como moduladores da promoção do crescimento vegetal por *H. seropedicae*. A FBN se destaca com um dos mecanismos mais relevantes durante este processo. Estudos da interação entre *H. seropedicae* e plantas de milho, arroz e sorgo foram realizados com uma estirpe contendo uma fusão *nifH::gusA*. Os resultados desse estudo demonstraram que a bactéria coloniza a superfície radicular e tecidos internos das 3 gramíneas testadas e expressa o gene *nifH*, comprovando a realização da FBN por *H. seropedicae* durante as associações estudadas.

Apesar da importância da FBN para a promoção do crescimento vegetal, trabalhos demonstram que este não é o único mecanismo de incremento da biomassa em plantas inoculadas com *H. seropedicae*. Roncato-Maccari et al. (2003a) utilizaram duas estirpes de *H. seropedicae* em associação com plantas de arroz para atestar esta hipótese: uma estirpe Nif<sup>+</sup> e uma estirpe Nif<sup>-</sup>. Os resultados obtidos demonstraram um ganho de massa no tecido radicular semelhante na inoculação com as diferentes estirpes testadas, sugerindo a existência de outros fatores na promoção do crescimento vegetal.

A produção de fitohormônios por bactérias é uma relevante ferramenta utilizada para promover o crescimento em plantas. Etileno, giberilinas, auxinas, citocininas e ácido abscísico são moléculas sinalizadoras fundamentais para o desenvolvimento vegetal (Bottini et al. 1989; Spaepen et al. 2007; Wu et al. 2009).

*H. seropedicae* produz giberilinas e ácido indolacético (AIA) (Bastián et al., 1998), os quais são liberados para a planta hospedeira, podendo auxiliar no processo de promoção do crescimento.

Adicionalmente, outros mecanismos moleculares de *H. seropedicae* podem estar associados ao sucesso de colonização de seus hospedeiros. Bactérias de colonização endofítica expressam genes requeridos para a adesão, penetração e colonização de plantas, além dos genes necessários para a manutenção de suas vidas no interior dos tecidos vegetais. Análises *in silico* do genoma de *H. seropedicae* SmR1 revelaram a presença de genes homólogos para o SST3 (Pedrosa et al., 2011).

Diversas bactérias que interagem com hospedeiros eucariotos possuem uma maquinaria especializada na translocação de proteínas para o citoplasma das células hospedeiras. O SST3 é o aparato mais comum utilizado neste processo (He et al., 2004). Este sistema é encontrado em micro-organismos patógenos gram-negativos de plantas e animais, mas sua presença já foi relatada em simbióticos e bactérias associativas (Hueck, 1998). Nestes micro-organismos, o SST3 é utilizado para translocar moléculas efetoras através da membrana plasmática para o citoplasma das células hospedeiras. Uma vez injetadas, as moléculas efetoras alteram o metabolismo celular beneficiando a bactéria, no caso dos patógenos, ou levando a benefícios mútuos, no caso de simbiotes e bactérias associativas (Mota et al. 2005; Hacker and Carniel 2001; Grant et al. 2006).

A presença de genes homólogos do SST3 no genoma de *H. seropedicae* SmR1 sugere a presença desta maquinaria nesta bactéria, e levanta a possibilidade do envolvimento do SST3 durante suas associações com plantas. Contudo, Chaves et al. (2009) demonstraram que a análise do secretoma de *H. seropedicae* não revela nenhuma proteína secretada pelo SST3. Os autores sugerem, porém, que condições específicas podem ser requeridas para a expressão deste sistema.

## **2.4 Mecanismos moleculares de plantas responsivos a associações com micro-organismos**

Plantas estão constantemente expostas a uma variedade de adversidades que desafiam sua capacidade de resistência e desenvolvimento. Neste cenário, os micro-organismos destacam-se como potenciais agentes infecciosos que, ao longo

da evolução, vêm contribuindo para o desenvolvimento de barreiras físicas e mecanismos moleculares de detecção e defesa em seus hospedeiros.

Entre as barreiras físicas em plantas, estão incluídas a parede celular e a cutícula. Devido à existência destas, a maioria dos micro-organismos têm sua colonização restrita a regiões apoplásticas. Contudo, alguns micro-organismos conseguem vencer essas barreiras e alcançar o espaço citoplasmático das células de suas plantas hospedeiras. A bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, por exemplo, utiliza um SST3 para injetar moléculas efetoras no citoplasma das células hospedeiras e, por consequência, consegue subverter o sistema de defesa vegetal, favorecendo sua colonização (Cunnac et al., 2009).

De forma geral, a primeira linha da resposta de defesa vegetal induzida por micro-organismos é disparada instantaneamente no momento da detecção de padrões moleculares associados a patógenos ou micróbios (PAMP/MAMP). MAMPs são, geralmente, reconhecidos por receptores padrões da superfície celular (PRRs). Ao conjunto de mecanismos moleculares associados à esta primeira linha resposta de defesa é dado o nome de imunidade inata. Dentre estes, destacam-se a mudança nos níveis de  $Ca^{2+}$  citoplasmático, cascatas de ativação de MAP quinase (MAPK), produção de espécies reativas de oxigênio, deposição de calose, fechamento estomático, entre outros.

Além disso, outros mecanismos de defesa vegetal, tais como metabólitos secundários, são produzidos de forma constitutiva, e ficam alocados em compartimentos celulares específicos, para serem utilizados em situações de invasão por microrganismos (Gara et al., 2003). Estes metabólitos constituem um sofisticado sistema sensorial vegetal para percepção de sinais de potenciais patógenos, e para uma subsequente resposta bioquímica apropriada.

Um dos mais bem descritos mecanismos de resposta utilizados por plantas, durante associações com micro-organismos, é o *burst* oxidativo. Este consiste na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) a fim do controle da população microbiana nos tecidos vegetais. Contudo, o acúmulo de EROs pode produzir efeitos danosos para as células vegetais. Neste sentido, concomitantemente à produção de um *burst* oxidativo, é ativado um sistema de detoxificação de EROs. Diversas enzimas e metabólitos redox agem em sinergia nas células vegetais em prol da detoxificação de EROs (Cagno et al., 2001).

Entre as enzimas detoxificadoras de EROs, destacam-se a Superóxido Desmutase (SOD), catalisadora da dismutação de  $O_2^-$  para  $H_2O_2$ ; a Catalase (CAT), catalisadora da dismutação de  $H_2O_2$  para oxigênio e água; e Ascorbato Peroxidase (APX), responsável pela redução de  $H_2O_2$  para água pela utilização de ascorbato como doador de elétron específico. Estas enzimas são consideradas as principais para proteção das células contra danos oxidativos. O balanço da atividade de SOD, APX ou CAT é essencial para a determinação do nível celular de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Cagno et al., 2001; Noctor et al., 1998; Tommasi et al., 2001).

Os metabólitos redox, como ascorbato (ASC) e glutatona (GSH), protegem as células vegetais contra danos provenientes do acúmulo de EROs, através de dois mecanismos principais: (1) remoção direta dos EROs ou (2) bloqueando a cascata de reações oxidativas desencadeadas por EROs. Tanto ASC quanto GSH são encontrados em compartimentos celulares específicos de forma constitutiva, sendo que suas produções podem ser potencializadas durante eventos de estresse oxidativos.

Plantas são capazes de produzir uma série de hormônios, que, além de atuarem no desenvolvimento vegetal e na resistência contra estresses bióticos e abióticos, parecem ter influência nas interações planta-micro-organismo (Grant e Jones 2009). Diversos trabalhos vêm demonstrando que auxinas (Wang et al. 2005), giberelinas (GA) (Navarro et al. 2008), ácido abscísico (ABA) (Asselbergh et al. 2008), citocininas (CK) (Walters e Mcroberts 2006), ácido salicílico (AS) (Loake e Grant 2007), etileno (ET) (Van Loon et al. 2006), jasmonatos (JA) (Pozo et al. 2007) e brassinosteróides (BR) (Nakashita 2003) são capazes de modular a resistência das plantas durante o contato com micro-organismos.

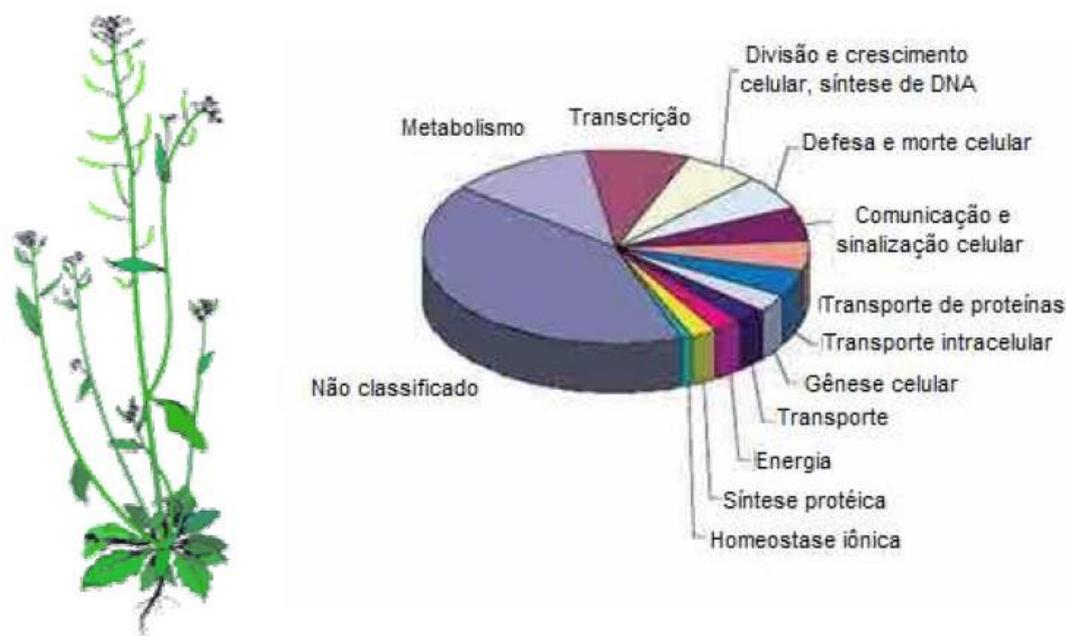
Recentemente, visando a compreensão de alguns mecanismos envolvidos na associação entre plantas de *A. thaliana* e a bactéria promotora do crescimento *Gluconacetobacter diazotrophicus*, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o hormônio SA pode ser um potencial modulador deste processo (de Souza et al., 2015). Neste trabalho, a linha transgênica de *A. thaliana* que degrada AS (NahG, Friedrich et al. 1995) obteve um ganho de biomassa expressivamente maior que a linhagem selvagem (Col-0). Diante do exposto, plantas de *A. thaliana* se mostram uma promissora ferramenta de estudo para compreensão dos mecanismos inerentes às associações planta-endófito.

## 2.5 *Arabidopsis thaliana*: organismo modelo para o estudo da associação entre plantas e micro-organismos

Descoberta no século XVI na Alemanha, período em que os estudos de Botânica e Taxonomia Vegetal passaram a ter uma maior visibilidade, *Arabidopsis thaliana* é descrita como membro constituinte da família da mostarda (Cruciferae ou Brassicaceae). *A. thaliana* possui uma série de atributos que a tornam um potencial modelo experimental: pequeno porte, ciclo de vida curto (5-6 semanas em condições ideais de crescimento), habilidade para crescer em condições controladas (em solo ou meio definido), alta fecundidade (produção de até 10.000 sementes por planta) e facilidade para geração de linhas mutantes e transgênicas. Seu genoma tem cerca de 120 Mb e está organizado em cinco cromossomos, contendo aproximadamente 22000 genes (Page e Grossniklaus 2002). Sua classificação atual é (NCBI, 2010):

- Reino:.....Plantae
- Divisão:.....Magnoliophyta
- Classe: .....Magnoliopsida
- Ordem: .....Brassicales
- Família: .....Brassicaceae
- Gênero: .....*Arabidopsis*
- Espécie: .....*Arabidopsis thaliana*

Em 2002 o sequenciamento do DNA genômico do ecótipo COL-0 foi concluído pelo grupo “The Arabidopsis Genome Initiative”, sendo *A. thaliana* a primeira planta e o terceiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado (Initiative 2000). As sequências completas foram depositadas em um banco de dados (The Arabidopsis Information Resource – TAIR – [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), permitindo o acesso da comunidade científica a diversas informações como estrutura, expressão e produtos gênicos, mapa do genoma, marcadores genéticos, germoplasma e publicações sobre a pesquisa na área (Huala et al. 2001).



**Figura 3.** Análise funcional dos genes de *Arabidopsis thaliana* (Nature, 2000).

Ao longo dos últimos anos, *A. thaliana* vem sendo utilizada como modelo para estudos em diversas áreas da Biologia Vegetal, como investigação de vias envolvidas no controle do desenvolvimento vegetal (Desbrosses et al. 2009), efeito da emissão de voláteis no biocontrole (Hung et al. 2013), regulação da biossíntese de ácidos graxos (Troncoso-Ponce et al. 2015), dentre outros aspectos. Além disso, esta espécie vegetal também vem sendo empregada para estudo das interações entre plantas e bactérias endofíticas, devido à possibilidade do uso de mutantes (Iniguez et al. 2005).

No âmbito das associações entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal, *A. thaliana* é, também, considerada um sistema modelo para estudos (O'Callaghan et al. 2001). A disponibilidade de linhas mutantes de *A. thaliana* garante a possibilidade de se testar hipóteses acerca do papel particular de genes envolvidos na colonização por bactérias promotoras do crescimento vegetal (O'Callaghan et al. 2001). Além disso, trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a bactéria promotora do crescimento vegetal *G. diazotrophicus* possui a capacidade de colonizar e promover o crescimento em plantas de *A. thaliana* (de Souza et al., 2015a), abrindo novas perspectivas para o estudo da interação BPCV-planta.

## 2.6 Proteômica como ferramenta de auxílio para compreensão das associações entre plantas e micro-organismos

Proteômica é definida como uma caracterização em larga escala de diferentes proteínas expressas por um organismo (Wilkins et al., 1995). O proteoma revela o estado momentâneo do funcionamento de um sistema sob condições fisiológicas específicas. Tal fato torna as análises proteômicas desafiadoras, visto que a expressão gênica ocorre de forma dinâmica a depender de distintas variáveis, como a condição ambiental, o estado de desenvolvimento e a presença de ativadores e/ou inibidores específicos.

Análises proteômicas vêm se tornando uma ferramenta interessante para a caracterização funcional em plantas. Devido ao progresso relativo à identificação de proteínas com alta sensibilidade, através de espectrometria de massas (MS, *mass spectrometry*), abordagens proteômicas abrem portas para novas concepções entorno da análise da complexidade funcional de plantas em diferentes níveis. Análises proteômicas fornecem insumos complementares para a compreensão acerca da expressão e regulação proteica durante associações planta-micro-organismos.

A espectrometria de massas é, hoje, uma plataforma tecnológica dominante para a maioria das análises proteômicas. Estudos envolvendo análises proteômicas têm como consequência a exploração de três vertentes básicas nas condições experimentais testadas, sendo estas: (1) a descoberta do papel de vias metabólicas específicas, (2) a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos e (3) a caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas produzidas e/ou reguladas durante uma situação específica.

Diversos grupos de pesquisa vêm investigando o papel de genes específicos regulados em plantas durante interações com micro-organismos. Contudo, trabalhos neste contexto direcionados ao entendimento de modificações proteômicas nas plantas hospedeiras ainda requerem maiores explorações.

Lery et al. (2010) demonstraram, por análise proteômica via espectrometria de massas quantitativa, que 78 proteínas são diferencialmente reguladas durante a associação entre plantas de cana-de-açúcar e a bactéria promotora do crescimento *G. diazotrophicus*. Além disso, ainda neste trabalho, 30 proteínas de *G. diazotrophicus* foram encontradas nas raízes das amostras de plantas, sendo

que, entre as proteínas identificadas, 9 foram especificamente induzidas por sinais da planta hospedeira.

Diante do exposto, análises proteômicas se mostram ferramentas em potencial no auxílio da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-micro-organismos. Os dados oriundos destas análises podem contribuir para a busca por medidas que viabilizem o aumento do uso de biofertilizantes, colaborando para o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito da inoculação de *Arabidopsis thaliana* com *Herbaspirillum seropedicae* no âmbito da promoção do crescimento, a partir de análises morfológicas e de análises das proteínas diferencialmente reguladas durante esta associação.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito da inoculação de *A. thaliana* selvagem com *H. seropedicae* HRC54 no âmbito da promoção do crescimento vegetal;
- ✓ Quantificar a população bacteriana bem como sua localização nos tecidos de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae*;
- ✓ Realizar análise proteômica comparativa de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae* através de análise LC-MS/MS;
- ✓ Estudar as principais vias diferencialmente reguladas em plantas de *A. thaliana*, mediante análise dos grupos proteicos induzidos e reprimidos durante a associação com *H. seropedicae*;

- ✓ Identificar as principais proteínas relacionadas com vias hormonais e de defesa vegetal induzidas após a inoculação de *A. thaliana* com *H. seropedicae* HRC54;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material biológico

#### 4.1.1 Micro-organismo e condições de cultivo

Para realização deste trabalho, foi utilizada a estirpe bacteriana *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 pertencente à Coleção de Culturas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares (LBCT/UENF).

*H. seropedicae* foi cultivada em meio DYGS modificado contendo em g.L<sup>-1</sup> : 2,0 glicose; 1,5 peptona bacteriológica; 2,0 extrato de levedura; 0,5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 3,75 ácido glutâmico; 5 mL azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH. Meio sólido: 15,0 ágar (RODRIGUES NETO, 1986; REIS et al., 1994). O pH inicial do meio será ajustado para 6,0 com KOH. (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). A cultura foi incubada sob condições controladas, em estufa e/ou shaker orbital (C25 Incubator – New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA) sob constante agitação (250 min<sup>-1</sup>, 30°C).

*H. seropedicae* contendo a proteína fluorescente DsRed (HS-F) foi obtida por eletroporação com o plasmídeo DsRed-pDE1001 (Rangel et al, 2016) e as colônias positivas foram selecionadas em meio DYGS contendo streptomomicina e spectinomomicina. A fluorescência vermelha foi confirmada através da utilização de um transiluminador DR-45M (DarkReader® – Clare Chemical Research).

