

Alexandro César Faleiro

ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* FP2
COM RAÍZES DE MILHO (*Zea mays*) POR qPCR,
MICROSCOPIA ELETRÔNICA E PROTEÔMICA

Tese submetida ao Programa de
Pós-graduação em Recursos
Genéticos Vegetais da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciências
Orientador: Prof. Dr.^a Ana Carolina
Maisonnave Arisi

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Faleiro, Alexandro César

Análise da interação de *Azospirillum brasilense* FP2 com raízes de milho (*Zea mays*) por qPCR, microscopia eletrônica e proteômica / Alexandro César Faleiro ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi - Florianópolis, SC, 2014.

107 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Azospirillum brasilense*. 3. Milho. 4. Interação planta-bactérias. 5. Proteômica. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Alexandro César Faleiro

ANÁLISE DA INTERAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* FP2
COM RAÍZES DE MILHO (*Zea mays*) POR qPCR,
MICROSCOPIA ELETRÔNICA E PROTEÔMICA

Florianópolis, 11 de Fevereiro de 2014.

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr. - Coordenador do Programa
de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais

Banca Examinadora:

Prof.^a Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dr.^a – Orientadora (UFSC)

Prof.^a Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, Dr. – (UFSC)

Prof. Fabio Lopes Olivares, Dr. – (UENF)

Prof. Leda Satie Chubatsu, Dr.^a – (UFPR)

Prof. Marisa Santos, Dr.^a – (UFSC)

Prof. Rosete Pescador, Dr.^a – (UFSC)

À minha amada esposa Márcia e aos meus amados filhos, Leonardo Henrique e Pedro Vinícius, pelo carinho, amor e compreensão pelo meus imensos momentos de ausência, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por me manter sempre no caminho certo;

À Universidade Federal de Santa Catarina por me proporcionar a estrutura física e logística que me permitiram desenvolver este trabalho;

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela orientação, dedicação, apoio e críticas fundamentais à realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais por me proporcionar a oportunidade de realizar o meu doutoramento;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, por todo o conhecimento que compartilharam;

À Bernadete Maria Possebon Ribas, secretária do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela atenção dedicada e por todo o auxílio prestado em relação aos assuntos administrativos internos ao programa;

À UNEMAT – Universidade do Estado de Mato Grosso, por acreditar na minha capacidade enquanto professor e pesquisador, concedendo meu afastamento a fim de possibilitar minha qualificação;

À FAPEMAT – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso, pela concessão da bolsa;

Ao INCT/FBN por proporcionarem os recursos necessários para a execução deste trabalho;

A meus pais, Ercílio Aparecido Faleiro e Shirley Therezinha Faleiro, pelo amor a mim dedicado, por estarem sempre ao meu lado e por tudo o que me ensinaram;

Ao meu irmão, Ercílio Aparecido Faleiro Júnior e, à minha irmã, Giovana Cyntia Faleiro, por todos os momentos que passamos juntos;

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram em todos os momentos;

Aos meus amigos do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Tangará da Serra, que, mesmo distantes geograficamente, sempre estiveram muito próximos;

Aos mestres com carinho: Prof.^a Neide Rodrigues, que despertou meu interesse pela Biologia e, Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Pires da Silva Machado, responsável pela minha iniciação na pesquisa científica e por seu exemplo, como pessoa e pesquisadora;

A todos os meus ex-alunos, que ao longo de 18 anos de carreira, sempre ensinaram, a este professor, muito mais do que lhes foi ensinado;

Aos meus amigos e colegas de trabalho Eliandro Espíndula, Fábio Cristiano Angonesi Brod, Fernanda Plucani do Amaral, Jéssica C. F. Bueno, Geisi de Melo Bálamo, Pedro Alexandre Valentim Neto, Tomás Pellizzaro Pereira e aos demais colegas do laboratório por toda a ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Marisa Santos e à M.Sc. Thaysi Ventura de Souza pelo imenso apoio na preparação do material para microscopia eletrônica de varredura.

“The value of a college education is not the learning of many facts but the training of the mind to think”.

(Albert Einstein, 1921)

RESUMO

As rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) são um grupo de micro-organismos benéficos às plantas devido à sua capacidade de estimular o crescimento vegetal através de vários processos. Uma das mais importantes e estudadas RPCV é a *Azospirillum brasilense*, uma diazotrófica associada com importantes culturas tais como milho e trigo, a qual possui ampla distribuição geográfica e tem sido usada como organismo modelo para investigar a promoção do crescimento vegetal associativo. Vários mecanismos estão envolvidos na promoção do crescimento vegetal por *A. brasilense*, entre eles: capacidade de fixação biológica de nitrogênio e à produção de fitormônios, os quais levam à formação de raízes laterais e, conseqüentemente, à melhor adsorção de água e minerais e, à maior tolerância a estresses, promovendo efeitos positivos sobre os mecanismos de defesa. Neste trabalho foram avaliados parâmetros de crescimento de duas variedades de milho Dekalb 240 (DKB240) e Pioneer 30F53 (P30F53), crescimento bacteriano nas raízes e perfil de proteínas em uma variedade (P30F53) quando as plântulas foram crescidas *in vitro*. Realizou-se a detecção e quantificação por PCR em tempo real de *A. brasilense* em plântulas de duas variedades de milho. Os iniciadores foram desenhados e sua especificidade foi verificada usando DNA de 12 diferentes espécies de bactérias. Os resultados dos experimentos de qPCR apresentaram valores dentro da variação aceitável para qPCR, eficiência média de 95% e coeficiente de correlação de 0,98, indicando que o gene *nifA* é adequado para a análise quantitativa do genoma alvo bacteriano. O número de cópias de DNA bacteriano por grama de massa fresca de raiz aumentou de $3,3 \times 10^6$ (1 DAI) para $5,3 \times 10^9$ (10 DAI) quando raízes inoculadas de milho da variedade DKB240 foram analisadas e, da mesma maneira, variando de 6×10^6 (1 DAI) para $6,8 \times 10^9$ (10 DAI) na variedade P30F53 quando cultivadas *in vitro*. Os iniciadores desenvolvidos visando *nifA* serão úteis para monitorar *Azospirillum brasilense* FP2 em culturas no sistema solo-planta. Comparando-se plântulas da variedade P30F53, controle e inoculadas com *A. brasilense* FP2, foram encontradas diferenças significativas 7 dias após a inoculação (DAI) em 7 dos 8 parâmetros avaliados (massa fresca e tamanho da folha, massa fresca e tamanho da raiz principal, número de raízes laterais, massa fresca e número de raízes adventícias e massa fresca total das raízes). A observação de raízes através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que *A. brasilense* FP2 se liga à superfície radicular, tanto na região do ápice quanto do terço médio, e podem ser encontradas como células simples ou agregadas. A análise do perfil de