Para o preparo de culturas estoque, uma colônia isolada de HS-F foi inoculada em meio DYGS suplementado com ácido málico (Rodrigues Neto et al., 1986). A cultura foi, então, cultivada sob constante agitação em shaker orbital até atingir a densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ) 1,0. Em seguida, 1 mL de cultura foram transferidos para tubos tipo Eppendorf de 2,0 mL e misturados com 1 mL de glicerol 50 %. A cultura estoque foi armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.1.2 Material vegetal e condições de cultivo**

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0, tipo selvagem) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Frederick Ausubel (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). As sementes foram submetidas à desinfestação superficial em etanol 95% durante um minuto, seguida de lavagem em solução de hipoclorito de sódio 50% sob agitação por 10 minutos. O excesso desses reagentes foi removido mediante lavagem abundante com água destilada. As sementes permaneceram imersas em água durante 48 horas sob temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , antes da semeadura, a fim da ocorrência da quebra da dormência.

A semeadura foi realizada em copos plásticos de 50 mL contendo substrato West Garden (West Garden Industria e Comércio LTDA) irrigados com água destilada. Este material foi acondicionado em bandejas cobertas com filme de PVC transparente, a fim de manter a umidade em nível elevado nos primeiros 10 dias, favorecendo a germinação. A sala de cultivo utilizada foi mantida sob temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 60% de umidade do ar e irradiância de  $120\text{ mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , durante 12 horas diárias.

#### **4.2 Inoculação**

Para o processo de inoculação, 10 mL da cultura estoque de HS-F foram transferidos para um frasco tipo Erlenmeyer de 50 mL contendo 40 mL de meio líquido DYGS e este foi submetido a uma constante agitação em shaker orbital a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  até que a cultura bacteriana atingisse a densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ) 1,0 [correspondendo a aproximadamente  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (CFU)/mL<sup>-1</sup>]. Após esta etapa, a densidade ótica da cultura bacteriana foi ajustada em meio DYGS líquido para  $DO_{600nm} 1 \times 10^4$  CFU/mL<sup>-1</sup>. Em seguida, 10 mL de

solução bacteriana foram dispostos em uma placa de petri. O tratamento controle foi representado por uma placa de petri contendo meio DYGS líquido.

Plantas de *A. thaliana* (Columbia-0) com 10 dias de idade provenientes de substrato foram utilizadas para realização do processo de inoculação. Para tanto, para cada tratamento, 36 plantas de cada foram retiradas do substrato e apenas suas raízes foram colocadas em contato direto com os tratamentos contidos nas diferentes placas de petri. Todas as placas foram conectadas a um sistema contendo uma bomba compressora de ar (Bomba Compressora Boyu para Aquários U-2800) a fim da manutenção do fornecimento de oxigênio para as plantas e para a cultura bacteriana.

Após 3 horas, as plantas foram, então, transferidas para potes de jardinagem de 200 mL contendo substrato West Garden previamente irrigados com água destilada. Este material foi acondicionado em bandejas cobertas com filme de PVC transparente, a fim de manter a umidade em nível elevado nos primeiros 10 dias. Após este período, o filme PVC transparente foi removido e as plantas foram irrigadas, em intervalo de dois dias, com solução de Hoagland modificada (EPSTEIN; BLOOM, 2004), até completar seu ciclo final. O pH da solução foi ajustado para 6,5. A sala de cultivo utilizada foi mantida sob temperatura de 22 °C, 60 % de umidade do ar e irradiância de 120 mol.fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, durante 12 horas diárias

### **4.3 Avaliações do crescimento vegetal**

#### **4.3.1 Área foliar da roseta**

Todas as plantas de cada tratamento foram avaliadas quanto a área foliar total da roseta no meio (15 dpi) e ao final da condução do ensaio de inoculação (30 dpi). A área foliar total foi mensurada através da utilização do software *Easy Leaf Area* (Easlon & Bloom, 2014).

#### **4.3.2 Matérias fresca e seca**

As partes aéreas e radiculares das plantas foram coletadas separadamente para determinação da massa de matéria seca e úmida (matéria fresca). A massa fresca foi determinada por meio de pesagem da parte aérea e radicular utilizando-

se balança analítica, imediatamente após a coleta. A massa seca foi obtida pela pesagem dos mesmos, após o processo de secagem em estufa a 70 °C por 24 horas.

#### **4.4 Determinação da população microbiana nos tecidos vegetais**

Para determinação da população bacteriana no interior dos tecidos vegetais, foi realizada uma contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no interior dos tecidos 30 dias após a inoculação. Para análise da população bacteriana na parte aérea, foram retirados dois discos foliares da parte aérea (0.5 cm de diâmetro) de 3 plantas de cada tratamento. As amostras de folhas foram, então, desinfestadas superficialmente pela imersão em etanol 70% durante 3 min seguida de lavagem em água ultrapura 3 vezes. Posteriormente, os discos foliares foram macerados em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL estéril contendo 100 µL de água ultrapura estéril. Diluições seriadas foram realizadas.

Para análise da população bacteriana na área radicular, 3 plantas de cada tratamento foram submetidas, primeiramente, a uma lavagem em água corrente a fim da remoção do substrato. Cada raiz foi, então, pesada em balança analítica e, posteriormente, macerada em almofariz contendo 3 mL de água ultrapura estéril. Em seguida, 1 mL de cada tecido macerado foi transferido para tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL. Após este processo, as amostras foram diluídas de forma seriada.

As amostras maceradas de plantas inoculadas com *H. seropedicae* foram plaqueadas em meio sólido JNFb (BALDANI, 1996). As placas foram incubadas sob temperatura de 30 °C durante 4 dias.

#### **4.5 Análises em microscopia de fluorescência**

30 dias após o processo de inoculação, cinco plantas de tamanhos equivalentes foram selecionadas para análises em microscopia de fluorescência. Regiões das raízes de 3,0 cm de comprimento foram analisadas. Para tanto, as plantas foram removidas do substrato, suas raízes foram lavadas cuidadosamente e, posteriormente, lâminas foram preparadas para observação. As amostras foram analisadas em um microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 200; Carl Zeiss,

Jena, Germany) conectado a um sistema de captura de imagem e a um Sistema de excitação de luz (568 nm; filtro de emissão  $640 \pm 60$  nm) para visualização da bactéria contendo a proteína fluorescente DsRed.

## 4.6 Análise proteômica

As proteínas diferencialmente acumuladas em folhas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae* foram avaliadas por análise proteômica. Para essa avaliação, 18 plantas provenientes de cada tratamento do ensaio descrito no item 4.2 foram utilizadas. Estas plantas foram, então, separadas em 3 grupos de 6 plantas. As partes aéreas de cada grupo foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL.

### 4.6.1 Extração de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais foi utilizado o protocolo descrito por (Natarajan et al., 2005) modificado. Para tanto, adicionou-se 1 mL de tampão de extração TCA/Acetona (ácido tricloroacético 10% em acetona com 20 mM de ditionitrito - DTT) e mantidas sob agitação constante a 4 °C por 60 min. Em seguida, foram incubadas por 60 min a -20 °C e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 g a 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado três vezes pela adição de acetona gelada contendo 20 mM de DTT, breve agitação e centrifugação a 12.000 g por 5 min, 4 °C. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet secou à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min. Os pellets foram ressuspensos em 0,7 mL de tampão ureia/tioureia ( 7M ureia, 2M tioureia, 1% DTT, 2% triton X-100, 5µM pepstatina, 1mM fenilmetanosulfonilfluorídrico – PMSF) e mantidos sob agitação até completa homogeneização das amostras. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante proveniente desta centrifugação foi coletado e as proteínas totais foram quantificadas.

#### 4.6.2 Quantificação do conteúdo de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi estimada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, UK) segundo recomendações do fabricante. A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão com soro de albumina bovina (BSA, GE Healthcare, UK) foi realizada em leitor de microplacas Synergy 2 Multimode Reader (Biotek Instruments, USA) a 480 nm. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até as análises proteômicas.

#### 4.6.3 Digestão das proteínas

Antes da etapa de digestão triptica, as amostras normalizadas contendo 100 µg de proteínas totais foram dessalinizadas pelo uso da membrana Amicon Ultra-0,5 3KDa (Merck Millipore Corp., Alemanha) utilizando bicarbonato de amônio a 50 mM pH 8,5 como tampão de lavagem. As membranas contendo as amostras foram completadas até sua capacidade máxima com bicarbonato de amônio e centrifugadas a 15.000 g por 10 min a 20 °C. Esse procedimento foi repetido por mais sete vezes. Na última lavagem, as membranas foram centrifugadas até atingir aproximadamente 50 µL de amostra.

A metodologia utilizada para digestão de proteínas foi realizada conforme descrito por Calderan-Rodrigues et al. (2014). Para tanto, foram adicionados 25 µL de 0,2% (v/v) de Rapigest® (Waters, CT, USA) às amostras previamente obtidas, que foram vortexadas por 5 s e aquecidas em um Thermomixer® (Eppendorf, Alemanha) durante 15 min a 80 °C. Então, 2,5 µL de DTT 100 mM foi adicionado a cada amostra e os tubos foram incubados a 60 °C por 30min sob agitação no Thermomixer®. Adicionou-se 2,5 µL de iodoacetoamida 300 mM, seguido de agitação por 5 s e posterior incubação a temperatura ambiente no escuro por 30 min. Posteriormente, a digestão foi realizada pela adição de 20 µL de solução de tripsina 50 ng/µL (Promega, WI, USA) preparado em tampão bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram incubadas a 37 °C *overnight*. Para a precipitação do Rapigest®, 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (v/v) foi adicionado e os tubos incubados por 30 min a 37 °C, seguido de centrifugação por 30 min a 15.000 g, a 8 °C. As amostras digeridas foram, então transferidas para frascos tipo Total Recovery (Waters, CT, USA).

#### 4.6.4 Análise LC-MS/MS

As análises de shotgun foram realizadas pelo sistema nanoAcquity UPLC acoplado ao espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters, CT, USA) usados para análises ESI-QTOF HDMSE de acordo Reis et al. (2016). A etapa cromatográfica foi realizada pela injeção de 1  $\mu\text{L}$  das amostras digeridas para a normalização antes da quantificação relativa de proteínas. A normalização de cada amostra foi baseada nas mensurações estequiométricas das contagens de íons totais das corridas de scouting que antecedeu as análises, com o intuito de garantir valores molares padronizados para todas as condições. Posteriormente, as corridas consistiram de injeção normalizada de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de proteínas totais digeridas por amostra biológica. Durante a separação, as amostras foram carregadas na coluna nanoAcquity UPLC 5  $\mu\text{m}$  C18 (180  $\mu\text{m}$  x 20 mm) a 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  durante 3 min e depois para a coluna analítica de fase reversa nanoAcquity HSS T3 1.8  $\mu\text{m}$  (75  $\mu\text{m}$  x 150 mm) a 500  $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ , com a temperatura de coluna de 45  $^{\circ}\text{C}$ . Para eluição dos peptídeos, utilizou-se um gradiente binário que consistiu de água MS e ácido fórmico 0,1% como fase móvel A e de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico como fase móvel B. A eluição de gradiente iniciou-se a 7% da fase móvel B e manteve-se durante 3 min, quando aumentou de 7% para 40 % até 90 min e de 40% a 85% até 94 min, mantendo-se a 85% até 98 min. O espectrômetro de massas foi operado em modo de resolução (modo V) e positivo com mobilidade iônica; transferência de energia de colisão de 19 a 45 V, no modo de alta energia; cone de tensão e capilar de 30 V e 2800 V, respectivamente e temperatura da fonte de 70  $^{\circ}\text{C}$ . Em parâmetros TOF, o tempo de verificação foi definido para 0.5 s, em modo contínuo com um intervalo de massa de 50 a 2000 Da. A [GLu1]-fibrinopeptídeo B humana a 100  $\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  foi utilizada como calibrador externo e a aquisição de sua massa realizada a cada 30 s.

#### 4.7 Análises e interpretação dos dados

A análise estatística dos dados obtidos foram realizados pelo software GraphPad Prism (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego

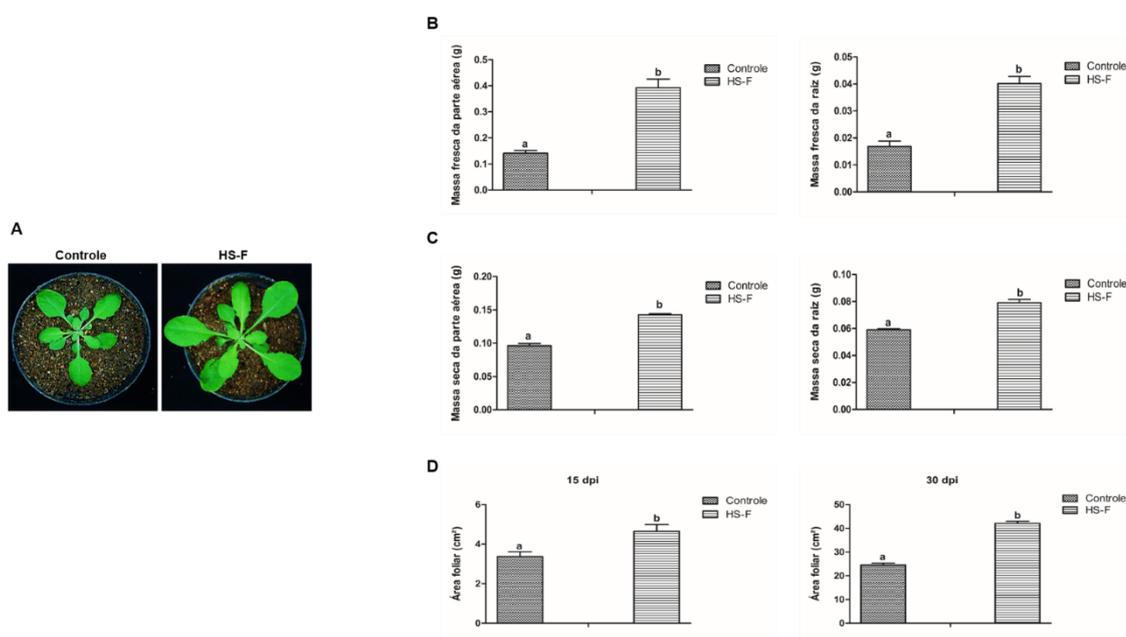
California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Os dados e gráficos gerados no decorrer da execução dos experimentos foram com o auxílio do software Microsoft Excel® 2013.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da eficiência de *H. seropedicae* em promover o crescimento em plantas de *A. thaliana*

Com o intuito de verificar a capacidade de *H. seropedicae* de promover o crescimento em plantas de *A. thaliana*, ensaios de inoculação foram realizados. Como resultado destes ensaios (Figura 4), pode ser observado que as plantas inoculadas com *H. seropedicae* apresentaram melhores performances em todos os parâmetros analisados. As plantas inoculadas apresentaram um ganho de massa fresca de parte aérea e de raiz de 35% e 42,5%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 10 B). Um ganho de massa também foi observado durante as análises de massa seca, onde as plantas inoculadas obtiveram um ganho de massa seca de parte aérea e de raiz de 64% e 75%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 10 C).

Adicionalmente, análises de área foliar total das rosetas foram realizadas aos 15 dpi e aos 30 dpi. Como resultado, aos 15 dpi e aos 30 dpi as plantas inoculadas apresentaram 73% e 35%, respectivamente, de ganho no tamanho da área total das rosetas, em relação ao controle (Figura 10 D).



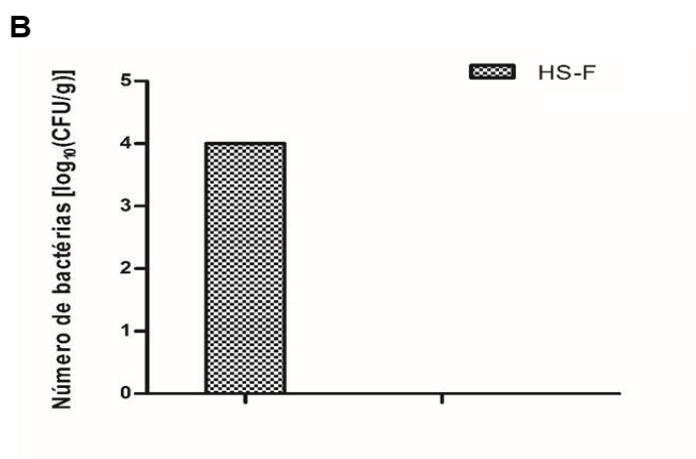
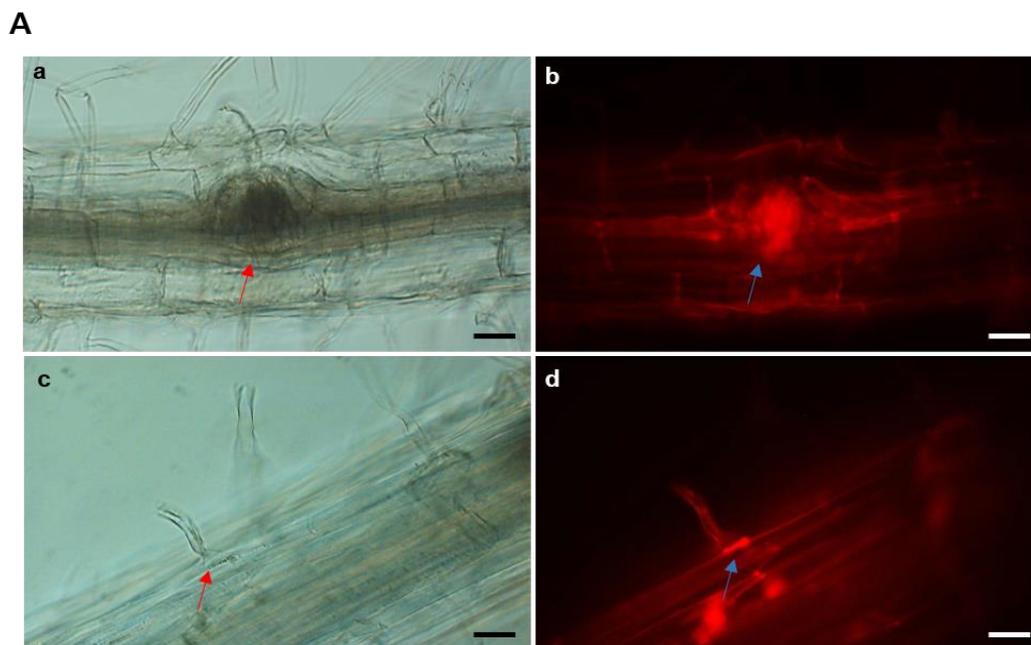
**Figura 4.** Análises da promoção do crescimento em plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae*. Plantas de *A. thaliana* foram inoculadas aos 10 dias de idade com a bactéria *H. seropedicae*. O ensaio foi conduzido até os 30 dias após a inoculação, quando foi, então, registrado (A) e avaliado nos seguintes parâmetros: massa fresca da parte aérea e da parte radicular (A); e massa seca da parte aérea e da parte radicular (B). A área foliar total das rosetas foi mensurada aos 15 dpi e aos 30 dpi (D). As letras diferentes nos gráficos indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

## 5.2 Avaliação da eficiência de colonização de *H. seropedicae* em raízes de plantas de *A. thaliana*

Com o objetivo de validar a colonização de *H. seropedicae* em plantas de *A. thaliana* inoculadas e detectar os locais de formação de colônia bacteriana, análises em microscópio de luz e microscópio de fluorescência foram realizadas. Foi possível observar a formação de colônias de *H. seropedicae* nas raízes de *A. thaliana*, preferencialmente nas regiões de brotamento de raiz lateral (Figuras 5 Aa; 5 Ab) e nas bases de pelos radiculares (Figuras 5 Ac ; 5 Ad).

Além disso, a fim da obtenção de uma estimativa da população de *H. seropedicae* nos tecidos de plantas de *A. thaliana* inoculadas, ensaios de UFC foram realizados. Como resultado, pôde-se observar que não houve colonização detectável na parte aérea das plantas inoculadas. Em contrapartida, reafirmando os dados obtidos nas análises de microscopia, na região radicular foi possível

detectar unidades formadoras de colônia, em uma quantidade de aproximadamente  $1,7 \times 10^4$  UFC/g (Figura 5 B).



**Figura 5.** Localização e quantificação da população de *H. seropedicae* em raízes de *A. thaliana* aos 30 dpi. Plantas de 10 dias de idade de *A. thaliana* foram inoculadas com a estirpe bacteriana *H. seropedicae* HS-F que expressa a proteína DsRed fluorescente. Aos 30 dpi, observações em microscopia de luz e microscopia de fluorescência permitiram a detecção da presença da bactéria nas regiões de brotamento de raízes laterais (Aa ; Ab) e na base de pelos radiculares (Ac ; Ad). As setas indicam a localização das colônias bacterianas. O número de bactérias presentes nas raízes aos 30 dpi foi analisado através do ensaio de UFC (B). As barras de escala medem 20 μm.

### 5.3 Influência da associação com *H. seropedicae* sobre os perfis proteômicos de folhas de plantas de *A. thaliana*

Com o objetivo de avaliar as alterações sobre o perfil proteômico de plantas de *A. thaliana*, induzidas pela associação com *H. seropedicae*, ensaios de análises proteômicas comparativas no tecido foliar foram conduzidos. As análises foram baseadas na quantificação relativa de proteínas entre plantas inoculadas com *H. seropedicae* e plantas controle, através da técnica de “Shotgun” via espectrometria de massas.

Foram identificadas 1881 proteínas nas amostras provenientes de folhas, Tabela Suplementar 1. Destas, 9,4% foram diferencialmente reguladas durante a associação com *H. seropedicae*, sendo 44 negativamente reguladas e 132 positivamente reguladas (Figura 7 A).

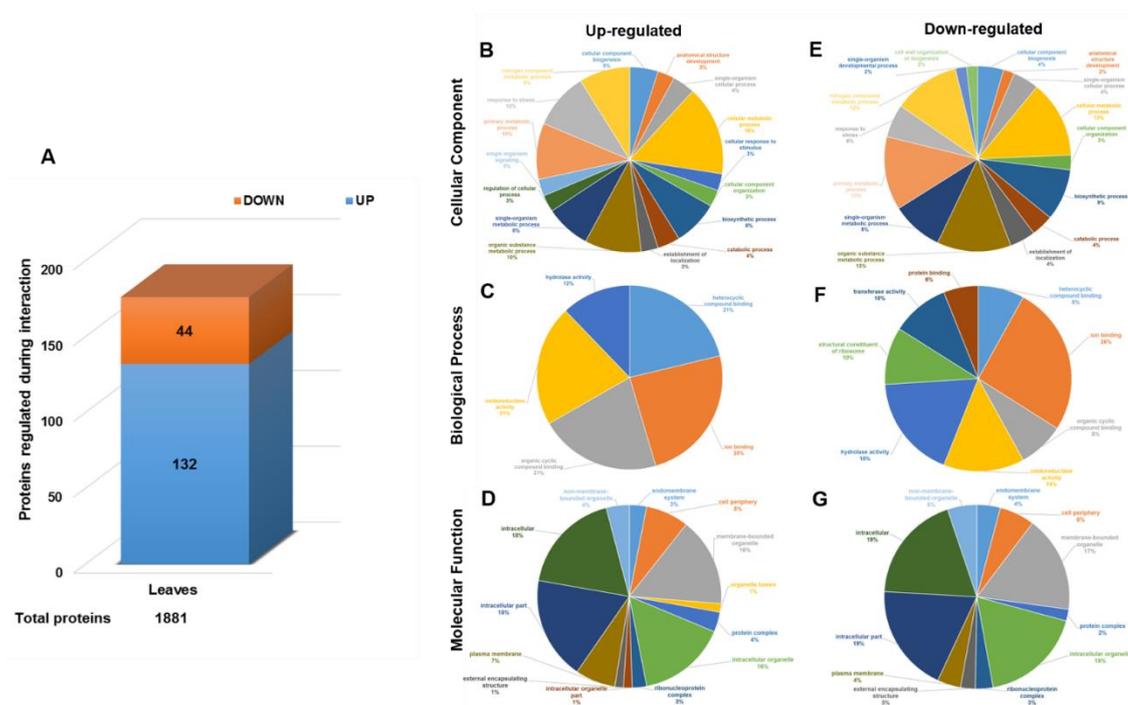
Os processos biológicos regulados em folhas de *A. thaliana*, durante a interação com *H. seropedicae*, foram analisados após a identificação das proteínas diferencialmente reguladas. Para tanto, a classificação funcional foi realizada pelo programa Blast2Go, onde as proteínas foram classificadas em positiva e negativamente reguladas dentro dos processos biológicos nos quais participam. Uma mesma proteína pode participar em mais de uma via.

A classificação funcional das proteínas positivamente reguladas na presença de *H. seropedicae* foi conduzida através de três critérios principais: Componentes Celulares (16 classes), Processos Biológicos (5 classes) e Funções Moleculares (13 classes).

A aplicação do processo “Componentes Celulares” agrupou as proteínas positivamente reguladas em 16 classes (Figura 7 B), sendo estas: Processo metabólico de compostos nitrogenados (9%), Resposta a estresse (10%), Processo metabólico primário (10%), Sinalização pertencente a um organismo único (3%), Regulação de processos celulares (3%), Processos metabólicos pertencentes a um único organismo (8%), Processo metabólico de substâncias orgânicas (10%), Estabelecimento de localização (3%), Processos catabólicos (4%), Processos biossintéticos (8%), Componente da organização celular (3%), Resposta celular a estímulos (3%), Processos metabólicos celulares (16%), Processos celulares pertencentes a um único organismo (4%), Desenvolvimento de estruturas anatômicas (3%) e Biogênese de componentes celulares (5%).

Para o critério “Processos Biológicos” as proteínas positivamente reguladas foram classificadas em 5 classes (Figura 7 C), sendo estas: Atividade hidrolase (12%), Atividade oxidoreductase (21%), Componente obrigatório do ciclo orgânico (21%), Ligação iônica (25%), Compostos heterocíclicos (21%).

Já para o critério “Funções Moleculares” as proteínas positivamente reguladas foram distribuídas em 13 classes (Figura 7 D), sendo estas: Organela independente da membrana (4%), Intracelular (18%), Parte intracelular (18%), Membrana plasmática (7%), Estrutura externa de encapsulamento (1%), Organela da parte intracelular (1%), Complexo ribonucleoprot ico (3%), Organela intracelular (16%), Complexo proteico (4%), Organela do lúmen (1%), Organela ligada a membrana (16%), Periferia celular (8%) e Sistema endomembrana (3%).



**Figura 7.** Proteínas reguladas em folhas de *A. thaliana* durante a intera o com *H. seropedicae*. As proteínas totais identificadas em folhas de plantas *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae* foram categorizadas em positivamente reguladas e negativamente reguladas (A). Posteriormente, foi realizada uma classifica o funcional das proteínas reguladas, nos seguintes critérios: Componentes Celulares (B ; E), Processos Biológicos (C ; F) e Funções Moleculares (D ; G).

A avalia o da classifica o funcional das proteínas negativamente reguladas, Figuras 7 E, F e G, também possibilitou a classifica o em três principais

critérios: “Componentes Celulares” (15 classes), “Processos Biológicos” (8 classes) e “Funções Moleculares” (11 classes).

A aplicação do processo “Componentes Celulares” agrupou as proteínas negativamente reguladas em 15 classes (Figura 7 E), sendo estas: Organização ou biogênese da parede celular (2%), Processos de desenvolvimento relacionados a um único organismo (2%), Processos metabólicos de compostos nitrogenados (12%), Resposta a estresse (6%), Processos metabólicos primários (13%), Processo metabólico relacionado a um único organismo (9%), Processos metabólicos de substâncias orgânicas (13%), Estabelecimento de localização (4%), Processos catabólicos (4%), Processos biossintéticos (9%), Organização de componentes celulares (3%), Processo metabólico celular (13%), Processo celular pertencente a um único organismo (4%), Desenvolvimento de estrutura anatômica (2%), Biogênese de componentes celulares (4%).

Para o critério “Processos Biológicos” as proteínas negativamente reguladas foram classificadas em 8 classes (Figura 7 F), sendo estas: Ligação proteica (6%), Atividade transferase (10%), Componente estrutural do ribossomo (10%), Atividade hidrolase (18%), Atividade oxidoreductase (14%), Componente obrigatório do ciclo orgânico (8%), Ligação iônica (28%) e Compostos heterocíclicos (8%).

Já para o critério “Funções Moleculares” as proteínas negativamente reguladas foram distribuídas em 11 classes (Figura 7 G), sendo estas: Organela independente da membrana (8%), Intracelular (19%), Parte intracelular (19%), Membrana plasmática (4%), Estrutura externa de encapsulamento (3%), Complexo ribonucleoproteico (3%), Organela intracelular (18%), Complexo proteico (2%), Organela ligada à membrana (17%), Periferia celular (6%) e Sistema endomembrana (4%).

#### **5.4. Caracterização das principais vias reguladas em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae***

Com o intuito de caracterizar de uma forma mais específica as principais vias reguladas em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae*, o conjunto de proteínas diferencialmente expresso foi analisado pelo software MapMan. Este software é amplamente utilizado para análise de dados de transcriptômica, sequenciamento e, mais recentemente, de proteômica. Entre as

opções fornecidas pelo software, os critérios utilizados para este trabalho foram “Estresse biótico”, “Visão geral do metabolismo” e “Cloroplasto”.

#### **5.4.1. Regulação das proteínas envolvidas com a resposta a estresses bióticos**

Visando avaliar a regulação das vias de resposta a estresses bióticos, o critério *Biotic stress* foi selecionado no software MapMan. Os resultados observados na figura 7B e 7C demonstram que, entre as proteínas relacionadas a vias específicas de resposta a estresse, 10% foram positivamente reguladas e 6% foram negativamente reguladas durante a associação com *H. seropedicae*.

Ao analisarmos o conjunto total de proteínas reguladas quanto à participação na resposta a estresses bióticos, Figura 8, foi possível identificar as principais vias reguladas dentro deste contexto. A avaliação da via de resposta a “estresse abiótico” permitiu constatar a regulação de 24 proteínas relacionadas à tal resposta. Entre estas, 21 proteínas foram positivamente reguladas, sendo as principais *Cold-Regulated AtCOR47*, Proteína osmotina-*like* e Proteína germinina-*like*, com níveis de indução de 2,54; 2,4; e 2,18 vezes em relação as amostras controle, respectivamente (Tabela 1).

Nas vias associadas à manutenção do estado redox, 24 proteínas foram reguladas. Entre estas, 23 proteínas foram positivamente reguladas, sendo as principais Proteína da família da ferredoxina-tiorredoxina redutase, AtTHX – Tiorredoxina X e AtPX1 – Glutathione Peroxidase 1, com níveis de indução de 1,6; 1,3; e 0,9; respectivamente (Tabela 1). Além disso, 2 peroxidases foram positivamente reguladas, AtPRXR1 Peroxidase e AtPERX34 Peroxidase, com níveis de indução de 2,38 e 0,42, respectivamente (Tabela 1). Adicionalmente, observa-se a regulação positiva de 2 proteínas da família das Glutathione-S-Transferases, sendo estas AtGST1 e AtGST6, com níveis de indução de 1,1 e 0,3, respectivamente (Tabela 1).

Na via de sinalização celular, 16 proteínas foram reguladas, sendo 9 positivamente reguladas. Entre estas, destacam-se as proteínas RanBP1b, uma Proteína homóloga a AtGTPase e AtCAM2 – Proteína moduladora de Cálcio, com níveis de indução de 1,36; 1,1 e 0,93; respectivamente (Tabela 1).

Na via de resposta a choque térmico 3 proteínas foram positivamente reguladas: Proteína transportadora ABC (*ATP-binding*), AtJ3 – Proteína chaperona

dnaJ3 e AtCR88 *ATP-binding*, com níveis de indução de 1,23; 1,22 e 0,23; respectivamente (Tabela 1).

Na via do metabolismo de metabólitos secundários, 10 proteínas foram reguladas, sendo 6 positivamente reguladas. Entre estas, destacam-se AtCAD5 – Cinnamyl Alcohol Dehidrogenase, AtUDP-glicosiltransferase e AtPAL1 – Fenilalanina Amonia-Liase, com níveis de indução de 1,9; 0,9 e 0,7; respectivamente (Tabela 1).

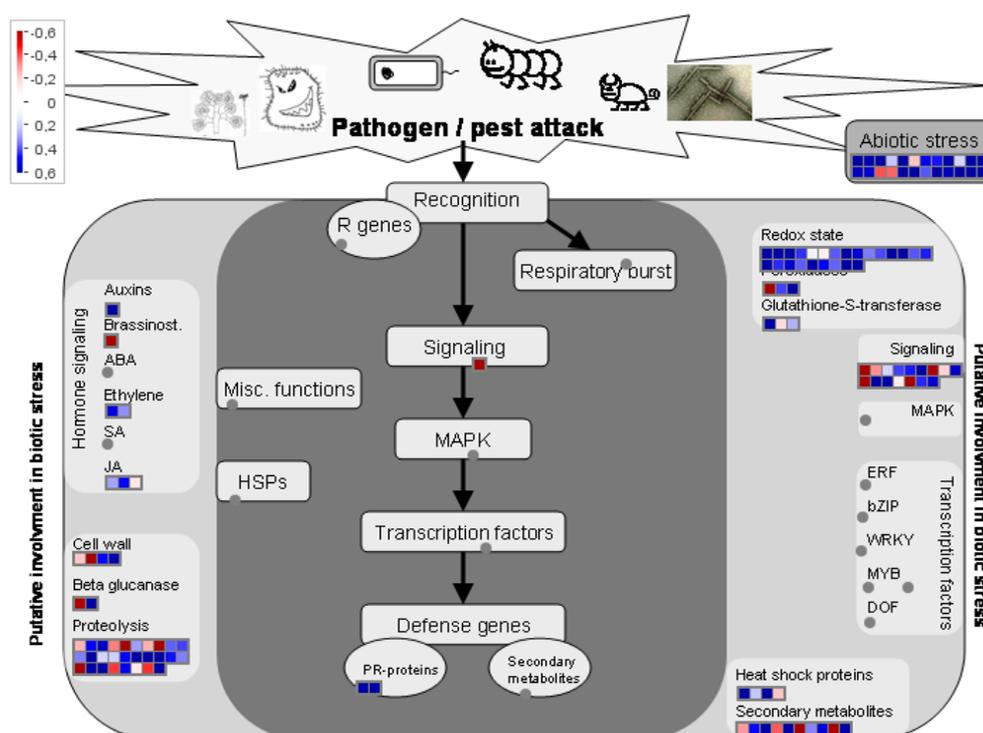
No âmbito da sinalização hormonal, é possível observar a regulação positiva de proteínas relacionadas aos hormônios auxina, etileno e ácido jasmônico. A proteína regulada positivamente relacionada a auxina foi uma Proteína relacionada com dormência e auxinas com nível de indução de 1,2 (Tabela 1). Na sinalização do hormônio etileno, duas proteínas foram positivamente reguladas, sendo estas AtEFE – Enzima Formadora de Etileno e AtACO2 – ACC Oxidase 2, com níveis de indução de 0,53 e 0,32, respectivamente (Tabela 1). Já na via de sinalização de ácido jasmônico, 2 proteínas foram positivamente reguladas, sendo estas AtAOC3 – Aleno Óxido Ciclase e AtAOS – Aleno oxido Sintetase, com níveis de indução de 0,5 e 0,3, respectivamente (Tabela 1).

A análise do conjunto proteico relacionado à parede celular vegetal permitiu a detecção de 2 proteínas positivamente reguladas, uma Pectinacetilsterase e AtPME3 – Pectinesterase, com níveis de indução de 0,6 e 0,5, respectivamente (Tabela 1). Além disso, 28 proteínas relacionadas a Proteólise foram reguladas, sendo 19 positivamente reguladas. Entre estas, destacam-se a AtRPN10 – Partícula Regulatória-ATPase 10, Subunidade p42D do complexo regulatório do proteassomo e AtFTSH1 Protease 1, com níveis de indução de 2,2; 1,4 e 0,8; respectivamente.

Adicionalmente, observa-se a regulação positiva de 2 proteínas *Pathogenesis Related* (PRs), sendo estas uma Proteína de resposta de resistência a doenças e uma Proteína da família *Leucine-Rich Repeat* (LRR), com níveis de indução de 0,85 e 0,8; respectivamente (Tabela 1).

Entre as principais proteínas negativamente reguladas relacionadas a estresses bióticos constatadas, estão uma proteína relacionada à formação de parede celular, AtASD1, com nível de repressão de -0,605; uma proteína relacionada ao metabolismo de brassinosteroides, AtDWARF1, com nível de repressão de -0,596; uma proteína relacionada ao processo de proteólise, AtASK2,

com nível de repressão de -2,202; uma proteína de sinalização de estresse biótico, AtPEP7 – Peptídeo Elicitor 7, com nível de repressão de -1,535; e uma proteína relacionada ao processamento de metabólitos secundários, AtTGG1 – Tioglicosídeo Glicohidrolase 1, com nível de repressão de -4,63 (Tabela1).