proteínas, obtido através da técnica de eletroforese bidimensional (2DE), revelou 46 *spots* diferencialmente acumulados em raízes de milho da variedade Pioneer 30F53 inoculadas com *A. brasilense* FP2. Os *spots* foram analisados por espectrometria de massa e três proteínas apresentaram homologia com proteínas hipotéticas de milho e arroz.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, interação planta-bactéria; milho, inoculante, proteômica, eletroforese bidimensional, *nifA*

ABSTRACT

The plant growth promoting bacteria (PGPB) are a group of microbes beneficial to plants due to its ability to stimulate plant growth by various processes. One of the most important and studied PGPB *Azospirillum brasilense* is a diazotrophic associated with major crops such as corn and wheat, which widely spread and has been used as a model organism to investigate the associative plant growth promotion. Several mechanisms are involved in the promotion of plant growth by *A. brasilense*, including: the ability of biological nitrogen fixation and production of phytohormones, which leads to the formation of lateral roots and thus the better absorption of water and minerals, greater tolerance to stress, have positive effects on the mechanisms of defense. In this work, the growth parameters of two varieties of corn Dekalb 240 (DKB240) and Pioneer 30F53 (P30F53), bacterial growth in roots and protein profile in a variety (P30F53) when seedlings were grown *in vitro* were evaluated. We carried out the detection and quantification by real time PCR *A. brasilense* seedlings in the two varieties of corn. Primers were designed and their specificity was verified using DNA from 12 different bacterial species. qPCR efficiency and correlation coefficient presented values within the acceptable range for qPCR, average efficiency of 95% and a correlation coefficient of 0.98, indicating that the *nifA* gene is suitable for the quantitative analysis of target bacterial genome. Bacterial DNA copy number per gram of fresh root increased from 3.3×10^6 (one DAI) to 5.3×10^9 (ten DAI) when inoculated maize roots of DKB 240 variety were analyzed and, in the same way, it ranged from 6×10^6 (one DAI) to 6.8×10^9 (ten DAI) in P30F53 variety when cultured *in vitro*. The primers developed targeting *nifA* gene will be useful for monitoring *Azospirillum brasilense* growth in crops. Comparing control seedlings (variety Pioneer 30F53) inoculated with *A. brasilense* FP2, significant differences were observed 7 days after inoculation (DAI) in 7 out of 8 evaluated parameters (fresh weight and leaf size, fresh weight and size of the main root, lateral root number, fresh weight and number of adventitious roots and total fresh weight of roots). The observation of roots by scanning electron microscopy (SEM) showed that *A. brasilense* FP2 binds to the root surface, both in the region of the apex and the middle third, and may be found as single cells or aggregated. Analysis of the protein profile obtained using the technique of two-dimensional electrophoresis (2DE) revealed 46 proteins differentially accumulated in roots of maize (variety Pioneer 30F53) inoculated with *A. brasilense* FP2. The spots were

analyzed by mass spectrometry and three proteins presented homology with hypothetical proteins from corn and rice.

Keywords: *Azospirillum brasilense*; plant-bacteria interaction, maize, qPCR, inoculant, proteomics, two-dimensional electrophoresis, *nifA*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1 - Curva padrão gerada qPCR utilizando três extrações de DNA a partir de *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 como DNA molde. (A) Ct versus log do número de cópias de DNA. Média Ct \pm DP (n = 14). (B) Ct versus log UFC (n = 3). 50
- Figura 1.2 – Número de cópias de DNA bacteriano em plantas de milho cultivadas *in vitro* após a inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe FP2. (A) a variedade DKB240 e (B) P30F53 variedade. As amostras inoculadas foram coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação. Os dados são apresentados como médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de amostragem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). 53
- Figura 1.3 – Número de cópias de DNA bacteriano em plântulas de milho (variedade P30F53) cultivado em potes após a inoculação com *Azospirillum brasilense* linhagem FP2. Amostras inoculadas coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI). Os dados são apresentados como médias \pm DP (n=9). Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre os tempos de amostragem pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$). (ESPÍNDULA, 2013). 54
- Figura S1.1 - PCR de raízes de milho, utilizando iniciadores (A) AznifA-A visando o gene *nifA* gene de *Azospirillum brasilense* (439 pb) e (B) visando gene zeína de milho ZEO (329 pb). As plântulas (variedade DKB 240) foram cultivadas *in vitro*. Superior: 1 – Marcador Molecular (50 pb); 2 a 4 – Controle 1 D.A.I.; 5 a 7 – Controle 4 D.A.I.; 8 a 10 – Controle 7 D.A.I.; 11 a 13 – Controle 10 D.A.I.; 14 – *Azospirillum brasilense* FP2. Legenda Parte Inferior: 1 – Marcador Molecular (50 pb); 2 a 4 – Inoculado 1 D.A.I.; 5 a 7 – Inoculado 4 D.A.I.; 8 a 10 – Inoculado 7 D.A.I.; 11 a 13 – Inoculado 10 D.A.I.; 14 – *Azospirillum brasilense* FP2. 10 μ l do produto de PCR + 1 mL de tampão de carregamento por canaleta.60
- Figura S1.2 - PCR de raízes de milho, utilizando iniciadores (A) AznifA-A visando o gene *nifA* gene de *Azospirillum brasilense* (439 pb) e (B) visando gene zeína de milho ZEO (329 pb). As plântulas (variedade P30F53) foram cultivadas *in vitro*. Superior: 1 – Marcador Molecular (50 pb); 2 a 4 – Controle 1 D.A.I.; 5 a 7 – Controle 4 D.A.I.; 8 a 10 – Controle 7 D.A.I.; 11 a 13 – Controle 10 D.A.I.; 14 – *Azospirillum brasilense* FP2. Legenda Parte Inferior: 1 – Marcador Molecular (50 pb); 2 a 4 – Inoculado 1 D.A.I.; 5 a 7 – Inoculado 4 D.A.I.; 8 a 10 – Inoculado 7 D.A.I.; 11 a 13 – Inoculado 10 D.A.I.; 14 – *Azospirillum brasilense* FP2. 10 μ l do produto de PCR + 1 mL de tampão de carregamento por canaleta.61