**Figura 8.** Modelo de visualização de proteínas diferencialmente reguladas envolvidas na resposta a estresses. MapMan *Biotic stress* das proteínas diferencialmente reguladas em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae*. Cada quadrado representa uma proteína. As proteínas positivamente reguladas, em relação ao controle, são indicadas em escala azul; e negativamente reguladas, em escala de vermelho.

**Tabela 1.** Descrição das proteínas reguladas visualizadas no MapMan *Biotic stress*.

Abiotic Stress						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
20.2	stress.abiotic	at2g28790	Transcript	osmotin-like protein, putative   chr2:12354430-12355431 REVERSE		2,429
20.2	stress.abiotic	at3g47860	Transcript	apolipoprotein D-related   chr3:17656670-17658316 REVERSE		0,586
20.2.1	stress.abiotic.heat	at1g79920	Transcript	ATP binding   chr1:30058632-30062744 REVERSE		1,231
20.2.1	stress.abiotic.heat	at2g04030	Transcript	Symbols: CR88, EMB1956, HSP90.5   CR88; ATP binding   chr2:1281841-1286104 FORWARD		0,228
20.2.1	stress.abiotic.heat	at3g44110	Transcript	Symbols: ATJ3, ATJ   ATJ3; protein binding   chr3:15868794-15871256 REVERSE		1,22
20.2.1	stress.abiotic.heat	at5g49910	Transcript	Symbols: CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70-2, HSC70-7   CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70-2 (C		-0,23
20.2.2	stress.abiotic.cold	at4g38680	Transcript	Symbols: GRP2, CSDP2, CSP2, ATCSP2   GRP2 (GLYCINE RICH PROTEIN 2); double-stranded DNA bindi		0,505
20.2.2	stress.abiotic.cold	at5g52300	Transcript	Symbols: RD29B, LTI65   LTI65 (LOW-TEMPERATURE-INDUCED 65)   chr5:21237056-21239529 FORWA		0,464
20.2.3	stress.abiotic.drought/salt	at1g13930	Transcript	Involved in response to salt stress. Knockout mutants are hypersensitive to salt stress.   chr1:4761042-476172		1,036
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g18980	Transcript	germin-like protein, putative   chr1:6557254-6558045 REVERSE		0,199
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g20440	Transcript	Symbols: COR47, RD17   COR47 (COLD-REGULATED 47)   chr1:7084409-7085772 REVERSE		2,537
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g20450	Transcript	Symbols: LTI29, LTI45, ERD10   ERD10 (EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 10); actin binding   chr1		1,489
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g23130	Transcript	Bet v I allergen family protein   chr1:8200383-8201235 FORWARD		0,559
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g24020	Transcript	Symbols: MLP423   MLP423 (MLP-LIKE PROTEIN 423)   chr1:8500451-8501520 REVERSE		0,547
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g68300	Transcript	universal stress protein (USP) family protein   chr1:25598331-25599357 REVERSE		-0,4
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g70840	Transcript	Symbols: MLP31   MLP31 (MLP-LIKE PROTEIN 31)   chr1:26712982-26714066 REVERSE		-0,375
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g70890	Transcript	Symbols: MLP43   MLP43 (MLP-LIKE PROTEIN 43)   chr1:26725626-26726544 REVERSE		0,795
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at1g76180	Transcript	Symbols: ERD14   ERD14 (EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION 14); calcium ion binding   chr1:2858677		0,745
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at2g01520	Transcript	Symbols: MLP328   MLP328 (MLP-LIKE PROTEIN 328); copper ion binding   chr2:235925-237147 FORWAF		0,393
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at3g05950	Transcript	germin-like protein, putative   chr3:1781067-1782007 REVERSE		2,176
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at3g26450	Transcript	major latex protein-related / MLP-related   chr3:9681298-9683434 REVERSE		0,569
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at4g23670	Transcript	major latex protein-related / MLP-related   chr4:12332560-12333804 REVERSE		1,921
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at4g27320	Transcript	Symbols: ATPHOS34, PHOS34   universal stress protein (USP) family protein   chr4:13678464-13680924 RE		0,716
20.2.99	stress.abiotic.unspecified	at5g54430	Transcript	Symbols: ATPHOS32, PHOS32   universal stress protein (USP) family protein   chr5:22097166-22099758 RE		0,988
Hormone Signaling						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
17.2.3	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	at2g33830	Transcript	dormancy/auxin associated family protein   chr2:14309484-14310351 REVERSE		1,172
17.3.1.2.8	hormone metabolism.brassinosteroid.synthesis-degradation.sterols.DWF1	at3g19820	Transcript	Symbols: DWF1, DIM, EVE1, DIM1, CBB1   DWF1 (DWARF 1); calmodulin binding / catalytic   chr3:6879617		-0,596
17.5.1.2	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation.1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	at1g05010	Transcript	Symbols: EFE, ACO4, EAT1   EFE (ETHYLENE-FORMING ENZYME); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate o		0,526
17.5.1.2	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation.1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	at1g62380	Transcript	Symbols: ACO2, ATACO2   ACO2 (ACC OXIDASE 2); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase   chr1:230		0,32
17.7.1.3	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.allene oxidase synthase	at5g42650	Transcript	Symbols: AOS, CYP74A, DDE2   AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE); allene oxide synthase/ hydro-lyase/ oxy		0,289
17.7.1.4	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.allene oxidase cyclase	at3g25780	Transcript	Symbols: AOC3   AOC3 (ALLENE OXIDE CYCLASE 3); allene-oxide cyclase   chr3:9409290-9410567 FORW		0,478
17.7.3	hormone metabolism.jasmonate.induced-regulated-responsive-activated	at3g16460	Transcript	jacalin lectin family protein   chr3:5592582-5595710 FORWARD		-0,15

Tabela 1. Cont.

Cell Wall						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
10.5	cell.wall.cell wall proteins	at3g48530	Transcript	Symbols: KING1   KING1 (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE REGULATORY SUBUNIT GAMMA 1)   chr3:		-0,231
10.6.2	cell.wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	at3g10740	Transcript	Symbols: ASD1, ARAF1, ARAF, ATASD1   ASD1 (ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDASE 1); alpha-N-arabino		-0,605
10.8.1	cell.wall.pectin*esterases.PME	at3g14310	Transcript	Symbols: ATPME3   ATPME3; pectinesterase   chr3:4771902-4775119 REVERSE		0,481
10.8.2	cell.wall.pectin*esterases.acetyl esterase	at5g45280	Transcript	pectinacetylerase, putative   chr5:18345595-18349695 FORWARD		0,59
Proteolysis						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
29.5	protein.degradation	at1g63770	Transcript	peptidase M1 family protein   chr1:23657506-23664243 REVERSE		-0,26
29.5	protein.degradation	at1g79340	Transcript	Symbols: AtMC4   AtMC4 (metacaspase 4); cysteine-type peptidase   chr1:29842771-29844638 FORWARD		0,481
29.5	protein.degradation	at2g24200	Transcript	cytosol aminopeptidase   chr2:10286806-10289555 REVERSE		0,56
29.5	protein.degradation	at3g51260	Transcript	Symbols: PAD1   PAD1 (20s proteasome alpha subunit pad1); endopeptidase/ peptidase/ threonine-type endo		-0,346
29.5	protein.degradation	at4g30910	Transcript	cytosol aminopeptidase family protein   chr4:15042413-15045315 REVERSE		-5,818
29.5	protein.degradation	at5g02240	Transcript	binding / catalytic/ coenzyme binding   chr5:451423-453157 FORWARD		0,298
29.5	protein.degradation	at5g51540	Transcript	metalloendopeptidase   chr5:20932031-20936413 FORWARD		-0,267
29.5.1	protein.degradation.subtilases	at4g21650	Transcript	subtilase family protein   chr4:11501198-11504678 REVERSE		-0,785
29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	at1g29090	Transcript	peptidase C1A papain family protein   chr1:10162983-10164452 REVERSE		0,382
29.5.3	protein.degradation.cysteine protease	at5g12140	Transcript	Symbols: ATCYS1   ATCYS1 (A. thaliana cystatin-1); cysteine-type endopeptidase inhibitor   chr5:3922909-39		0,417
29.5.4	protein.degradation.aspartate protease	at1g11910	Transcript	aspartyl protease family protein   chr1:4016784-4020983 REVERSE		0,341
29.5.4	protein.degradation.aspartate protease	at3g51350	Transcript	aspartyl protease family protein   chr3:19060322-19063510 REVERSE		0,62
29.5.5	protein.degradation.serine protease	at3g27925	Transcript	Symbols: DEGP1, Deg1   DEGP1 (DegP protease 1); serine-type endopeptidase/ serine-type peptidase   chr3:		0,202
29.5.5	protein.degradation.serine protease	at4g20850	Transcript	Symbols: TPP2   TPP2 (TRIPEPTIDYL PEPTIDASE II); tripeptidyl-peptidase   chr4:11160721-11169889 REV		0,208
29.5.5	protein.degradation.serine protease	at5g45390	Transcript	Symbols: CLPP4, NCLPP4   CLPP4 (CLP PROTEASE P4); serine-type endopeptidase   chr5:18396302-1839		0,484
29.5.7	protein.degradation.metalloprotease	at1g50250	Transcript	Symbols: FTSH1   FTSH1 (FtsH protease 1); ATP-dependent peptidase/ ATPase/ metallopeptidase   chr1:186		0,837
29.5.11	protein.degradation.ubiquitin	at1g31340	Transcript	Symbols: RUB1, NEDD8, ATRUB1   RUB1 (RELATED TO UBIQUITIN 1); protein binding   chr1:11217845-11		0,659
29.5.11	protein.degradation.ubiquitin	at4g38630	Transcript	Symbols: RPN10, MCB1, ATMCB1, MBP1   RPN10 (REGULATORY PARTICLE NON-ATPASE 10); peptide		2,212
29.5.11.1	protein.degradation.ubiquitin.ubiquitin	at3g02540	Transcript	Symbols: RAD23-3   RAD23-3 (PUTATIVE DNA REPAIR PROTEIN RAD23-3); damaged DNA binding   chr3		0,47
29.5.11.3	protein.degradation.ubiquitin.E2	at3g52560	Transcript	Symbols: UEV1D-4   UEV1D-4 (UBIQUITIN E2 VARIANT 1D-4); protein binding / ubiquitin-protein ligase   chr		0,343
29.5.11.4.3.1	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.SKP	at5g42190	Transcript	Symbols: ASK2, SKP1B   ASK2 (ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 2); protein binding / ubiquitin-protein ligase   chr5		-2,202
29.5.11.4.3.2	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	at3g19410	Transcript	F-box family protein   chr3:6729585-6730706 FORWARD		0,661
29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at1g45000	Transcript	26S proteasome regulatory complex subunit p42D, putative   chr1:17009141-17011886 FORWARD		1,443
29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at3g27430	Transcript	Symbols: PBB1   PBB1; endopeptidase/ peptidase/ threonine-type endopeptidase   chr3:10152517-10155342		-0,427
29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at3g53970	Transcript	proteasome inhibitor-related   chr3:19985139-19987339 FORWARD		0,509
29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at3g60820	Transcript	Symbols: PBF1   PBF1; peptidase/ threonine-type endopeptidase   chr3:22471769-22473939 REVERSE		-0,145
29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at5g23540	Transcript	26S proteasome regulatory subunit, putative   chr5:7937669-7939575 FORWARD		-0,438
29.5.11.20	protein.degradation.ubiquitin.proteasom	at5g58290	Transcript	Symbols: RPT3   RPT3 (REGULATORY PARTICLE TRIPLE-A ATPASE 3); ATPase   chr5:23569062-23571		0,857

Tabela 1. Cont.

Recognition to Defense genes					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
20.1.3	stress.biotic.signalling	at5g09978	Transcript	Symbols: PEP7   PEP7 (ELICITOR PEPTIDE 7 PRECURSOR)   chr5:3120713-3121864 FORWARD	-1,535
20.1.7	stress.biotic.PR-proteins	at1g55210	Transcript	disease resistance response   chr1:20597869-20598708 REVERSE	0,845
20.1.7	stress.biotic.PR-proteins	at5g23400	Transcript	disease resistance family protein / LRR family protein   chr5:7880335-7882634 FORWARD	0,78
Redox State					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
21.1	redox.thioredoxin	at1g03680	Transcript	Symbols: ATHM1, TRX-M1, ATM1   ATHM1; enzyme activator   chr1:916819-918064 REVERSE	0,63
21.1	redox.thioredoxin	at1g50320	Transcript	Symbols: ATHX, ATX   ATHX; enzyme activator   chr1:18638384-18639536 REVERSE	1,299
21.1	redox.thioredoxin	at2g04700	Transcript	ferredoxin thioredoxin reductase catalytic beta chain family protein   chr2:1646807-1648560 FORWARD	1,565
21.1	redox.thioredoxin	at4g03520	Transcript	Symbols: ATHM2   ATHM2; enzyme activator   chr4:1562359-1564192 REVERSE	0,437
21.1	redox.thioredoxin	at5g42980	Transcript	Symbols: ATTRX3, ATH3, ATTRXH3, TRXH3   ATTRX3 (THIOREDOXIN 3); oxidoreductase, acting on sulfur	0,111
21.1.1	redox.thioredoxin.PDIL	at1g21750	Transcript	Symbols: ATPDIL1-1, ATPDI5, PDI5   ATPDIL1-1 (PDI-LIKE 1-1); protein disulfide isomerase   chr1:7645700-	-0,123
21.2	redox.ascorbate and glutathione	at2g24940	Transcript	Symbols: AtMAPR2   AtMAPR2 (Arabidopsis thaliana membrane-associated progesterone binding protein 2); l	0,391
21.2	redox.ascorbate and glutathione	at2g25080	Transcript	Symbols: ATGPX1   ATGPX1 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 1); glutathione peroxidase   chr2:10668049-10	0,859
21.2	redox.ascorbate and glutathione	at3g48890	Transcript	Symbols: ATMP2, ATMAPR3, MSBP2, MAPR3   ATMP2; heme binding   chr3:18129601-18131573 FORWA	0,539
21.2	redox.ascorbate and glutathione	at5g48810	Transcript	Symbols: ATB5-B, B5 #3, ATCB5-D, CB5-D   CB5-D (CYTOCHROME B5 ISOFORM D); heme binding   chr5	0,347
21.2.1	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at1g07890	Transcript	Symbols: APX1, CS1   APX1 (ascorbate peroxidase 1); L-ascorbate peroxidase   chr1:2437725-2439665 FOF	0,41
21.2.1	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at1g19570	Transcript	Symbols: DHAR1, ATDHAR1   DHAR1 (dehydroascorbate reductase); copper ion binding / glutathione dehydi	0,626
21.2.1	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at4g08390	Transcript	Symbols: SAPX   SAPX (STROMAL ASCORBATE PEROXIDASE); L-ascorbate peroxidase   chr4:5314905-5	1,6
21.2.2	redox.ascorbate and glutathione.glutathione	at4g11600	Transcript	Symbols: ATGPX6, PHGPX, LSC803   ATGPX6 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 6); glutathione peroxidase	0,394
21.4	redox.glutaredoxins	at2g20270	Transcript	glutaredoxin family protein   chr2:8737705-8739677 REVERSE	0,457
21.4	redox.glutaredoxins	at5g20500	Transcript	glutaredoxin, putative   chr5:6938598-6939848 FORWARD	1,436
21.4	redox.glutaredoxins	at5g40370	Transcript	glutaredoxin, putative   chr5:16147594-16149198 REVERSE	0,441
21.5	redox.peroxiredoxin	at1g65980	Transcript	Symbols: TPX1   TPX1 (thioredoxin-dependent peroxidase 1); antioxidant/ oxidoreductase   chr1:24559306-24	0,543
21.5	redox.peroxiredoxin	at3g06050	Transcript	Symbols: PRXIIF, ATPRXIIF   PRXIIF (PEROXIREDOXIN IIF); antioxidant/ peroxidase   chr3:1826073-182786	0,385
21.5	redox.peroxiredoxin	at3g26060	Transcript	Symbols: ATPRX Q   ATPRX Q; antioxidant/ peroxiredoxin   chr3:9524733-9526374 FORWARD	1,196
21.6	redox.dismutases and catalases	at1g20620	Transcript	Symbols: CAT3, SEN2, ATCAT3   CAT3 (CATALASE 3); catalase   chr1:7143067-7146540 FORWARD	0,487
21.6	redox.dismutases and catalases	at2g28190	Transcript	Symbols: CSD2, CZSOD2   CSD2 (COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 2); superoxide dismutase   c	0,379
21.6	redox.dismutases and catalases	at3g10920	Transcript	Symbols: MSD1, MEE33, ATMSD1   MSD1 (MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE 1); metal ion binding	0,611
21.6	redox.dismutases and catalases	at4g35090	Transcript	Symbols: CAT2   CAT2 (CATALASE 2); catalase   chr4:16700596-16703325 REVERSE	0,65
Peroxidases					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
26.12	misc.peroxidases	at2g18980	Transcript	peroxidase, putative   chr2:8233335-8235316 REVERSE	-1,531
26.12	misc.peroxidases	at3g49120	Transcript	Symbols: ATPERX34, PERX34, PRXCB, ATPCB   PRXCB (PEROXIDASE CB); peroxidase   chr3:18207651	0,415
26.12	misc.peroxidases	at4g21960	Transcript	Symbols: PRXR1   PRXR1; electron carrier/ heme binding / peroxidase   chr4:11646174-11648462 REVERSE	2,38
Glutathione-S-transferase					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
26.9	misc.glutathione S transferases	at1g02930	Transcript	Symbols: ATGSTF6, GST1, ERD11, ATGSTF3, GSTF6   ATGSTF6 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE); c	1,134
26.9	misc.glutathione S transferases	at1g27130	Transcript	Symbols: ATGSTU13, GST12   ATGSTU13 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE)	-0,178
26.9	misc.glutathione S transferases	at2g47730	Transcript	Symbols: ATGSTF8, ATGSTF5, GST6, GSTF8   ATGSTF8 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-T	0,27

Tabela 1. Cont.