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 - Parâmetros de crescimento de plântulas de milho (variedade P30F53) cultivadas <i>in vitro</i> após a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2. Amostras controle e inoculadas coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos (controle e inoculado) em cada tempo de amostragem para o teste <i>Wilcoxon</i> ($P < 0,05$). Os dados são apresentados como médias \pm DP (n = 27).....	74
Figura 2.2 – Eletromicrografia de superfície de raízes de milho inoculadas com <i>A. brasilense</i> FP2. Bactérias como células simples associadas às células epidérmicas da região do ápice da raiz de milho da variedade P30F53 4 DAI..	75
Figura 2.3 – Eletromicrografia de superfície de raízes de milho (variedade P30F53) inoculadas com <i>A. brasilense</i> FP2. A e B: Bactérias como células simples (setas brancas) e bactérias reunidas em pequenos grupos (setas pretas) associados com as células epidérmicas de ápice da raiz (B).....	76
Figura 2.4 – Eletromicrografia de superfície de raízes de milho inoculadas com <i>A. brasilense</i> FP2, mostrando a formação de biofilme sobre a superfície das células da epiderme na região do terço médio da raiz de milho da variedade P30F53 7 DAI. Note-se a presença de espesso material do tipo fibrilar (FM), produzido pelas células bacterianas.....	77
Figura 2.5 – Eletromicrografia de superfície de raízes de milho inoculadas com <i>A. brasilense</i> FP2. A e B: Bactérias como células simples (setas brancas) e células agregadas (setas pretas) associados com as células epidérmicas da região do ápice de raiz de milho da variedade P30F53 10 DAI.....	78
Figura 2.6 – Forma vibrióide de <i>A. brasilense</i> FP2 (VAS) na superfície de células da epiderme na região do terço médio da raiz de milho (P30F53) 7 DAI. Note-se a presença de espesso material do tipo fibrilar (FM), produzido pelas células bacterianas.....	79
Figura 2.7 - Géis de referência (2DE) do proteoma de raízes de milho da variedade P30F53, raízes de milho controle (C3) e inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> linhagem FP2 (I2). O <i>spot</i> 411 apresentou expressão diminuída em raízes controle, enquanto os <i>spots</i> 904 e 1434 apresentaram expressão aumentada nas raízes inoculadas.....	80
Figura S2.1 – Padrão do proteoma (2DE) da variedade de milho P30F53, géis de raízes controle (C1 e C2) e inoculadas (I1 e I3) com <i>Azospirillum brasilense</i> linhagem FP2.....	89

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 - Número de bactérias (log ₁₀ UFC/g de raiz fresca), de plântulas milho (variedades DKB240 e P30F53) cultivadas <i>in vitro</i> após a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> linhagem FP2. As raízes foram coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI).	47
Tabela 1.2 - Valores de Ct e T _m gerados pelo ensaio de especificidade por qPCR utilizando iniciadores AznifAF12/AznifAF19 e DNA extraído a partir de <i>Azospirillum brasilense</i> ou outras bactérias como DNA molde.....	49
Tabela 1.3 - Parâmetros das curvas padrão de qPCR para a quantificação de <i>Azospirillum brasilense</i> usando diluição seriada de DNA bacteriano.....	50
Tabela 1.4 - Comparação dos valores de Ct para ensaios de qPCR de <i>Azospirillum brasilense</i> para 6 diluições seriadas de DNA bacteriano.	51
Tabela 1.5 - Parâmetros das curvas padrão de qPCR para a quantificação de <i>Azospirillum brasilense</i> usando diluição seriada de DNA de raízes de milho inoculadas ou diluição seriada de DNA bacteriano na presença de DNA <i>background</i> de raízes controle de milho.	52
Tabela S1.1 - Contagem em placa (alíquota de 0,1 ml) da cultura de <i>A. brasilense</i> (DO _{600nm} 0,8) após diluição seriada.....	59
Tabela S1.2 - Detecção de <i>Azospirillum brasilense</i> linhagem FP2 em raízes de plântulas de milho (variedades P30F53 e DKB240) por PCR usando iniciadores AznifA-A. As plantas foram cultivadas <i>in vitro</i>	59

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 - Número total de <i>spots</i> e de <i>spots</i> correspondentes, coeficiente angular e coeficiente de correlação dos gráficos de dispersão dos mapas 2DE de raízes controle (C) e raízes inoculadas (I).	81
Tabela 2.2 - <i>Spots</i> de proteínas diferencialmente acumulados nas raízes de milho inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> linhagem FP2 com relação as raízes controle de milho.	82
Tabela 2.3 - Proteínas identificadas por espectrometria de massa a partir de mapas 2DE de raízes de milho controle e inoculadas com <i>Azospirillum brasilense</i> linhagem FP2.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE: Eletroforese bidimensional
ACN: Acetonitrila
AIA: Ácido Indol-3-Acético
CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamônio]-propano sulfonato
Ct: Ciclo limiar
CTAB: Brometo de cetil trimetil amônio
CV: Coeficiente de variação
DAI: Dias após a inoculação
DNA = Ácido Desoxiribonucleico
DO: Densidade óptica
DP: Desvio padrão
DTT: Ditiotreitól
EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético
EM: Espectrometria de massa
IEF: Focalização isoeletrica
IPG: Gradiente de pH imobilizado
NaCl: Cloreto de sódio
NaIR: Resistente ao ácido nalidíxico
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PMSF - Fluoreto de fenilmetanosulfonila
qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RPCV: Rizobactéria promotora de crescimento vegetal
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SmR: Resistente à estreptomicina
TCA: Ácido tricloroacético
TFA: Ácido trifluoroacético
Tris-HCl: Tris(hidroximetil)aminometano cloridrato
UFC: Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (RPCV)	27
O Gênero <i>Azospirillum</i>	29
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	33
Análise Proteômica	34
Capítulo 1	
Deteção por PCR em tempo real visando o gene <i>nifA</i> da bactéria promotora de crescimento vegetal <i>Azospirillum brasilense</i> linhagem FP2 em raízes de milho	37
RESUMO	39
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	42
Linhagens bacterianas	42
Germinação, inoculação e crescimento de mudas	43
Ensaio de colonização das raízes	44
Protocolos de extração de DNA	44
Desenho dos Iniciadores	45
Deteção por PCR	45
Quantificação por PCR em tempo real	45
A construção das curvas padrão	46
RESULTADOS	46
Colonização de milho após a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i>	46
PCR convencional	47
Otimização da quantificação do DNA bacteriano por PCR em tempo real	48
Quantificação do DNA bacteriano em raízes de milho por PCR em tempo real	52
DISCUSSÃO	54

CONCLUSÕES	57
AGRADECIMENTOS	57
Material Suplementar	59
CAPÍTULO 2	
Perfil proteômico de raízes de milho (variedade P30F53) inoculado com <i>Azospirillum brasilense</i> linhagem FP2	63
RESUMO	65
INTRODUÇÃO	67
MATERIAL E MÉTODOS	69
Inoculação de mudas e condição de crescimento	69
Avaliação dos parâmetros de crescimento	69
Microscopia eletrônica de varredura	70
Extração de proteínas por eletroforese em gel bidimensional	70
Eletroforese em gel bidimensional (2DE)	71
Digestão de proteínas e análise de MALDI-TOF-MS	72
RESULTADOS	73
Avaliação dos parâmetros de crescimento	73
Microscopia eletrônica de varredura	73
Eletroforese em gel bidimensional (2DE)	79
Espectrometria de Massa	82
DISCUSSÃO	84
CONCLUSÃO	87
AGRADECIMENTOS	88
Material suplementar	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

INTRODUÇÃO

Os benefícios da utilização de fertilizantes químicos, tais como fosfato e nitrogênio inorgânico são conhecidos há quase 200 anos, porém, o potencial máximo de crescimento e rendimento esperado das culturas raramente é obtido, principalmente devido à mistura inadequada ou taxas inefetivas de mobilização dos nutrientes necessários ao crescimento das plantas. Um dos motivos para não se alcançar consistentemente altos rendimentos pode ser a disponibilização variável de nutrientes do solo por micro-organismos, porém, esses processos são dificilmente estudados devido à sua complexidade (KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKES, 2004).

Além disso, a intensa utilização de fertilizantes químicos, principalmente, os nitrogenados traz graves consequências tanto à saúde humana quanto ao ambiente. Em relação ao ambiente, o uso desses compostos pode causar a eutrofização de rios e de áreas costeiras; redução da biodiversidade, mudança na composição das espécies terrestres e dos ecossistemas aquáticos, poluição de reservatórios de água subterrâneos com nitrito e nitrato e aumento de gases do efeito estufa, resultando na poluição da troposfera e acidificação do solo e da água doce. Até 2050, a necessidade de se produzir alimentos poderá gerar um grande impacto ambiental, tornando-se a principal fonte de mudanças ambientais globais provocadas pela ação humana. Assim, os impactos da agricultura dependerão do manejo da área cultivada nesse período (TILMAN et al., 2001).

Esses problemas e as crescentes preocupações em relação ao uso de fertilizantes inorgânicos, irrigação, herbicidas e pesticidas têm levado à busca de estratégias alternativas de combate à limitação de nutrientes do solo e níveis de água e ao efeito de ervas daninhas e de pragas nas culturas. A maior utilização de micro-organismos em sistemas agrícolas poderia permitir a redução do uso de fertilizantes inorgânicos, água, herbicidas e pesticidas (ANDREWS; HODGE; RAVEN, 2010).

Segundo Mehnaz et al. (2010), as bactérias são organismos com um enorme potencial para beneficiar sistemas agrícolas e ambientais, pois desenvolvem complexas interações com plantas. Essas interações podem ser benéficas, promovendo o crescimento e o aumento da produção agrícola; deletérias, causando doenças na planta ou neutras (DOBBELAERE, S; VANDERLEYDEN; OKON, 2003). Tais interações podem beneficiar o crescimento e o desenvolvimento vegetal; alterar a dinâmica de nutrientes e a susceptibilidade da planta à doenças e a estresses abióticos (MORGAN; BENDING; WHITE, 2005).

As interações benéficas ou positivas podem ocorrer através da síntese de compostos, do aumento na disponibilidade de nutrientes, da promoção do crescimento por influência do balanço hormonal e da tolerância ao estresse, entre outras (ANDREWS et al., 2010), com consequente aumento na produção de biomassa de raízes e folhas (ALONI et al., 2006; PEDRAZA et al., 2009).

Atualmente, várias espécies de bactérias diazotróficas estão sendo estudadas devido a sua capacidade de estabelecer associações endofíticas promovendo o crescimento de cereais e de gramíneas de grande interesse econômico, tais como, milho, trigo, arroz, cana-de-açúcar (CHUBATSU et al., 2012; PEDROSA et al., 2011; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011) e a fixação biológica do nitrogênio.

Há quase 40 anos, as bactérias do gênero *Azospirillum* têm se destacado na promoção do crescimento vegetal e no aumento de rendimento de culturas (OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Diversos estudos têm relatado a ação de *Azospirillum* sp. na síntese de fitormônios (MONTAÑEZ et al., 2012), crescimento das raízes (MASCIARELLI et al., 2013) e na fixação biológica do nitrogênio (BALDANI, J.; BALDANI, 2005; BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004).