Signaling						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
30.1	signalling.in sugar and nutrient physiology	at5g09440	Transcript	Symbols: EXL4   EXL4 (EXORDIUM LIKE 4)   chr5:2938347-2939461 FORWARD		-0,807
30.2.3	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat III	at3g02880	Transcript	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative   chr3:634653-637284 FORWARD		-0,317
30.3	signalling.calcium	at1g09210	Transcript	calreticulin 2 (CRT2)   chr1:2972842-2976750 REVERSE		0,203
30.3	signalling.calcium	at1g62480	Transcript	vacuolar calcium-binding protein-related   chr1:23128705-23129759 FORWARD		0,419
30.3	signalling.calcium	at1g66410	Transcript	Symbols: CAM4, ACAM-4   CAM4 (calmodulin 4); calcium ion binding / signal transducer   chr1:24774217-247		0,461
30.3	signalling.calcium	at2g41110	Transcript	Symbols: CAM2, ATCAL5   CAM2 (CALMODULIN 2); calcium ion binding / protein binding   chr2:17140311-1		0,937
30.3	signalling.calcium	at4g23650	Transcript	Symbols: CDPK6, CPK3   CDPK6 (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 6); ATP binding / calcium ion		-0,593
30.3	signalling.calcium	at5g61790	Transcript	Symbols: CNX1, ATCNX1   calnexin 1 (CNX1)   chr5:24827102-24829791 REVERSE		-0,201
30.4	signalling.phosphoinositides	at4g20260	Transcript	Symbols: ATPCAP1, PCAP1   DREPP plasma membrane polypeptide family protein   chr4:10940739-109435		0,561
30.4.5	signalling.phosphoinositides.inositol-1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase	at5g16760	Transcript	inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase   chr5:5509674-5511232 FORWARD		-0,669
30.5	signalling.G-proteins	at2g30060	Transcript	Ran-binding protein 1b (RanBP1b)   chr2:12826915-12828919 FORWARD		1,36
30.5	signalling.G-proteins	at2g31680	Transcript	Symbols: ATRABA5d   ATRABA5d (Arabidopsis Rab GTPase homolog A5d); GTP binding   chr2:13473594-13		1,09
30.5	signalling.G-proteins	at3g09900	Transcript	Symbols: ATRABE1E, ATRAB8E   ATRABE1E (ARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG E1E); GTP bindin		-0,132
30.5	signalling.G-proteins	at5g42080	Transcript	Symbols: ADL1, ADL1A, AG68, DRP1A, RSW9   ADL1 (ARABIDOPSIS DYNAMIN-LIKE PROTEIN); GTP bir		-1,195
30.7	signalling.14-3-3 proteins	at1g22300	Transcript	Symbols: GRF10, 14-3-3EPSILON, GF14 EPSILON   GRF10 (GENERAL REGULATORY FACTOR 10); ATF		0,446
30.7	signalling.14-3-3 proteins	at5g38480	Transcript	Symbols: GRF3, RCI1   GRF3 (GENERAL REGULATORY FACTOR 3); ATP binding / protein binding / protei		0,546
Heat shock proteins						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
20.2.1	stress.abiotic.heat	at1g79920	Transcript	ATP binding   chr1:30058632-30062744 REVERSE		1,231
20.2.1	stress.abiotic.heat	at2g04030	Transcript	Symbols: CR88, EMB1956, HSP90.5   CR88; ATP binding   chr2:1281841-1286104 FORWARD		0,228
20.2.1	stress.abiotic.heat	at3g44110	Transcript	Symbols: ATJ3, ATJ   ATJ3; protein binding   chr3:15868794-15871256 REVERSE		1,22
20.2.1	stress.abiotic.heat	at5g49910	Transcript	Symbols: CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70-2, HSC70-7   CPHSC70-2EAT SHOCK PROTEIN 70-2 (CPH		-0,23
Secondary metabolites						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
16.1.1.2	secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.DXR	at5g62790	Transcript	Symbols: DXR, PDE129   DXR (1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE REDUCTOISOMERASE); 1-deoxy		-0,306
16.1.1.5	secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.MCS	at1g63970	Transcript	Symbols: ISPF, MECPS   ISPF; 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase   chr1:23738691-2374		0,477
16.2.1.1	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.PAL	at2g37040	Transcript	Symbols: pal1, ATPAL1   pal1 (Phe ammonia lyase 1); phenylalanine ammonia-lyase   chr2:15557376-155603		0,691
16.2.1.6	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CCoAOMT	at4g26220	Transcript	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative   chr4:13283576-13285323 FORWARD		-0,39
16.2.1.10	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	at4g34230	Transcript	Symbols: CAD5, ATCAD5, CAD-5   ATCAD5 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 5); cinnamyl-alcoh		1,885
16.4.2.1	secondary metabolism.N misc.betaine.betaine-aldehyde dehydrogenase	at1g74920	Transcript	Symbols: ALDH10A8   ALDH10A8; 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase/ oxidoreductase   chr1:28139009-28		-0,775
16.4.3.1	secondary metabolism.N misc.cyanogenic glycosides.cyanase	at3g23490	Transcript	Symbols: CYN   CYN (CYANASE); DNA binding / cyanate hydratase/ hydro-lyase   chr3:8423011-8424652 RE		0,334
16.5.1.1.4.2	secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates.synthesis.shared.alkylthiohydroximate C-S lyase	at2g20610	Transcript	Symbols: SUR1, HLS3, RTY, ALF1, RTY1   SUR1 (SUPERROOT 1); S-alkylthiohydroximate lyase/ carbon-su		0,53
16.5.1.3.1.1	secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates.degradation.myrosinase.TGG	at5g26000	Transcript	Symbols: TGG1, BGLU38   TGG1 (THIOGLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 1); hydrolase, hydrolyzing O-glyc		-4,627
16.8.4.3	secondary metabolism.flavonoids.flavonols.flavonol-3-O-rhamnosyltransferase	at1g30530	Transcript	Symbols: UGT78D1   UGT78D1 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 78D1); UDP-glycosyltransferase/ querce		0,916

#### 5.4.2. Regulação das proteínas envolvidas no metabolismo global

Visando avaliar a regulação das proteínas envolvidas no metabolismo global vegetal, o critério *Metabolism overview* foi selecionado no software MapMan (Figura 9). Neste, é possível observar que 19 proteínas relacionadas a processos fotossintéticos são positivamente reguladas. Entre estas, destacam-se as proteínas AtPSBQ do Fotossistema II, uma Proteína da família do Fotossistema II e uma Proteína envolvida com o metabolismo do oxigênio no Fotossistema II, com níveis de indução de 1,088; 1,045; e 1,026; respectivamente (Tabela 2). Adicionalmente, pode-se observar que 3 proteínas relacionadas ao processo de Fotorrespiração são positivamente reguladas, Proteína mitocondrial H do sistema de clivagem de glicina, uma proteína da família das Oxirredutases e uma Fosforriboloquinase, com níveis de indução de 0,5; 0,3 e 0,27, respectivamente (Tabela 2).

Análises das proteínas relacionadas ao Ciclo do Ascorbato-Glutationa permitiram a detecção de 8 proteínas positivamente reguladas. Entre estas, destacam-se as proteínas AtSAPX - L-Ascorbato Peroxidase, AtGPX1 – Glutationa Peroxidase 1 e AtDHAR1 – Dehidroascorbato Redutase, com níveis de indução de 1,6; 0,86 e 0,63; respectivamente (Tabela 2). Além disso, 2 proteínas foram positivamente reguladas na via de produção de compostos tetrapirrólicos, sendo estas AtSIRB – Sirohidroclorina Ferroquelatase e AtHEME1 - Uroporfirinogênio Descarboxilase, com níveis de indução de 3,4 e 0,4, respectivamente (Tabela 2).

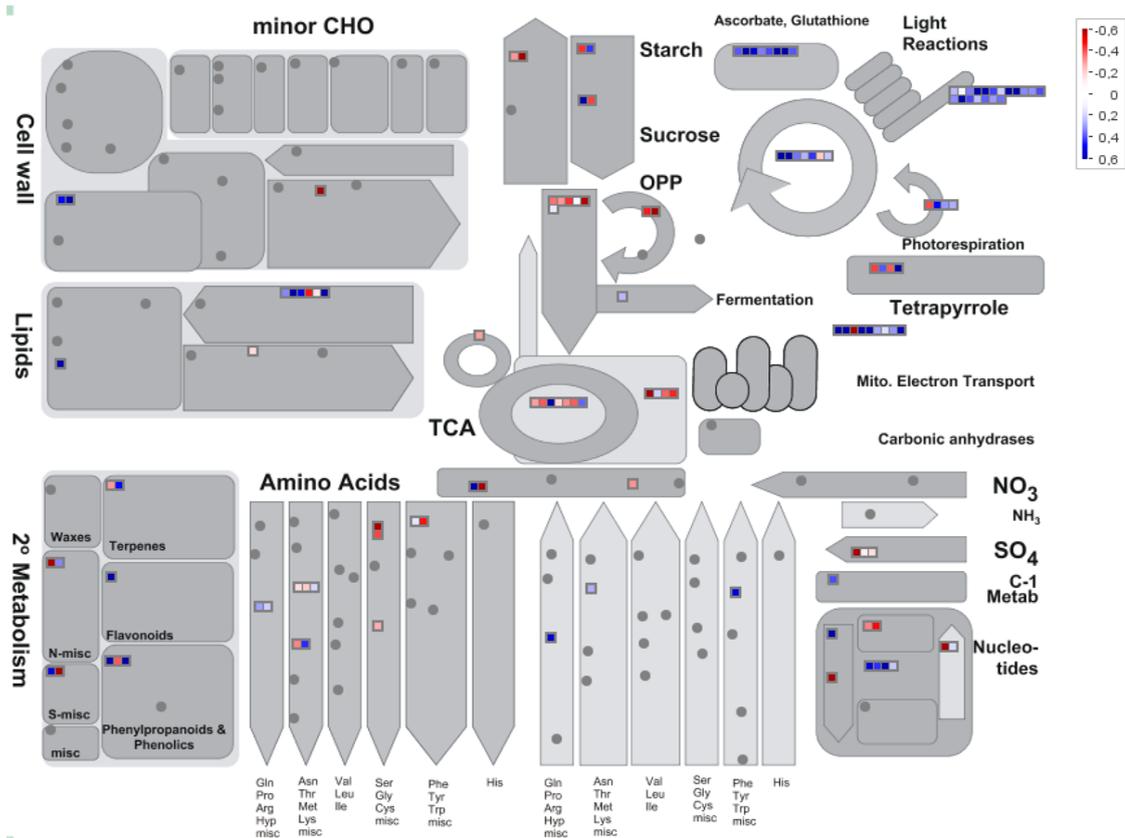
A partir da análise do conjunto proteico regulado relacionado ao Ciclo de Calvin é possível observar que 7 proteínas foram reguladas, sendo 6 proteínas positivamente reguladas. Entre estas, destacam-se AtCP12-2 – Precursor de Cloroplasto, AtCP12-1 – Precursor de Cloroplasto e AtRBCS-1B - Subunidade 1B da RuBisCO, com níveis de indução de 1,1; 1,01 e 0,43, respectivamente (Tabela 2).

A análise do conjunto proteico relacionado aos transportadores de elétrons mitocondriais permitiu a detecção de 9 proteínas reguladas, sendo 8 positivamente reguladas. Entre estas, pode-se destacar AtCYTC-1 – Citocromo C-1, AtNADH dehidrogenase e uma Proteína AtCYTC-1-*like*, com níveis de indução de 1,38; 0,81 e 0,66, respectivamente (Tabela 2).

Entre as proteínas reguladas relacionadas ao metabolismo de nucleotídeos, observa-se a regulação positiva de 6 proteínas. Entre estas, destacam-se AtNDPK2

– Nucleotídeo Difosfato Quinase 2, AtPYR4 – Pirimidina 4 e AtADK1 – Adenilato Quinase 1, com níveis de indução de 0,9; 0,7 e 0,5, respectivamente (Tabela 2). Adicionalmente, a análise do conjunto proteico relacionado ao metabolismo de aminoácidos revelou um total de 18 proteínas reguladas, sendo 9 proteínas reguladas positivamente. Entre estas, pode-se destacar AtGAD2 – Glutamato Descarboxilase 2, Arginase e AtDAP Carboxilase, com níveis de indução de 0,7; 0,6 e 0,4, respectivamente (Tabela 2).

Entre as principais proteínas negativamente reguladas relacionadas ao metabolismo celular geral, destacam-se uma proteína relacionada ao metabolismo de aminoácidos, AtPGDH – 3-Fosfoglicerato Dehidrogenase, com nível de repressão de -2,9; uma proteína relacionada ao Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA), NAD<sup>+</sup> Isocitrato Dehidrogenase, com nível de repressão de -0,848; 2 proteínas envolvidas na via da Pentose Fosfato Oxidativa (*Oxidative Pentose Phosphate*, OPP), AtGalactosamina-6-Fosfato e AtGlicose-6-Fosfato Dehidrogenase 2, com níveis de repressão de -1,3 e -0,5, respectivamente (Tabela 2).



**Figura 9.** Modelo de visualização de proteínas diferencialmente reguladas envolvidas no metabolismo. MapMan *Metabolism Overview* das proteínas diferencialmente reguladas em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae*. Cada quadrado representa uma proteína. As proteínas positivamente reguladas, em relação ao controle, são indicadas em escala azul; e negativamente reguladas, em escala de vermelho.

**Tabela 2.** Descrição das proteínas reguladas no MapMan *Metabolism Overview*.

Amino Acids						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
13.1.2.3.4	amino acid metabolism.synthesis.glutamate family.arginine.acetylornithine aminotransferase	at1g80600	Transcript	Symbols: WIN1   WIN1 (HOPW1-1-INTERACTING 1); N2-acetyl-L-ornithine:2-oxoglutarate 5-aminotransferas		0,295
13.1.2.3.22	amino acid metabolism.synthesis.glutamate family.arginine.arginosuccinate synthase	at4g24830	Transcript	arginosuccinate synthase family   chr4:12792873-12795974 REVERSE		0,214
13.1.3.5.4	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.lysine.diaminopimelate epimerase	at3g53580	Transcript	diaminopimelate epimerase family protein   chr3:19864757-19867134 FORWARD		-0,336
13.1.3.5.5	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.lysine.diaminopimelate decarboxylase	at5g11880	Transcript	diaminopimelate decarboxylase, putative / DAP carboxylase, putative   chr5:3827526-3829986 REVERSE		0,443
13.1.3.4	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.methionine	at4g38800	Transcript	Symbols: ATMTN1, ATMTAN1, MTN1, MTAN1   ATMTN1; catalytic/ methylthioadenosine nucleosidase   chr4		-0,183
13.1.3.4	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.methionine	at5g17920	Transcript	Symbols: ATCIMS, ATMETS, ATMS1   ATMS1; 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyl		-0,219
13.1.3.4.13	amino acid metabolism.synthesis.aspartate family.methionine.methionine S-methyltransferase	at2g43910	Transcript	thiol methyltransferase, putative   chr2:18184491-18187028 REVERSE		0,196
13.1.5.1.1	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.serine.phosphoglycerate dehydrogenase	at1g17745	Transcript	Symbols: PGDH   PGDH (3-PHOSPHOGLYCERATE DEHYDROGENASE); phosphoglycerate dehydrogenas		-2,878
13.1.5.1.1	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.serine.phosphoglycerate dehydrogenase	at4g34200	Transcript	Symbols: EDA9   EDA9 (embryo sac development arrest 9); ATP binding   chr4:16373819-16376622 REVER		-0,415
13.1.5.3.1	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.cysteine.OASTL	at2g43750	Transcript	Symbols: OASB, ACS1, CPACS1, ATCS-B   OASB (O-ACETYL SERINE (THIOL) LYASE B); cysteine synthas		-0,274
13.1.6.1.1	amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.chorismate.3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synth	at1g22410	Transcript	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase, putative / 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synt		0,151
13.1.6.1.1	amino acid metabolism.synthesis.aromatic aa.chorismate.3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synth	at4g33510	Transcript	Symbols: DHS2   DHS2 (3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase); 3-deoxy-7-phosphoheptulic		-0,468
13.2.2.3	amino acid metabolism.degradation.glutamate family.arginine	at4g08900	Transcript	arginase   chr4:5703347-5705346 FORWARD		0,548
13.2.3.2	amino acid metabolism.degradation.aspartate family.threonine	at1g08110	Transcript	lactoylglutathione lyase, putative / glyoxalase I, putative   chr1:2535370-2537931 FORWARD		0,269
13.2.6.2	amino acid metabolism.degradation.aromatic aa.tyrosine	at2g20610	Transcript	Symbols: SUR1, HLS3, RTY, ALF1, RTY1   SUR1 (SUPERROOT 1); S-alkylthiohydroximate lyase/ carbon-su		0,53
13.1.1.3.11	amino acid metabolism.synthesis.central amino acid metabolism.alanine.alanine-glyoxylate aminotransferase	at4g39660	Transcript	Symbols: AGT2   AGT2 (ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE 2); alanine-glyoxylate transaminas		-0,318
13.1.1.1.1	amino acid metabolism.synthesis.central amino acid metabolism.GABA.Glutamate decarboxylase	at1g65960	Transcript	Symbols: GAD2   GAD2 (GLUTAMATE DECARBOXYLASE 2); calmodulin binding / glutamate decarboxylase		0,662
13.1.1.1.1	amino acid metabolism.synthesis.central amino acid metabolism.GABA.Glutamate decarboxylase	at2g02010	Transcript	Symbols: GAD4   GAD4 (glutamate decarboxylase 4); calmodulin binding   chr2:474165-476594 REVERSE		-1,294
Nucleotides						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
23.1.1.3	nucleotide metabolism.synthesis.pyrimidine.dihydroorotase	at4g22930	Transcript	Symbols: PYR4, DHOASE   PYR4 (PYRIMIDIN 4); dihydroorotase/ hydrolase/ hydrolase, acting on carbon-nitr		0,667
23.1.2.30	nucleotide metabolism.synthesis.purine.IMP dehydrogenase	at1g16350	Transcript	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative   chr1:5590951-5593007 FORWARD		-1,419
23.3.2.1	nucleotide metabolism.salvage.nucleoside kinases.adenosine kinase	at5g03300	Transcript	Symbols: ADK2   ADK2 (ADENOSINE KINASE 2); adenosine kinase/ copper ion binding / kinase   chr5:79644		-0,342
23.3.3	nucleotide metabolism.salvage.NUDIX hydrolases	at1g68760	Transcript	Symbols: ATNUDT1, ATNUDX1   ATNUDX1 (ARABIDOPSIS THALIANA NUDIX HYDROLASE 1); dihydrone		-0,477
23.4.1	nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.adenylate kinase	at5g63400	Transcript	Symbols: ADK1   ADK1 (ADENYLATE KINASE 1); ATP binding / adenylate kinase/ nucleobase, nucleoside, n		0,541
23.4.10	nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.nucleoside diphosphate kinase	at4g11010	Transcript	Symbols: NDPK3   NDPK3 (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE 3); ATP binding / nucleoside diphosphat		0,438
23.4.10	nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.nucleoside diphosphate kinase	at5g63310	Transcript	Symbols: NDPK2, NDPK1A, NDPK IA IA, NDPK IA, ATNDPK2   NDPK2 (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KIN		0,902
23.4.99	nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.misc	at5g09650	Transcript	Symbols: AtPPa6   AtPPa6 (Arabidopsis thaliana pyrophosphorylase 6); inorganic diphosphatase/ pyrophosph		0,229
23.2	nucleotide metabolism.degradation	at5g28050	Transcript	cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein   chr5:10043914-10045882 REVERSE		-0,84
23.2	nucleotide metabolism.degradation	at5g63980	Transcript	Symbols: SAL1, ALX8, ATLSAL1, HOS2, FRY1   SAL1; 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase/ inositol or phosph		0,188
C1						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
25.10	C1-metabolism.formate dehydrogenase	at5g14780	Transcript	Symbols: FDH   FDH (FORMATE DEHYDROGENASE); NAD or NADH binding / binding / catalytic/ cofactor b		0,405
S-assimilation						
BinCode	BinName	id	type	description		Folha_ANOVA.xls
14.1	S-assimilation.ATPS	at1g19920	Transcript	Symbols: APS2, ASA1   APS2; sulfate adenyllyltransferase (ATP)   chr1:6914613-6916805 REVERSE		-1,8
14.1	S-assimilation.ATPS	at3g22890	Transcript	Symbols: APS1   APS1 (ATP SULFURYLASE 1); sulfate adenyllyltransferase (ATP)   chr3:8112723-8114992		-0,123
14.3	S-assimilation.sulfite redox	at5g04590	Transcript	Symbols: SIR   SIR; sulfite reductase (ferredoxin)/ sulfite reductase   chr5:1319356-1322526 FORWARD		-0,173

Tabela 2. Cont.