O nitrogênio é um importante nutriente vegetal, pois está envolvido na síntese de moléculas essenciais ao metabolismo da planta, como os ácidos nucleicos e as proteínas, e que estão envolvidas no desenvolvimento e na produtividade (OKUMURA et al., 2011).

No entanto, 98% do nitrogênio do solo está disponível na forma orgânica, ou seja, em uma forma não disponível às plantas, dependendo de micro-organismos presentes no solo para a conversão do nitrogênio em suas formas minerais e apenas 2% do nitrogênio presente no solo está disponível nas formas inorgânicas de amônio (NH_4^+) e/ou nitrato (NO_3^-), prontamente disponíveis, a partir da mineralização através da hidrólise enzimática produzida pela atividade de micro-organismos no solo (BALDE et al., 2011; RESTOVICH; ANDRIULO; PORTELA, 2012), pela aplicação de fertilizantes nitrogenados (CIAMPITTI; VYN, 2012) e pela fixação biológica do nitrogênio da atmosfera (BASHAN et al., 2004; SANT'ANNA et al., 2011).

Por este motivo, há mais de 10 anos, práticas de cultivo utilizando rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) capazes de promover a fixação do nitrogênio atmosférico N_2 , têm sido apresentadas como uma alternativa natural ao fornecimento de nitrogênio (DOBBELAERE, S. et al., 2002). No entanto, para que ocorra essa

associação, é necessária uma relação íntima entre as RPCV e a planta hospedeira (VERMA et al., 2010).

Porém, o genótipo da planta, as condições de cultivo e a população bacteriana são fatores importantes a serem considerados na interação planta-bactéria, podendo influenciar diretamente no efeito da interação em relação ao crescimento vegetal (MONTEIRO et al., 2012). Desta forma, o emprego de abordagens mais amplas, como a análise proteômica, permite aos pesquisadores investigar mais detalhadamente a resposta de plantas e bactérias envolvidas neste tipo de interação (CHENG; MCCONKEY; GLICK, 2010).

Diversos estudos de análise proteômica tem sido realizados para investigar a interação entre RPCV e plantas de interesse econômico tais, como trigo (IRAR et al., 2010), feijão (GOMES et al., 2012), pepino (LI, J. et al., 2013), tremoço (ALVES et al., 2011), arroz (XU et al., 2013), cana-de-açúcar (DOS SANTOS et al., 2010) e milho (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2013).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na interação planta-bactéria é de suma importância para o desenvolvimentos de inoculantes capazes de promover aumento no rendimento das culturas e, ainda, permitir a redução do uso de fertilizantes nitrogenados. Considerando que, em menos de 40 anos, a necessidade de aumento na produção de grãos, entre eles o milho, poderá se tornar a principal causa de impactos ambientais promovidos pelo homem, é de suma importância investigar como o milho responde à inoculação com RPCV. Assim, o emprego da análise proteômica no estudo de proteínas envolvidas na interação milho-RPCV, permitirá um melhor entendimento desta interação.

Esta tese é apresentada em forma de capítulos, sendo no capítulo 1 apresentado, em forma de artigo, o desenvolvimento de um ensaio de detecção e quantificação por PCR em tempo real visando o gene *nifA* da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 em raízes de milho.

No capítulo 2 é apresentado, em forma de artigo, um estudo sobre análise proteômica de raízes de milho da variedade P30F53 inoculadas com *A. brasilense* linhagem FP2.

Por fim, são feitas as considerações finais sobre os resultados obtidos neste trabalho.

Os objetivos desta tese foram desenvolver um ensaio qPCR para monitorar a presença de *A. brasilense* em plantas e realizar a análise proteômica da interação *Zea mays*-*Azospirillum brasilense*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (RPCV)

As RPCV são capazes de colonizar o sistema radicular e promover o crescimento vegetal através de diversos mecanismos, tais como a produção ou degradação de fitormônios, a fixação biológica do nitrogênio e, ainda, quando diminuem ou previnem o efeito deletério de patógenos vegetais, os quais podem diminuir ou bloquear processos metabólicos. (DODD et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; VERMA et al., 2010).

No Brasil, as pesquisas sobre a fixação biológica do nitrogênio em gramíneas, iniciaram-se com Johanna Döbereiner em 1953, com o estudo sobre a ocorrência de *Azotobacter* em solos ácidos da Baixada Fluminense. Em 1958 e 1963, respectivamente, foram descritas duas novas espécies de bactérias associadas com a rizosfera de gramíneas: *Beijerinckia fluminensis* em cana-de-açúcar (DÖBEREINER, JOHANNA; RUSCHEL, 1958) e *Azotobacter paspali* em *Paspalum notatum* cv. batatais (DÖBEREINER, J., 1966).

Nos anos 70, a introdução do método de redução do acetileno e o desenvolvimento do meio sólido NFb permitiram grandes avanços nos estudos da FBN. Este meio permitiu o isolamento das espécies *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*, iniciando os estudos da FBN em gramíneas no Brasil e no mundo. A pesquisa concentrou-se em várias áreas da interação entre as plantas e bactérias, incluindo os próprios micro-organismos (BALDANI, J.; BALDANI, 2005). A partir desses estudos iniciais, surgiram várias linhas de pesquisa com foco na aplicação agrícola, tais como efeitos hormonais, assimilação e fixação biológica de nitrogênio (BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, 1982).

As pesquisas sobre a colonização de tecidos vegetais por diazotróficos recebeu muita atenção entre os anos de 1985 a 1990 e, durante esse período, vários aspectos da interação planta-bactéria começaram a ser compreendidos (BALDANI, J.; BALDANI, 2005). Duas novas espécies de RPCV capazes de colonizar o interior de tecidos vegetais de plantas de milho, sorgo e arroz, foram isoladas: *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI, J. I. et al., 1986) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988).

A partir da introdução do conceito de endófito por Döbereiner (1992), surge uma nova área em relação aos estudos de fixação biológica de nitrogênio devido aos grandes avanços tanto na compreensão da

fisiologia, ecologia e genética, quanto na interação planta-bactéria (BALDANI, J. et al., 1997).

A espécie *Spirillum lipoferum* foi descoberta no Brasil como bactéria diazotrófica associada à rizosfera e às raízes de várias gramíneas (DÖBEREINER, J.; DAY, 1975). Tarrand et al. (1978), baseados em estudo de homologia DNA:DNA, reclassificaram as bactérias da espécie *Spirillum lipoferum* em duas espécies de RPCV, a *Azospirillum brasilense* e a *Azospirillum lipoferum*. O gênero *Azospirillum* tem sido estudado com a finalidade de se verificar a resposta da planta à inoculação em relação ao aumento do crescimento e acúmulo de nitrogênio associados com a atividade da nitrogenase, conforme demonstrado por ensaios de redução do acetileno (OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, 1994; SUMNER, 1990).

Segundo Schloter e Hartmann (1998), diazotróficos endofíticos, tais como, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum* spp. e algumas linhagens de *A. brasilense*, tendem a colonizar o córtex da raiz, podendo penetrar na endoderme para colonizar o estelo, a partir do qual podem ser, subsequentemente, transportados para a parte aérea das plantas.

Roncato-Maccari et al. (2003), estudaram a interação entre plantas de milho, sorgo, trigo e arroz com a linhagem LR15 de *H. seropedicae*, a qual é um mutante Nif⁺ (*Pnif::gusA*) obtido pela inserção de um cassete *gusA*-canamicina dentro do gene *nifH* da linhagem selvagem de *H. seropedicae*. Análises histoquímicas das plantas mostraram que a linhagem LR15 colonizou a superfície das raízes e tecidos internos, como, por exemplo, os espaços intercelulares do córtex da raiz, e expressou os genes *nif* em raízes e parte aérea de milho, sorgo, trigo e arroz, sugerindo que os tecidos de gramíneas fornecem ambientes adequados para permitir a proliferação bacteriana e a expressão dos genes *nif* de *H. seropedicae*. A expressão desses genes também foi observada em colônias de bactérias localizadas no material mucilaginoso externo da raiz, mostrando que a colonização dos tecidos vegetais não depende da habilidade em fixar nitrogênio, pois um número semelhante de células foi isolado de raízes e caules das plantas inoculadas com linhagens Nif⁺ ou Nif⁻.

Segundo Dodd et al. (2010), melhorar a eficiência do uso dos recursos das principais culturas do mundo é o ponto chave para distribuir um suprimento alimentar seguro à uma população mundial em crescimento e, portanto, uma atenção maior deveria focar em certos gêneros de bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico e que desempenham um papel relativamente importante na aquisição de nutrientes relativamente imóveis, tais como o fósforo.

As RPCV, além de atuarem na fixação biológica do nitrogênio, estão envolvidas em outros importantes processos fisiológicos vegetais, como a produção de hormônios (DODD et al., 2010; MONTAÑEZ et al., 2012; SAHARAN; NEHRA, 2011) e mecanismos de resposta a patógenos (MOREIRA et al., 2010; SAHARAN; NEHRA, 2011; VESSEY, 2003).

O Gênero *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são α -proteobactérias, Gram-negativas e de vida livre, conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal há muitos anos, tendo sido isoladas da rizosfera de gramíneas e cereais em várias regiões do mundo, desde clima tropical até temperado (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

O gênero *Azospirillum* foi reclassificado por Tarrand et al. (1978) e, atualmente, possui 17 espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferens*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *A. rugosum*, *A. picis* e *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. humicireducens* e *A. fermentarium*.

As bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de se associar à várias espécies de plantas. Por exemplo, *A. irakense* ocorre em arroz (KHAMMAS et al., 1989); *A. halopraeferans* ocorre apenas em “Kallar Grass”, uma gramínea nativa do Paquistão (REINHOLD et al., 1987); *A. lipoferum* ocorre preferencialmente no córtex de milho e *A. brasilense* em trigo, arroz (BALDANI, J.; BALDANI, 2005) e milho (ROESCH et al., 2007).

Segundo Bashan et al. (2004), algumas linhagens de *A. lipoferum* e de *A. brasilense* são capazes de colonizar o interior da raízes de trigo, enquanto outras não apresentam essa capacidade, colonizando, principalmente, a zona de alongação e pelos radiculares (BODDEY, R.; DOBEREINER, 1995; DÖBEREINER, J.; BALDANI; BALDANI, 1995; PATRIQUIN; DOBEREINER, 1978). Baldani et al. (1997) denominaram endofíticas facultativas a essas bactérias capazes de infectar e colonizar o interior das plantas e com capacidade de sobreviver no solo.

A fixação de nitrogênio foi a proposta inicial sobre o mecanismo pelo qual o *Azospirillum* promovia o crescimento vegetal. Os trabalhos atuais têm focado no ciclo do nitrogênio dentro da célula, a partir dos genes envolvidos. Segundo Steenhoudt e Vanderleyden (2000), a capacidade do *Azospirillum* em converter nitrogênio atmosférico em amônio, em condições microaeróbicas, sob baixos níveis de nitrogênio, é

decorrente da ação do complexo nitrogenase. Esse complexo é constituído por dois componentes: a proteína dinitrogenase (proteína MoFe, NifDK), a qual contém um cofator ferro-molibdênio e o sítio de redução do N_2 e, a proteína dinitrogenase redutase (proteína Fe, NifH), que transfere elétrons de um doador para a proteína nitrogenase. Esses dois componentes são codificados pelo operon *nifHDK*. Os organismos fixadores de nitrogênio possuem um conjunto mínimo de 16 genes *nif* responsáveis pela codificação das proteínas estruturais da nitrogenase e das proteínas responsáveis pela síntese de fatores metálicos, pela maturação das proteínas Fe e MoFe, transferência de elétrons para a proteína Fe e regulação da expressão dos genes *nif*. Genes do sistema Ntr, responsáveis pela regulação do metabolismo do nitrogênio, atuam na síntese e no controle da atividade da nitrogenase (HUERGO, L. F.; CHANDRA; MERRICK, 2013; KANEKO et al., 2010; LUQUE-ALMAGRO et al., 2011; POSTGATE, 1982) A nitrogenase é, ainda, regulada negativamente a nível transcricional e pós-traducional por íons amônio (NH_4^+) e oxigênio (O_2) (DIXON; KAHN, 2004; HUERGO, L. et al., 2012).