TCA					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
8.1.1.1	TCA / org transformation.TCA.pyruvate DH.E1	at5g50850	Transcript	Symbols: MAB1   MAB1 (MACCI-BOU); catalytic/ pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)   chr5:2068939	-0,298
8.1.1.3	TCA / org transformation.TCA.pyruvate DH.E3	at3g16950	Transcript	Symbols: LPD1, ptlpd1   LPD1 (LIPOAMIDE DEHYDROGENASE 1); dihydrolipoyl dehydrogenase   chr3:5786	-0,39
8.1.1.3	TCA / org transformation.TCA.pyruvate DH.E3	at3g17240	Transcript	Symbols: mtLPD2   mtLPD2 (LIPOAMIDE DEHYDROGENASE 2); ATP binding / dihydrolipoyl dehydrogenase	0,84
8.1.3	TCA / org transformation.TCA.aconitase	at4g35830	Transcript	aconitate hydratase, cytoplasmic / citrate hydro-lyase / aconitase (ACO)   chr4:16972598-16978057 REVERSE	-0,194
8.1.4	TCA / org transformation.TCA.IDH	at4g35260	Transcript	Symbols: IDH1   IDH1 (ISOCITRATE DEHYDROGENASE 1); isocitrate dehydrogenase (NAD+)/ oxidoreducta	-0,326
8.1.4	TCA / org transformation.TCA.IDH	at5g14590	Transcript	isocitrate dehydrogenase, putative / NADP+ isocitrate dehydrogenase, putative   chr5:4703298-4706738 REVI	-0,385
8.1.9	TCA / org transformation.TCA.malate DH	at3g15020	Transcript	malate dehydrogenase (NAD), mitochondrial, putative   chr3:5056068-5058248 FORWARD	0,376
8.2.4	TCA / org transformation.other organic acid transformats.IDH	at3g09810	Transcript	isocitrate dehydrogenase, putative / NAD+ isocitrate dehydrogenase, putative   chr3:3008694-3011437 FORW	-0,848
8.2.9	TCA / org transformation.other organic acid transformats.cyt MDH	at5g58330	Transcript	malate dehydrogenase (NADP), chloroplast, putative   chr5:23579722-23582395 REVERSE	0,211
8.2.10	TCA / org transformation.other organic acid transformats.malic	at2g19900	Transcript	Symbols: ATNADP-ME1   ATNADP-ME1 (NADP-malic enzyme 1); malate dehydrogenase (oxaloacetate-deca	-0,382
8.2.99	TCA / org transformation.other organic acid transformats.misc	at1g79440	Transcript	Symbols: ALDH5F1, SSADH1, SSADH   ALDH5F1; 3-chloroalloyl aldehyde dehydrogenase/ NAD or NADH bin	-0,45
6.3	gluconeogenesis / glyoxylate cycle.Malate DH	at2g22780	Transcript	Symbols: PMDH1   PMDH1 (PEROXISOMAL NAD-MALATE DEHYDROGENASE 1); L-malate dehydrogenase	-0,299
Fermentation					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
5.10	fermentation.aldehyde dehydrogenase	at3g48000	Transcript	Symbols: ALDH2B4, ALDH2, ALDH2A   ALDH2B4 (ALDEHYDE DEHYDROGENASE 2B4); 3-chloroalloyl alde	0,257
OPP					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
7.1.1	OPP.oxidative PP.G6PD	at5g13110	Transcript	Symbols: G6PD2   G6PD2 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 2); glucose-6-phosphate dehyd	-0,46
7.1.2	OPP.oxidative PP.6-phosphogluconolactonase	at5g24410	Transcript	glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related   chr5:8332473-8334066 REVERSE	-1,291
Glycolysis					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
4.1.1	glycolysis.cytosolic branch.UGPase	at5g17310	Transcript	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase, putative / UDP-glucose pyrophosphorylase, putative / UGPase,	-0,36
4.1.8	glycolysis.cytosolic branch.glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAP-DH)	at3g04120	Transcript	Symbols: GAPC, GAPC-1, GAPC1   GAPC1 (GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C	-0,31
4.1.10	glycolysis.cytosolic branch.aldolase	at5g03690	Transcript	fructose-bisphosphate aldolase, putative   chr5:963148-965050 REVERSE	-0,438
4.1.11	glycolysis.cytosolic branch.3-phosphoglycerate kinase (PGK)	at1g79550	Transcript	Symbols: PGK   PGK (PHOSPHOGLYCERATE KINASE); phosphoglycerate kinase   chr1:29924023-299264	0,075
4.2.14	glycolysis.plastid branch.pyruvate kinase (PK)	at3g22960	Transcript	Symbols: PKP1, PKP-ALPHA   PKP-ALPHA; pyruvate kinase   chr3:8139235-8141985 FORWARD	-0,587
4.3.10	glycolysis.unclear/dually targeted.aldolase	at3g52930	Transcript	fructose-bisphosphate aldolase, putative   chr3:19626748-19629073 REVERSE	0,14
CHO metabolism					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
2.2.1.1	major CHO metabolism.degradation.sucrose.fructokinase	at1g06020	Transcript	pfkB-type carbohydrate kinase family protein   chr1:1824548-1826101 FORWARD	1,268
2.2.1.3.3	major CHO metabolism.degradation.sucrose.invertases.vacuolar	at1g12240	Transcript	Symbols: ATBETAFRUCT4, VAC-INV   ATBETAFRUCT4; beta-fructofuranosidase/ hydrolase, hydrolyzing O-	-0,42
2.1.2.1	major CHO metabolism.synthesis.starch.AGPase	at1g74910	Transcript	ADP-glucose pyrophosphorylase family protein   chr1:28135361-28138768 REVERSE	-0,312
2.1.2.2	major CHO metabolism.synthesis.starch.starch synthase	at1g32900	Transcript	starch synthase, putative   chr1:11920390-11923766 REVERSE	-0,74
2.2.2.2	major CHO metabolism.degradation.starch.starch phosphorylase	at3g29320	Transcript	glucan phosphorylase, putative   chr3:11252807-11257814 FORWARD	-0,437
2.2.2.4	major CHO metabolism.degradation.starch.D enzyme	at2g40840	Transcript	Symbols: DPE2   DPE2 (DISPROPORTIONATING ENZYME 2); 4-alpha-glucanotransferase/ heteroglycan bir	0,43
Ascorbate and Glutathione					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
21.2	redox.ascorbate and glutathione	at2g24940	Transcript	Symbols: AtMAPR2   AtMAPR2 (Arabidopsis thaliana membrane-associated progesterone binding protein 2); l	0,391
21.2	redox.ascorbate and glutathione	at2g25080	Transcript	Symbols: ATGPX1   ATGPX1 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 1); glutathione peroxidase   chr2:10668049-10	0,859
21.2	redox.ascorbate and glutathione	at3g48890	Transcript	Symbols: ATPM2, ATMAPR3, MSBP2, MAPR3   ATPM2; heme binding   chr3:18129601-18131573 FORWA	0,539
21.2	redox.ascorbate and glutathione	at5g48810	Transcript	Symbols: ATB5-B, B5 #3, ATCB5-D, CB5-D   CB5-D (CYTOCHROME B5 ISOFORM D); heme binding   chr5	0,347
21.2.1	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at1g07890	Transcript	Symbols: APX1, CS1   APX1 (ascorbate peroxidase 1); L-ascorbate peroxidase   chr1:2437725-2439665 FOF	0,41
21.2.1	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at1g19570	Transcript	Symbols: DHAR1, ATDHAR1   DHAR1 (dehydroascorbate reductase); copper ion binding / glutathione dehyd	0,626
21.2.1	redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	at4g08390	Transcript	Symbols: SAPX   SAPX (STROMAL ASCORBATE PEROXIDASE); L-ascorbate peroxidase   chr4:5314905-5	1,6
21.2.2	redox.ascorbate and glutathione.glutathione	at4g11600	Transcript	Symbols: ATGPX6, PHGPX, LSC803   ATGPX6 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 6); glutathione peroxidase	0,394

Tabela 2. Cont.

Photosystems					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
1.1.1.1	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	at1g15820	Transcript	Symbols: LHCB6, CP24   LHCB6 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII SUBUNIT 6); chlorophyll binding   c	0,255
1.1.1.1	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	at5g01530	Transcript	chlorophyll A-B binding protein CP29 (LHCB4)   chr5:208937-210445 FORWARD	0,065
1.1.1.1	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	at5g54270	Transcript	Symbols: LHCB3, LHCB3*1   LHCB3 (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING PROTEIN 3); stru	0,345
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at1g03600	Transcript	photosystem II family protein   chr1:898876-899655 FORWARD	1,045
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at1g76450	Transcript	oxygen-evolving complex-related   chr1:28684551-28686244 FORWARD	1,026
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at3g50820	Transcript	Symbols: PSBO2, PSBO-2, OEC33   PSBO2 (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT O-2); oxygen evolving/ poly(U) bi	0,416
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at3g55330	Transcript	Symbols: PPL1   PPL1 (PsbP-like protein 1); calcium ion binding   chr3:20513825-20515351 REVERSE	0,209
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at4g05180	Transcript	Symbols: PSBQ, PSBQ-2, PSII-Q   PSBQ-2; calcium ion binding   chr4:2671822-2673243 REVERSE	0,641
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at4g21280	Transcript	Symbols: PSBQ, PSBQA, PSBQ-1   oxygen-evolving enhancer protein 3, chloroplast, putative (PSBQ1) (PSBQ	1,088
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at5g66570	Transcript	Symbols: PSBO-1, OEE1, OEE33, OE33, PSBO1, MSP-1   PSBO1 (PS II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX	0,331
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	at1g31330	Transcript	Symbols: PSAF   PSAF (photosystem I subunit F)   chr1:11214824-11216037 REVERSE	0,321
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	at1g52230	Transcript	Symbols: PSAH2, PSAH-2, PSI-H   PSAH2 (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT H2)   chr1:19454836-19455668 FC	0,405
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	at4g28750	Transcript	Symbols: PSAE-1   PSAE-1 (PSA E1 KNOCKOUT); catalytic   chr4:14202758-14203961 REVERSE	0,322
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	at5g64040	Transcript	Symbols: PSAN   PSAN; calmodulin binding   chr5:25628588-25629615 REVERSE	0,613
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	atcg01060	Transcript	Symbols: PSAC   Encodes the PsaC subunit of photosystem I.   chrC:117318-117563 REVERSE	0,411
1.1.3	PS.lightreaction.cytochrome b6/f	at4g03280	Transcript	Symbols: PETC, PGR1   PETC (PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER C); electron transporter, trans	0,247
1.1.4.3	PS.lightreaction.ATP synthase.epsilon chain	atcg00470	Transcript	Symbols: ATPe   ATPase epsilon subunit   chrC:52265-52663 REVERSE	0,381
1.1.5.1	PS.lightreaction.other electron carrier (ox/red).plastocyanin	at1g20340	Transcript	Symbols: DRT112, PETE2   DRT112; copper ion binding / electron carrier   chr1:7042429-7043363 REVERS	0,303
1.1.6	PS.lightreaction.NADH DH	at4g37925	Transcript	Symbols: NDH-M   NDH-M (subunit NDH-M of NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex)   chr4:17830	0,361
Calvin Cycle					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
1.3	PS.calvin cycle	at2g47400	Transcript	Symbols: CP12-1, CP12   CP12-1   chr2:19446854-19447438 FORWARD	1,098
1.3	PS.calvin cycle	at3g62410	Transcript	Symbols: CP12-2, CP12   CP12-2; protein binding   chr3:23090944-23091566 FORWARD	1,107
1.3.2	PS.calvin cycle.rubisco small subunit	at1g67090	Transcript	Symbols: RBCS1A   RBCS1A (RIBULOSE BISPHTOPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A); copper io	0,357
1.3.2	PS.calvin cycle.rubisco small subunit	at5g38420	Transcript	ribulose bisphtosphate carboxylase small chain 2B / RuBisCO small subunit 2B (RBCS-2B) (ATS2B)   chr5:153	0,266
1.3.2	PS.calvin cycle.rubisco small subunit	at5g38430	Transcript	ribulose bisphtosphate carboxylase small chain 1B / RuBisCO small subunit 1B (RBCS-1B) (ATS1B)   chr5:153	0,432
1.3.3	PS.calvin cycle.phosphoglycerate kinase	at1g56190	Transcript	phosphoglycerate kinase, putative   chr1:21028238-21030649 FORWARD	-0,216
1.3.11	PS.calvin cycle.RPE	at5g61410	Transcript	Symbols: RPE, EMB2728   RPE; catalytic/ ribulose-phosphate 3-epimerase   chr5:24683606-24686105 REVE	0,229
Photorespiration					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
1.2.2	PS.photorespiration.glycolate oxydase	at3g14415	Transcript	(S)-2-hydroxy-acid oxydase, peroxisomal, putative / glycolate oxydase, putative / short chain alpha-hydroxy acid	-0,404
1.2.4.4	PS.photorespiration.glycine cleavage.H protein	at1g32470	Transcript	glycine cleavage system H protein, mitochondrial, putative   chr1:11739304-11740361 REVERSE	0,491
1.2.6	PS.photorespiration.hydroxypyruvate reductase	at1g79870	Transcript	oxidoreductase family protein   chr1:30044746-30046027 FORWARD	0,307
1.2.7	PS.photorespiration.glycerate kinase	at1g80380	Transcript	phosphoribulokinase/uridine kinase-related   chr1:30217219-30220004 FORWARD	0,271
Tetrapyrrole					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
19.3	tetrapyrrole synthesis.GSA	at3g48730	Transcript	Symbols: GSA2   GSA2 (glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2); catalytic/ glutamate-1-semialdehyde	-0,421
19.7	tetrapyrrole synthesis.uroporphyrinogen decarboxylase	at3g14930	Transcript	Symbols: HEME1   HEME1; uroporphyrinogen decarboxylase   chr3:5020570-5022959 FORWARD	0,394
19.14	tetrapyrrole synthesis.protochlorophyllide reductase	at4g27440	Transcript	Symbols: PORB   PORB (PROTOCHLOROPHYLLIDE OXIDOREDUCTASE B); oxidoreductase/ protochloro	-0,39
19.32	tetrapyrrole synthesis.sirohydrochlorin ferrochelatase	at1g50170	Transcript	Symbols: ATSIRB   ATSIRB (ARABIDOPSIS THALIANA SIROHYDROCHLORIN FERROCHELATASE B); si	3,44
Mitochondrial electron transport					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
9.1.2	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear	at5g52840	Transcript	NADH-ubiquinone oxidoreductase-related   chr5:21413646-21415006 FORWARD	0,64
9.1.2	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear	at5g67590	Transcript	Symbols: FRO1   FRO1 (FROSTBITE1); NADH dehydrogenase (ubiquinone)   chr5:26958001-26959557 FO	0,809
9.1.2	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.localisation not clear	atmg00510	Transcript	Symbols: NAD7   NADH dehydrogenase subunit 7   chrM:132071-138153 FORWARD	-0,968
9.6	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c	at1g22840	Transcript	Symbols: CYTC-1, ATCYTC-A   CYTC-1 (CYTOCHROME C-1); electron carrier/ heme binding / iron ion bindir	1,38
9.6	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c	at5g40810	Transcript	cytochrome c1, putative   chr5:16339893-16342644 FORWARD	0,656
9.7	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c oxidase	at1g22450	Transcript	Symbols: COX6B, ATCOX6B2   COX6B (CYTOCHROME C OXIDASE 6B); cytochrome-c oxidase   chr1:792	0,284
9.7	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c oxidase	at1g80230	Transcript	cytochrome c oxidase family protein   chr1:30169456-30171101 REVERSE	0,175
9.7	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c oxidase	at3g15640	Transcript	cytochrome c oxidase family protein   chr3:5299110-5301745 FORWARD	0,31
9.9	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.F1-ATPase	at3g52300	Transcript	Symbols: ATPQ   ATPQ (ATP SYNTHASE D CHAIN, MITOCHONDRIAL); hydrogen ion transmembrane trans	0,58

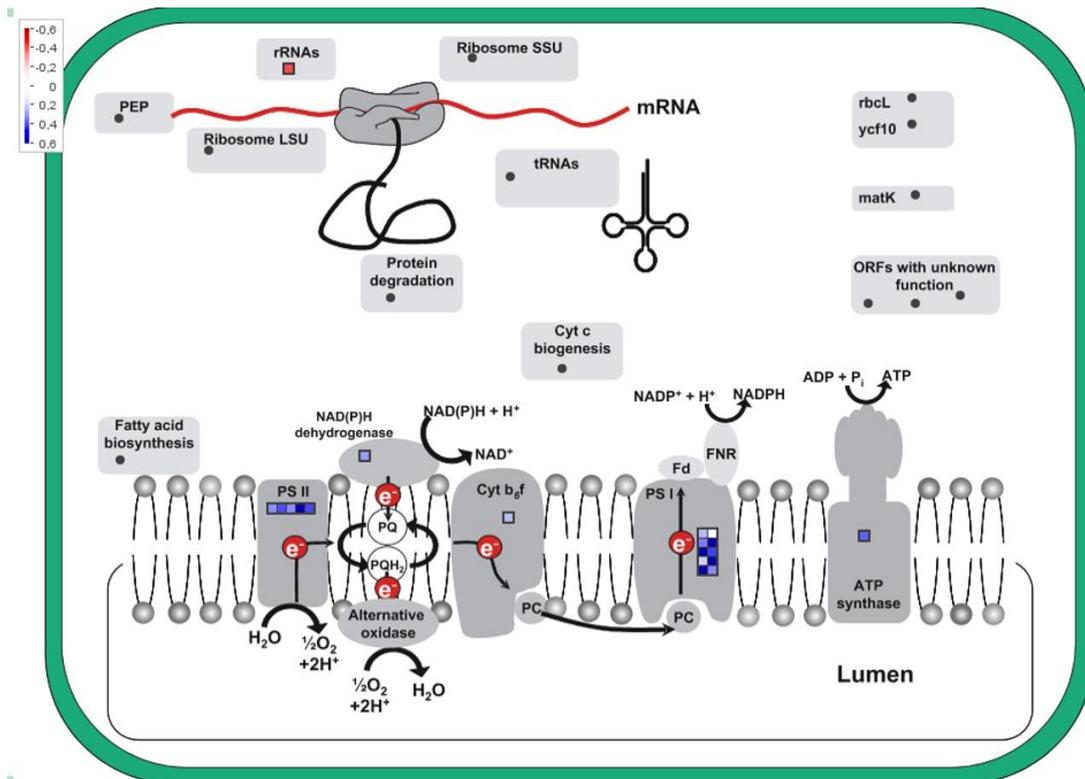
Tabela 2. Cont.

Cell Wall					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
10.8.1	cell wall.pectin*esterases.PME	at3g14310	Transcript	Symbols: ATPME3   ATPME3; pectinesterase   chr3:4771902-4775119 REVERSE	0,481
10.8.2	cell wall.pectin*esterases.acetyl esterase	at5g45280	Transcript	pectinacetylerase, putative   chr5:18345595-18349695 FORWARD	0,59
10.6.2	cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	at3g10740	Transcript	Symbols: ASD1, ARAF1, ARAF, ATASD1   ASD1 (ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDASE 1); alpha-N-arabino	-0,605
Lipids					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
11.8	lipid metabolism.'exotics'(steroids, squalene etc)	at5g42890	Transcript	Symbols: ATSCP2, SCP2   SCP2 (STEROL CARRIER PROTEIN 2); oxidoreductase/ sterol carrier   chr5:1711	0,695
11.1.1	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.Acetyl CoA Carboxylation	at3g56130	Transcript	biotin/lipoyl attachment domain-containing protein   chr3:20826658-20829270 FORWARD	0,332
11.1.1.2.1	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.Acetyl CoA Carboxylation.heteromeric Complex.alpha Carbo	at2g38040	Transcript	Symbols: CAC3   CAC3; acetyl-CoA carboxylase   chr2:15917093-15921170 FORWARD	0,79
11.1.2	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.Acetyl CoA Transacylase	at2g30200	Transcript	[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase/ binding / catalytic/ transferase   chr2:12882955-12885534 REVERSE	0,52
11.1.3	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.ketoacyl ACP synthase	at1g62640	Transcript	Symbols: KAS III   KAS III (3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN SYNTHASE III); 3-oxoacyl[acyl-carrier-p	-0,464
11.1.8	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.acyl coa ligase	at3g48990	Transcript	AMP-dependent synthetase and ligase family protein   chr3:18158747-18161379 REVERSE	-0,162
11.1.13	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.acyl-CoA binding protein	at1g31812	Transcript	Symbols: ACBP6, ACBP   ACBP6 (acyl-CoA-binding protein 6); acyl-CoA binding / phosphatidylcholine binding	0,699
11.9.3.3	lipid metabolism.lipid degradation.lysophospholipases.glycerophosphodiester phosphodiesterase	at4g26690	Transcript	Symbols: SHV3, MRH5, GPD2   SHV3 (SHAVEN 3); glycerophosphodiester phosphodiesterase/ kinase   chr	-0,182
Secondary Metabolism					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
16.1.1.2	secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.DXR	at5g62790	Transcript	Symbols: DXR, PDE129   DXR (1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE REDUCTOISOMERASE); 1-deoxy	-0,306
16.1.1.5	secondary metabolism.isoprenoids.non-mevalonate pathway.MCS	at1g63970	Transcript	Symbols: ISPF, MECPS   ISPF; 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase   chr1:23738691-2374	0,477
16.4.2.1	secondary metabolism.N misc.betaine.betaine-aldehyde dehydrogenase	at1g74920	Transcript	Symbols: ALDH10A8   ALDH10A8; 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase/ oxidoreductase   chr1:28139009-28	-0,775
16.4.3.1	secondary metabolism.N misc.cyanogenic glycosides.cyanase	at3g23490	Transcript	Symbols: CYN   CYN (CYANASE); DNA binding / cyanate hydratase/ hydro-lyase   chr3:8423011-8424652 RE	0,334
16.8.4.3	secondary metabolism.flavonoids.flavonols.flavonol-3-O-rhamnosyltransferase	at1g30530	Transcript	Symbols: UGT78D1   UGT78D1 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 78D1); UDP-glycosyltransferase/ querce	0,916
16.5.1.1.4.2	secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates.synthesis.shared.alkylthiohydroximate C-S lyase	at2g20610	Transcript	Symbols: SUR1, HLS3, RTY, ALF1, RTY1   SUR1 (SUPERROOT 1); S-alkylthiohydroximate lyase/ carbon-sul	0,53
16.5.1.3.1.1	secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates.degradation.myrosinase.TGG	at5g26000	Transcript	Symbols: TGG1, BGLU38   TGG1 (THIOGLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 1); hydrolase, hydrolyzing O-glyc	-4,627
16.2.1.1	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.PAL	at2g37040	Transcript	Symbols: pal1, ATPAL1   pal1 (Phe ammonia lyase 1); phenylalanine ammonia-lyase   chr2:15557376-155603	0,691
16.2.1.6	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CCoAOMT	at4g26220	Transcript	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative   chr4:13283576-13285323 FORWARD	-0,39
16.2.1.10	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	at4g34230	Transcript	Symbols: CAD5, ATCAD5, CAD-5   ATCAD5 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 5); cinnamyl-alcoh	1,885

#### 5.4.2. Regulação das proteínas envolvidas com as funções de cloroplastos

A análise das proteínas envolvidas diferencialmente reguladas envolvidas no cloroplasto foi realizada utilizando o critério *Chloroplast Custom Array* no software MapMan (Figura 10). Como resultado da análise, é possível observar que o conjunto proteico regulado positivamente relacionado ao metabolismo do cloroplasto se concentra nos Fotossistemas I e II. Dez proteínas foram reguladas positivamente do Fotossistema I. Entre estas destacam-se a AtPSBQ – proteína envolvida no provimento de oxigênio, uma Proteína da família do Fotossistema II e uma unidade polipeptídica envolvida no metabolismo do oxigênio, com níveis de indução de 1,01; 1,05 e 1,03, respectivamente. Já o Fotossistema II agrupou 5 proteínas positivamente reguladas. Entre estas, destacam-se AtPSAN – Calmodulina, AtPSAC – codificadora da subunidade PsaC do Fotossistema II e AtPSAH2 – Subunidade H2 do Fotossistema II, com níveis de indução de 0,61; 0,41 e 0,41; respectivamente (Tabela 3).

Apenas uma proteína foi negativamente regulada no metabolismo do cloroplasto. Esta é relacionada a RNAs ribossômicos, denominada (S)-2-hidroxi-ácido oxidase peroxissomal e com nível de repressão de -0,404 (Tabela 3).



**Figura 10.** Modelo de visualização de proteínas diferencialmente reguladas envolvidas no metabolismo do cloroplasto. MapMan *Chloroplast Custom Array* das proteínas diferencialmente reguladas em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae*. Cada quadrado representa uma proteína. As proteínas positivamente reguladas, em relação ao controle, são indicadas em escala azul; e negativamente reguladas, em escala de vermelho.

**Tabela 3.** Descrição das proteínas reguladas visualizadas no MapMan *Chloroplast Custom Array*.

Photosystem II					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	at1g31330	Transcript	Symbols: PSAF   PSAF (photosystem I subunit F)   chr1:11214824-11216037 REVERSE	0,321
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	at1g52230	Transcript	Symbols: PSAH2, PSAH-2, PSI-H   PSAH2 (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT H2)   chr1:19454836-19455668 FORWARD	0,405
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	at4g28750	Transcript	Symbols: PSAE-1   PSAE-1 (PSA E1 KNOCKOUT); catalytic   chr4:14202758-14203961 REVERSE	0,322
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	at5g64040	Transcript	Symbols: PSAN   PSAN; calmodulin binding   chr5:25628588-25629615 REVERSE	0,613
1.1.2.2	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	atcg01060	Transcript	Symbols: PSAC   Encodes the PsaC subunit of photosystem I.   chrC:117318-117563 REVERSE	0,411
NAD(P)H dehydrogenase					
1.1.5.1	PS.lightreaction.other electron carrier (ox/red).plastocyanin	at1g20340	Transcript	Symbols: DRT112, PETE2   DRT112; copper ion binding / electron carrier   chr1:7042429-7043363 REVERSE	0,303
Cytochrome b6/f					
1.1.3	PS.lightreaction.cytochrome b6/f	at4g03280	Transcript	Symbols: PETC, PGR1   PETC (PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSFER C); electron transporter, trans	0,247
Photosystem I					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
1.1.1.1	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	at1g15820	Transcript	Symbols: LHCB6, CP24   LHCB6 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII SUBUNIT 6); chlorophyll binding   chr1:11214824-11216037 FORWARD	0,255
1.1.1.1	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	at5g01530	Transcript	chlorophyll A-B binding protein CP29 (LHCB4)   chr5:208937-210445 FORWARD	0,065
1.1.1.1	PS.lightreaction.photosystem II.LHC-II	at5g54270	Transcript	Symbols: LHCB3, LHCB3*1   LHCB3 (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING PROTEIN 3); structure	0,345
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at1g03600	Transcript	photosystem II family protein   chr1:898876-899655 FORWARD	1,045
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at1g76450	Transcript	oxygen-evolving complex-related   chr1:28684551-28686244 FORWARD	1,026
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at3g50820	Transcript	Symbols: PSBO2, PSBO-2, OEC33   PSBO2 (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT O-2); oxygen evolving/ poly(U) binding	0,416
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at3g55330	Transcript	Symbols: PPL1   PPL1 (PsbP-like protein 1); calcium ion binding   chr3:20513825-20515351 REVERSE	0,209
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at4g05180	Transcript	Symbols: PSBQ, PSBQ-2, PSII-Q   PSBQ-2; calcium ion binding   chr4:2671822-2673243 REVERSE	0,641
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at4g21280	Transcript	Symbols: PSBQ, PSBQA, PSBQ-1   oxygen-evolving enhancer protein 3, chloroplast, putative (PSBQ1) (PSBQ	1,088
1.1.1.2	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	at5g66570	Transcript	Symbols: PSBO-1, OEE1, OEE33, OE33, PSBO1, MSP-1   PSBO1 (PS II OXYGEN-EVOLVING COMPLEX	0,331
ATP synthase					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
1.1.4.3	PS.lightreaction.ATP synthase.epsilon chain	atcg00470	Transcript	Symbols: ATPE   ATPase epsilon subunit   chrC:52265-52663 REVERSE	0,381
rRNAs					
BinCode	BinName	id	type	description	Folha_ANOVA.xls
1.2.2	PS.photorespiration.glycolate oxydase	at3g14415	Transcript	(S)-2-hydroxy-acid oxidase, peroxisomal, putative / glycolate oxidase, putative / short chain alpha-hydroxy acid	-0,404

## 6 DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas associações entre plantas e micro-organismos benéficos é um dos desafios inerentes à utilização de biofertilizantes na agricultura. Os micro-organismos associados a plantas podem promover o crescimento vegetal através de diversos mecanismos, sendo estes diretos ou indiretos. Adicionalmente, sabe-se que, apesar de serem classificados como micro-organismos benéficos, existem particularidades espécie-específicas relacionadas aos mecanismos utilizados para invasão da planta hospedeira, manutenção da vida no interior dos tecidos vegetais e promoção do crescimento vegetal. A exploração destas particularidades contribui para o mapeamento de rotas metabólicas vegetais comumente reguladas por micro-organismos benéficos.

A utilização de plantas modelo para o estudo da associação com micro-organismos é uma interessante ferramenta neste ramo de pesquisa. Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa utilizando plantas modelo de *A. thaliana* em associação com o endófito diazotrófico *G. diazotrophicus* permitiram o estudo dos locais de colonização bem como a elucidação de algumas vias moleculares reguladoras-chave do processo de promoção do crescimento vegetal.

Entre as bactérias promotoras do crescimento vegetal já descritas, *H. seropedicae* se destaca pelo seu potencial de colonizar e promover o crescimento em diversas culturas de interesse econômico, como arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Entre os mecanismos já descritos

utilizados por essa bactéria para promover o crescimento vegetal estão a FBN, a solubilização de fosfatos, a produção de fitohormônios e a produção de sideróforos.

Gough e colaboradores (1997) demonstraram que a adição de flavonoides potencializa o processo de colonização em plantas de *A. thaliana* por *H. seropedicae*, induzindo, principalmente, a colonização de regiões de brotamento de raízes laterais. Os resultados obtidos demonstram a importância da quimiotaxia para o processo de inoculação por *H. seropedicae* em plantas de *A. thaliana*. Contudo, ainda não existem estudos demonstrando o efeito desta associação no âmbito da promoção do crescimento vegetal. Neste sentido, o presente trabalho é o primeiro a avaliar a promoção do crescimento em plantas de *A. thaliana* oriunda da associação com *H. seropedicae*.

Diante do exposto, a primeira abordagem deste trabalho consistiu na avaliação da eficiência de *H. seropedicae* em promover o crescimento vegetal em plantas de *A. thaliana*. Para tanto, ensaios de inoculação foram realizados e as plantas foram avaliadas quanto aos parâmetros de massas fresca e seca de parte aérea e raiz; bem como através de análises não-destrutivas de medição da área total das rosetas. Os resultados obtidos confirmam a promoção do crescimento induzida por *H. seropedicae* em *A. thaliana* em todos os parâmetros testados (Figura 4). O ganho de biomassa adquirido pelas plantas inoculadas indica que *H. seropedicae* possui a capacidade de promover o crescimento vegetal em plantas de *A. thaliana*.

Posteriormente, avaliações por microscopia de fluorescência de plantas inoculadas foram realizadas a fim de avaliar os pontos de colonização de *H. seropedicae* em raízes de *A. thaliana*. Como resultado destas avaliações, foi possível observar uma tendência de formação de colônias de *H. seropedicae* (HS-F) em regiões de brotamento de raízes laterais e nas bases dos pelos radiculares (Figura 5A).

Este padrão de colonização de *H. seropedicae* já foi demonstrado em outras plantas hospedeiras. Estudos demonstram que as regiões de brotamento de raízes laterais são as principais rotas de entrada para *H. seropedicae*, sendo estes locais, somados à região circundante dos pelos radiculares, os mais propensos à formação de colônia bacteriana (Gough et al., 1997; Souza et al., 2012). As regiões de brotamento de raízes laterais já foram relatadas como região de entrada para outras

bactérias endofíticas, tais como *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar (James et al., 1994); e *Azoarcus* sp. em arroz (Reinhold-Hurek and Hurek, 1998).

Devido às particularidades constituintes do tecido foliar, a realização de análises com microscopia de fluorescência na parte aérea de plantas de *A. thaliana* inoculadas com a estirpe bacteriana HS-F não foram possíveis. Em contrapartida, ensaios de UFC foram realizados nas partes aérea e radicular de plantas a fim da estimativa da população bacteriana nesses tecidos. Os resultados obtidos demonstram que no tecido radicular a população bacteriana se encontrou em uma quantidade de aproximadamente  $1,7 \times 10^4$  UFC/g (Figura 5 B). Já na parte aérea não foram detectadas unidades formadoras de colônia, sugerindo que não há a colonização da parte aérea de plantas de *A. thaliana* por *H. seropedicae*.

Estudos com plantas de milho (*Zea mays*) e arroz (*Oryza sativa*) demonstram que, apesar da raiz ser a primeira região de contato de *H. seropedicae*, podem ocorrer migrações bacterianas através do xilema até a parte aérea das plantas hospedeiras (Olivares et al., 1996; Gyaneshwar et al., 2002; James et al., 2002; Reddy et al., 2002). Contudo, trabalhos demonstram que a colonização da parte aérea não é o fator que dita o sucesso da promoção do crescimento vegetal. Uma vez estabelecida a colonização por *H. seropedicae* em tecidos radiculares, epi ou endofiticamente, diversas modificações bioquímicas podem ser induzidas na planta hospedeira, culminando na promoção do crescimento (Gyaneshwar et al., 2002).

Com o intuito de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na promoção do crescimento vegetal de *A. thaliana* por *H. seropedicae*, bem como inferir a razão da ausência de colonização da parte aérea, análises das proteínas diferencialmente reguladas em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas foram realizadas. Como resultado de tais análises, realizadas via proteômica comparativa “shotgun”, foi possível observar a regulação positiva de 132 proteínas de folhas em resposta à associação com *H. seropedicae* (Figura 7).