Steenhoudt e Vanderleyden (2000) listam 14 genes bacterianos envolvidos no reconhecimento entre *Azospirillum* e a raiz da planta e mais 16 genes envolvidos na fixação, assimilação e regulação de nitrogênio, entre eles, os genes estruturais de fixação do nitrogênio (genes *nif*) que são altamente conservados entre todas as bactérias em todas as espécies diazotróficas da classe das proteobactéria.

Os genes *nif* codificam para proteínas essenciais nos processos de biossíntese, maturação e montagem do complexo nitrogenase (CHUBATSU et al., 2012). Na maioria dos diazotrófos, a expressão dos genes de fixação do nitrogênio (*nif*) é dependente do ativador transcricional NifA (LI, H. et al., 2011), o qual desempenha um papel-chave na regulação da síntese e atividade da nitrogenase em resposta à amônia e ao oxigênio disponível em *A. brasilense* (ARSÈNE et al., 1994) e é codificado pelo gene *nifA*. Em *Azospirillum*, a atividade de NifA é regulada diretamente por GlnB, uma das proteínas P_{II} (ZOU et al., 2008).

Relatos de genes repórteres ligados a genes *nif* têm sido usados para demonstrar a expressão de *nifA* (ARSÈNE et al., 1994; KATUPITIYA et al., 1995) e *nifH* (BROEK et al., 1993) por *A. brasilense* na superfície de raízes de trigo. Shime-Hatori et al. (2011) utilizaram primers visando diferentes genes-alvo, entre eles, *nifA*, com a finalidade de desenvolver um método simples de isolamento de espécies nativas de *Azospirillum* por PCR convencional. A análise *in silico* revelou que essa sequência apresentou homologia apenas com sequências de *nifA* de *A.*

brasileNSE e *A. lipoferum* disponível no *GenBank*, estando presente como cópia única no genoma de *A. brasileiro* (WISNIEWSKI-DYE et al., 2011). Este fato torna o gene *nifA* um candidato interessante para o desenvolvimento de técnicas moleculares de monitoramento de *A. brasileiro* na rizosfera das plantas.

Há mais de 40 anos, o gênero *Azospirillum* tem sido objeto primário nos estudos sobre associações planta-micro-organismos mutuamente benéficas (KATSY; PRILIPOV, 2009), sendo bem conhecidas suas propriedades como biofertilizantes devido as suas atividades promotoras de crescimento vegetal, tais como a fixação biológica do nitrogênio e a solubilização de fosfatos (LIN; SHEN; YOUNG, 2011).

Experimentos em campo e em casa de vegetação têm mostrado os efeitos benéficos do *Azospirillum* sobre o crescimento das plantas e o rendimento das culturas (KENNEDY et al., 2004; MEHNAZ et al., 2010; MENDONÇA; URQUIAGA; REIS, 2006; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Segundo Okon e Labandera-Gonzales (1994), estudos realizados com várias espécies de plantas, mostraram ser possível atingir um aumento de 5 a 30% no rendimento através da inoculação com *Azospirillum*, principalmente quando utilizada baixa quantidade de fertilizante químico nitrogenado. Holguin et al. (1999) afirmaram que, em casa de vegetação, esse aumento de rendimento pode ser ainda maior.

A utilização de linhagens de *Azospirillum* spp. promoveu aumento significativo na produção de grãos, no conteúdo de nitrogênio, potássio e fósforo total das plantas (BASHAN et al., 2004), na matéria seca da parte aérea e no acúmulo de nitrogênio nas raízes (DOS REIS et al., 2008). Os aumentos na produção e no crescimento a partir da inoculação com *Azospirillum* spp. são atribuídos a um efeito geral no crescimento das raízes, maior capacidade de assimilação de nutrientes e de resistência à seca (BASHAN; HOLGUIN, 1997). Saubidet et al. (2002) concluíram que *A. brasileiro* aumentou o crescimento vegetal por estimular a absorção de nitrogênio pelas raízes.

O uso de linhagens *Azospirillum* como inoculantes tem apresentado bons resultados. Perrig et al. (2007) realizaram experimentos em cultura com duas linhagens de *A. brasileiro*, Cd e Az39, ambas usadas na formulação de inoculantes na Argentina. Os resultados obtidos mostraram que ambas as linhagens promoveram aumentos nos níveis de ácido indol-3-acético (AIA), ácido giberélico (GA₃), ácido abscísico (ABA), zeatina e etileno indicando que *A. brasileiro* é potencialmente

capaz de promover diretamente o crescimento da planta e aumentar o rendimento agrônomico.

Piccinin et al. (2013), utilizaram sementes de trigo inoculadas com as linhagens Ab-V5 e Ab-V6, em formulação líquida ou turfa, com concentração de 10^8 células viáveis por grama (g) ou mililitro (mL), associada a adubação nitrogenada. Os resultados obtidos mostraram que as linhagens Ab-V5 e Ab-V6 são efetivas na fixação biológica parcial de nitrogênio complementada pela adubação nitrogenada, podendo reduzir em 50% a aplicação de fertilizantes, proporcionando resultados positivos no desempenho e no rendimento agrônomico na cultura do trigo. De Souza et al. (2013), obtiveram resultados semelhantes utilizando a linhagem UR51 em conjunto com a adubação nitrogenada para a cultura do arroz, concluindo que esta linhagem poderia ser uma candidata na formulação de bioinoculantes.

Os resultados obtidos por Couillerot et al. (2013) indicaram que a utilização de consórcio de três componentes *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* pode ser útil na estimulação precoce do crescimento do milho.