Interessantemente, 21% das proteínas induzidas estão relacionadas à manutenção do estado redox celular. Em células vegetais, enzimas e metabólitos redox agem em sinergia para promoção da detoxificação de EROs (Gara et al., 2003). A indução deste sistema de detoxificação em folhas de *A. thaliana* ocasionada pela associação com *H. seropedicae* indica a presença de uma produção elevada de EROs neste tecido. A produção de EROs está associada a diversos fatores exógenos (fatores bióticos e abióticos) e endógenos (metabolismo

celular); e pode ter fins de sinalização e/ou de proteção contra uma infecção (Mittler et al., 2002). Amaral e colaboradores (2014) demonstraram por qRt-PCR a expressão de genes moduladores do estado redox em plantas de milho em resposta à associação com *H. seropedicae* estirpe SmR1. Em adição aos resultados obtidos no presente trabalho, esses dados sugerem que a indução de vias moduladoras do estado redox em plantas é um mecanismo comumente associado à colonização por *H. seropedicae*

As principais proteínas relacionadas à manutenção do estado redox induzida em folhas de *A. thaliana* em resposta à associação com *H. seropedicae* foram a Ferredoxina:Tiorredoxina Redutase e a AtTHX – Tiorredoxina X (Tabela 1). Interessantemente, ambas possuem a localização no cloroplasto, sugerindo uma alta produção de EROs neste compartimento celular. A taxa de produção de EROs é o principal fator de indicação do estado metabólico do cloroplasto: quanto maior a atividade fotossintética, maior a produção de EROs (Mullineaux et al., 2002). A indução da atividade de enzimas de manutenção do estado redox no cloroplasto de plantas inoculadas com *H. seropedicae* visualizada no presente trabalho sugere que um dos mecanismos utilizados para promoção do crescimento por esta bactéria é a potencialização da fotossíntese.

Interessantemente, a análise do conjunto proteômico relacionado à fotossíntese revelou 19 proteínas positivamente reguladas em folhas de *A. thaliana* durante a interação com *H. seropedicae* (Figura 9), sendo que, entre estas, 15 estão relacionadas aos Fotossistemas I e II (Figura 10). Tal fato corrobora com a hipótese da potencialização da fotossíntese em plantas de *A. thaliana* induzida por *H. seropedicae*. Diversos trabalhos demonstram a modulação de vias específicas da fotossíntese como mecanismo utilizado por BPCV para promover o crescimento em plantas. Contudo, a modulação destas vias ainda não havia sido demonstrada para *H. seropedicae*.

Além disso, as análises proteômicas de folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae* revelaram a regulação de 7 proteínas envolvidas no metabolismo de hormônios vegetais. A modulação hormonal é um mecanismo chave amplamente discutido na literatura como ferramenta de promoção do crescimento vegetal utilizada por micro-organismos benéficos. Entre as proteínas positivamente reguladas relacionadas ao metabolismo de fitohormônios estão uma proteína da família das auxinas, 2 proteínas do metabolismo do etileno (AtEFE;

AtACO2) e 2 proteínas do metabolismo dos jasmonatos (AtAOS; AtAOC3). Interessantemente, a proteína AtDWARF1, envolvida na via dos brassinosteroides, foi negativamente regulada. Estudos de mutagênese demonstram que o silenciamento da proteína AtDWARF1 leva ao fenótipo de nanismo em plantas de *A. thaliana*, pois esta é uma proteína chave relacionada à expansão e divisão celular (Schöder et al., 2014). Contudo, os dados observados no presente trabalho demonstram que a regulação negativa de AtDWARF1 não afetou a promoção do crescimento induzida por *H. seropedicae* em plantas de *A. thaliana*, sugerindo a existência da modulação de mecanismos compensatórios.

A análise das proteínas relacionadas ao processamento de metabólitos secundários revelou uma regulação positiva da proteína AtUDP-Glicosiltransferase em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae*. Esta proteína está envolvida na biossíntese de flavonoides (Hanada et al., 2010). Flavonoides são moléculas amplamente distribuídas nos tecidos vegetais, onde podem desempenhar distintas funções, tais como a detoxificação de EROs, proteção contra radiação UV e a proteção contra herbivoria e ataque de patógenos (Ferreira et al., 2012). Gough e colaboradores (1997) demonstraram, através da utilização plantas de *A. thaliana* em associação com *H. seropedicae*, que a adição de flavonoides potencializa a colonização em regiões de brotamento de raízes laterais. Contudo, o presente trabalho é pioneiro a sugerir uma indução da produção de flavonoides por *H. seropedicae* em suas plantas hospedeiras.

Adicionalmente, a análise do conjunto proteico relacionado a resposta a estresses bióticos, revelou a regulação positiva de duas proteínas PRs (*Pathogenesis-Related*) induzida em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae*. Uma das PRs induzidas foi uma Proteína Dirigente-like (Tabela 1). Proteínas dirigentes são descritas como participantes da biossíntese de lignina. A deposição de lignina na parede celular em resposta a invasões microbianas tem como efeito o bloqueio da dissipação da colonização para outras regiões da planta. Neste sentido, a indução de proteínas associadas à defesa contra patógenos em folhas de *A. thaliana* podem explicar o fato de *H. seropedicae* não conseguir estabelecer a colonização neste tecido.

Portanto, os dados obtidos neste trabalho confirmam a promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana* por *H. seropedicae*. A indução de diferentes vias por *H. seropedicae* em folhas de *A. thaliana* sugere que a promoção do

crescimento oriunda desta associação é obtida, principalmente pela potencialização da fotossíntese, acrescida da regulação e sinalização por fitohormônios. Os resultados deste trabalho contribuem para a compreensão dos mecanismos moleculares vegetais regulados por bactérias benéficas para a promoção do crescimento vegetal e, adicionalmente, servem de insumo para estudos visando o aumento da utilização de biofertilizantes na agricultura.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ *H. seropedicae* HRC54 promove o crescimento vegetal em plantas de *A. thaliana*, levando a um expressivo ganho de biomassa nas partes aérea e radicular;
- ✓ A colonização de raízes de *A. thaliana* por *H. seropedicae* HRC54 ocorre, preferencialmente, em regiões de brotamento de raízes laterais e na base de pelos radiculares;
- ✓ Não foram detectadas colônias de *H. seropedicae* HRC54 em folhas de plantas inoculadas de *A. thaliana*;
- ✓ A associação com *H. seropedicae* HRC54 regula positivamente, principalmente, as vias de manutenção do estado redox, fotossíntese e processamento de metabolismos secundários em folhas de *A. thaliana*;
- ✓ A indução de algumas proteínas PR observada em folhas de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *H. seropedicae* pode ser responsável pela ausência de colonização na parte aérea;

- ✓ A ativação das vias de defesa contra bactérias nas folhas de plantas inoculadas, abrem interessantes perspectivas quanto ao potencial efeito no biocontrole de fitopatógenos através da inoculação com *H. seropedicae*.
  
- ✓ Futuras análises acerca da eficiência fotossintética de plantas inoculadas permitirão averiguar o efeito funcional da inoculação com *H. seropedicae* no âmbito da fotossíntese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Babili S, Bouwmeester HJ (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 161–186.
- Aryal U, Xiong Y, McBride Z, Kihara D, Xie J et. al. (2014). A proteomic strategy for global analysis of plant protein complexes. *The Plant Cell*, 26: 3867-82
- Asselbergh B, De Vleeschauwer D, Hofte M (2008). Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Mol. Plant Microbe Interact* 21: 709–719.
- Azevedo JL, Maccheroni J, Pereira J, Araújo WL (2000). Endophytic microorganisms: An review on insect control and recent advantages on tropical plants. *Environmental Biotechnology* 3: 2000.
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Dobereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. *Int J Sys Bacteriol* 36:86–93
- Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Dobereiner J (1997) recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29: 911–922.

- Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Dobereiner J (1997) recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29:911–922
- Baldani VLD, Baldani JI, Dobereiner J (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* sp. *Biol Fertil Soils* 30:485–491
- Baldri DV, Vivanco JM (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* 32: 666–681
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24:7–11
- Berg G (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology* 84: 11-18
- Berg G (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture 84: 11-18
- Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol* 7:1673–1685
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN (2008) Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:199–209
- Bockman, OC (1997). Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: Perspectives for future agriculture. *Plant Soil* 194: 11–14.
- Boddey R (1999) Green energy from sugar cane. *Chemistry & Industry* 17:355–358.

- Boddey RM, de Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VLD, Döbereiner J (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174:195–209.
- Boddey RM, de Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FL, Baldani VLD, Döbereiner J (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174:195–209
- Bottini R, Fulchieri M, Pearce D, Pharis RP (1989) Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol* 90:45–47
- Brujin F (2015). Introduction – Book Section. *Biological Nitrogen Fixation*. City: Hoboken, NJ, USA
- Cavalcante, VA, Döbereiner J (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*, 108: 23–31.
- Chaves DF, de Souza EM, Monteiro RA, Pedrosa FO (2009) A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J Proteomics* 73:50–56
- Chen J, Su Z, Liu Y, Sandoghchian S, Zheng D, Wang S, Xu (2011) *Herbaspirillum* species: A potential pathogenic bacteria isolated from acute lymphoblastic leukemia patient. *Curr Microbiol* 62:331–333
- Crowley DE, Kraemer SM (2007) Function of siderophores in the plant rhizosphere. *The Rhizosphere, Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, CRC Press 73–109
- Cunnac S, Chakravarthy S, Kvitko BH, Russell AB, Martin GB, et al., (2011) Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 2975–2980.

- da Silva RM, Caugant DA, Eribe ERK, Jorn A, Lingaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I (2006) Bacterial diversity in aortic aneurysms determined by 16S ribosomal RNA gene analysis. *J Vasc Surg* 44:1055–1060
- De Gara L, Pinto MC, Tommasi F. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiol. Biochem* 41:863-870, 2003.
- Desbrosses G, Contesto C, Varoquaux F, Galland M, Touraine B (2009). PGPR-Arabidopsis interactions is a useful system to study signaling pathways involved in plant developmental control. *Plant Signal. Behav.* 4: 321–323
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22: 107-149.
- Dobereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. & Brazil, C.N. de P. de A. (1995). Como isolar e identificar bacterias diazotroficas de plantas nao-leguminosas.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T (2001) Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl Environ Microbiol* 67:5285–5293
- Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C et. al (2007). Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7059-7066
- Friedrich L, Vernooij E, Gaffney T, Mo A, Ryals J (1995). Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol. Biol.* 29: 959-968.
- Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany* 100: 1738–1750.

- Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J Theor Biol* 190:63–68
- Graham PH, Vance CP (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872–877.
- Grant MR, Jones JD (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324: 750–752
- Grant SR, Fisher E, Chang JH, Mole BM, Dangl JL (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60:425–449
- Gunnell D, Eddleston M, Phillips M, Konradsen F.(2007). The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. *BMC Public Health* 7: 1-15
- Gyaneshwar P, James EK, Reddy PM, Ladha JK (2002) *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytol* 154:131–145
- Hacker J, Carniel E (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO Rep* 2:376–381
- He SY, Nomura K, Whittam TS (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1694:181–206
- Hellmann B, Zelles L, Palojarvi, A, Bai, Q (1997). Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1011-1018.
- Huala E, Dickerman AW, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller LA, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral BW, Beavis W, Meinke DW, Town CD, Somerville C, Rhee SY (2001).

- The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res.* 29: 102-105.
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* 45: 101-27.
- Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379–433
- Hung R, Lee S, Bennett JW (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol.* 6:19–26
- Iniguez AL, Dong Y, Carter HD, Ahmer BM, Stone JM, Triplett EDW (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 169- 178
- James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res* 65:197–209
- James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res* 65:197–209
- James EK, Gyaneshwar G, Barraquio WL, Ladha JK (1999) Endophytic diazotrophs associated with rice. In: Ladha JK, Reddy PN (eds) *The quest for nitrogen fixation in rice*. International Rice Research Institute, Manila
- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth promotion bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15:894–906

- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth promotion bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15:894–906
- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth promotion bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15:894–906
- James EK, Gyaneshwar P, Mathan N (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth promotion bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microbe Interact* 15:894–906
- James EK, Olivares FL (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *CRC Crit Rev Plant Sci* 17:77–119
- Kaul S, Sharma T, Dhar MK (2016). “Omics” Tools for Better Understanding the Plant–Endophyte Interactions. *Frontiers in Plant Science* 7: 955
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M and Schroth MN (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885–886
- Kniskern J. M., Traw M. B., Bergelson J. (2007). SA and JA signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20 1512–1522 10.1094/MPMI-20-12-1512
- Leach AW, Mumford JD (2008) Pesticide Environmental Accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental Pollution* 151(1): 139-47
- Loake G and Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence—The players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 466-472

- Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *PNAS* 107: 496-501.
- Lugtenberg B, Chin-A-Woeng T, Bloemberg G (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:373–383
- Lugtenberg B. J. J., Malfanova N., Kamilova F., Berg G. (2013). “Plant growth promotion by microbes,” in *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere 2*: 561–573.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*. 63: 541–56.
- Ma G, Jin Y, Piao J, Kok F, Guusje B, Jacobsen E (2005). Phytate, Calcium, Iron, and Zinc contents and their molar ratios in foods commonly consumed in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 10285-10290.
- Malik KA, Rakhshanda B, Mehnaz S, Rasul G, Mirza MS, Ali S (1997) Association of nitrogen-fixing, plant-growthpromoting rhizobacteria (PGPR) with kallar Grass and rice. *Plant Soil* 194:37–44
- McCully ME (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust J Plant Physiol*
- Monteiro RA, Balsanelli E, Wasseem R, Marin AM, Brusamarello-Santos LCC, Schimidt MA, Tadra-Sfeir MZ, Pankievicz VCS, Cruz LM, Chubatsu LS, Pedrosa FO, Souza EM. (2012) Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. *Plant Soil* 356: 175-196
- Morrissey JP, Dow JM, Mark GL, Gara, F (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production? *EMBO Reports* 5(10): 922-926.

- Mota LJ, Sorg I, Cornelis GR (2005) Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiol Lett* 252:1–10
- Muthukumarasamy R, Revathi G, Vadivelu M (2000) Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. *Current Science* 78: 1063-1065
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S et. al. (2003) Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 33: 887-98
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, Quigg A, Santschi PH, Sigg L (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372–386
- Noctor G, Foyer CH (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active
- O’Callaghan M, Gerard EM, Johnson VW (2001). Effect of soil moisture and temperature on survival of microbial control agents. *N.Z. Plant Prot.* 54: 128-135.
- Oldroyd G (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* 11: 252-263.
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biol Fertil Soils* 21:197–200
- ONU. (2015). Organização das Nações Unidas. ONUDATA.
- Page D, Grossniklaus U (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* 3: 124-136.

- Patriquin DG, Döbereiner J, Jain DK (1983) Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can J Microbiol* 29:900–915
- Pedrosa FO, Monteiro RA, Wasseem R, Cruz LM et al (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*.
- Petrini, O. Fungal endophytes of tree leaves (1991). *Microbial ecology of the leaves* 5: 187
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* 5: 308-316
- Pimentel JP, Olivares FL, Pitard R, Urquiaga S, Akiba F, Döbereiner J (1991) Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 137:61–65
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C (2007). Unraveling mycorrhizainduced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 393-398.
- 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.
- 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.
- Reinhold-Hurek, B, Hurek T (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology* 6: 139-144.

- Reis VM, Baldani JI, Baldani VLD, Döbereiner J (2000) Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm tree. *Crit Rev Pl Sc* 19:227–247
- Riesenfeld C, Schloss P, Handelsman J (2004) Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annual Review of Genetics* 38: 525-552
- Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91: 552-555.
- Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM (2003a) Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedlings. *Symbiosis* 35:01–10
- Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM (2003b) Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol Ecol* 45:39–47
- Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM (2003a) Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedlings. *Symbiosis* 35:01–10
- Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM (2003b) Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol Ecol* 45:39–47
- Salisbury, F.B., and C. Ross. (1992). (4th ed.) *Plant Physiology*. Wadsworth, Belmont, CA.

- Schwessinger B, Bahar O, Thomas N, Holton N, Nekrasov V et. al. (2015) Transgenic Expression of the Dicotyledonous Pattern Recognition Receptor EFR in Rice Leads to Ligand-Dependent Activation of Defense Responses. *Plos Pathogens* 11(3)
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6:410-417
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31:425–448
- Stoltzfus JR, So R, Malarvizhi PP, Ladha JK, de Bujin FJ (1997) Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* 194:25–36
- Stüeken E, Buick R, Guy B, Koehler M (2015). Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. *Nature* 520: 666-669.
- Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y, Martin GB (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Sci* 274:2060–2062
- Tommasi F, Paciolla C, de Pinto MC, De Gara L (2001). A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J. Exp. Bot.* 52: 1647–1654.
- Triplett EW (1996) Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant Soil* 186:29–38
- Troncoso-Ponce MA, Cao X, Yang Z, Ohlrogge JB (2013). Lipid turnover during senescence. *Plant Sci.* 205–206, 13–19

- Umehara M, Hanada A, Magome H, Takeda-Kamiya N, Yamaguchi S (2010). Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller bud outgrowth under phosphate deficiency in rice. *Plant Cell Physiol* 51:1118-1126
- Van der Ent S, Van Wees SC, Pieterse CM (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70: 1581-1588
- Van Loon LC, Rep M and Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44:135-162
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* 157: 423–447
- Verhage A, Van Wees SCM, Pieterse CMJ (2010) Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol*
- Verma SC.; Ladha JK, Tripathi AK (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep-water rice. *Journal of Biotechnology* 91:127–141.
- Vessey JK (2003) Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586
- Vitousek P, Porder S, Houlton B, Chadwick O (2010). Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen–phosphorus interactions. *Ecological Applications* 20: 5-15
- Walters DR, McRoberts N. (2006) Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends Plant Sci.* 11: 581–586.

- Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY (2005). Control of root cap formation by microRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2204–2216
- Wang W.-H., Yi X.-Q., Han A.-D., Liu T.-W., Chen J., Wu F.-H., Dong X.-J., He J.-X., Pei Z.-M., Zheng H.-L (2012). Calcium-sensing receptor regulates stomatal closure through hydrogen peroxide and nitric oxide in response to extracellular calcium in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 63:177–190
- Weber OB, Baldani VLD, Teixeira KRS, Kirchhof G, Baldani JI, Döbereiner, J (1999). Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* 210:103-113.
- Weber OB, Cruz LM, Baldani JI, Döbereiner J (2001) *Herbaspirillum*- like bacteria in banana plants. *Braz J Microbiol* 32:201–205
- Wu CH, Bernard SM, Andersen GL, Chen W (2009) Developing microbe-plant interactions for applications in plantgrowth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial Biotec* 2:428–440
- Yanni YG, Rizk RY, Corish V, Squartini A, Ninke K, Philip-Hollingsworth S, Orgambide G, de Bruijn FD, Stoltzfus J, Buckley D, Schmidt TM, Mateos PF, Ladha JK, Dazzo FB (1997) Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential of promote rice growth. *Plant Soil* 194:99–114
- Ziga ED, Druley T, Burnham Carey-Ann D (2010) *Herbaspirillum* species bacteremia in a pediatric oncology patient. *J Clin Microbiol* 48:4320–4321