Além disso, vários trabalhos mostram a influência dessas bactérias na produção de fitormônios como giberelinas (LUCANGELI; BOTTINI, 1997; PICCOLI et al., 1997) e, principalmente, AIA (Ácido Indol-3-acético) (BASHAN; HOLGUIN, 1997; CARRENO-LOPEZ et al., 2000; CASSÁN et al., 2009; IDRIS et al., 2007; RADWAN; MOHAMED; REIS, 2004). *A. brasilense* pode, ainda, promover efeitos positivos sobre os mecanismos de defesa do vegetal, impedindo a ação de patógenos, tais como, *Pratylenchus zaeae*, *Heterodera avenae* e *Atherigona soccata* (BASHAN; DE-BASHAN; SPARKS, 2010). Assim, a produção de fitormônios e os efeitos positivos sobre os mecanismos de defesa da planta estimulados pela bactéria, seriam os responsáveis pela promoção do crescimento vegetal (MOREIRA et al., 2010).

Em experimentos com milho e trigo realizados no sul do Brasil, Hungria et al. (2010) verificaram que um inoculante líquido contendo uma combinação das linhagens Ab-V5 e Ab-V6 provou ser tão efetivo quanto inoculante em turfa carregando as mesmas linhagens para ambas as culturas. Esses resultados mostraram, ainda, que a seleção de linhagens de *Azospirillum* pode resultar em contribuições expressivas para importantes culturas, como é o caso do milho e do trigo. Além disso, poderia contribuir para reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados e as perdas de nitrogênio decorrentes da adubação, ocasionando uma economia de, aproximadamente, US\$ 1,2 bilhões de dólares ao ano.

Entre as diversas linhagens de *Azospirillum brasilense* empregadas como bioinoculantes, a linhagem FP2, uma mutante espontânea da

linhagem Sp7, se destaca pelo fato de possuir genes de resistência aos antibióticos estreptomicina e ácido nalidíxico. Esta característica permite o fácil isolamento dessas bactérias em meio de cultura, sendo amplamente utilizada em experimentos visando o estudo da interação planta-*Azospirillum*.

Milho (*Zea mays* L.)

Pertencente à família das gramíneas (Poaceae) surgiu a partir da domesticação de um teosinto (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) no México há cerca de 9000 anos e sua disseminação e diversificação resultaram em um grande número de genótipos os quais foram divididos em cinco grupos genéticos principais: Northern Flint, European Flint, Tropical, Corn Belt Dent e Popcorn (BOUFFAUD et al., 2012; CAMUS-KULANDAIVELU et al., 2006). O grupo Tropical é o mais amplo e o mais próximo do pool genético ancestral, incluindo o subgrupo Mexicano, bem como os subgrupos Caribenho e Andino que surgiram após a sua disseminação para as ilhas do Caribe e América do Sul, respectivamente (CAMUS-KULANDAIVELU et al., 2006).

É uma planta cultivada em diversas zonas agroecológicas, embora, as principais áreas de cultivo estejam em regiões de clima temperado (FASOLI et al., 2009). É facilmente processado, tem rápida digestão e um menor custo de produção do que outros cereais, sendo encontrado em praticamente todo o mundo.

Há mais de 100 anos, o milho tem sido uma das mais importantes plantas comerciais, sendo utilizada tanto para consumo humano quanto animal e, mais recentemente para a produção de biocombustíveis (FEUILLET; EVERSOLE, 2009), compreendendo cerca de 25% de toda a produção de cereais, além de ser considerado como a espécie modelo que melhor se adapta à pesquisa básica para a compreensão das bases genéticas relacionadas à produtividade e à qualidade em termos de valor nutricional (CANAS et al., 2012). No Brasil, o milho é uma das mais importantes culturas. O rendimento esperado da safra de milho 2012/2013 é de 80 milhões de toneladas, com a área total de plantio devendo alcançar 15,86 milhões de hectares (CONAB, 2013).

Segundo Moreira et al. (2010), os valores calculados para a contribuição da FBN em gramíneas estão em torno 25 a 50 Kg N/ha/ano, o que equivale ao suprimento médio de aproximadamente 17% das demandas das culturas. Embora pareça ser um valor baixo, se considerarmos a importância das espécies produtoras de grãos como principal fonte de carboidratos na alimentação humana e o alto potencial

fotossintético das gramíneas C4 nos trópicos, poderá representar uma grande economia nos custos de produção. Isso é reforçado pelo fato que os atuais sistemas de produção não exploram adequadamente o grande potencial da RPCV, tanto em relação à FBN quanto a outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal.

Análise Proteômica

A proteômica comparativa por eletroforese bidimensional (2-DE) fornece alta resolução de proteínas e permite análise, em profundidade, do mapa protéico, pois as proteínas estão imobilizadas no gel. Esta análise permite detectar proteínas expressas diferencialmente devido a interação com micro-organismos (patógenos ou não) (BRANDÃO; BARBOSA; ARRUDA, 2010).

Além de permitir a separação de misturas complexas de proteínas de acordo com o ponto isoelétrico (pI), a massa molecular (MW), a solubilidade e a abundância relativa, a eletroforese bidimensional oferece um mapa de proteínas intactas, o que reflete alterações no nível de expressão da proteína, isoformas e modificações pós-traducionais (GORG; WEISS; DUNN, 2004).

Estudos de transcriptoma e proteoma têm sido realizados para elucidar mudanças metabólicas e nos mecanismos envolvidos na associação com as RPCV com o milho. Fasoli et al. (2009), através de análise proteômica, detectaram uma alta quantidade de alérgenos presentes no milho, anteriormente não relatados. Nestler, Schutz e Hochholdingner (2011) obtiveram, a partir do perfil protéico e espectrometria de massa, as 2573 proteínas mais abundantes em pelos radiculares de raízes milho linhagem B73. A comparação dessas proteínas com as obtidas em pelos radiculares de soja, em um estudo anterior dos mesmos autores, forneceu novos dados sobre a composição e função dos pelos radiculares e revelou funções conservadas e únicas, tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas.

A análise proteômica comparativa também foi empregada por Wu et al. (2013) para os papéis do ácido salicílico (AS) e ácido abscísico (ABA) na modulação do proteoma em folhas de milho. A classificação das proteínas diferencialmente expressas mostrou que proteínas de respostas para ambos os fitormônios estavam envolvidas principalmente na fotossíntese, estresse e resposta de defesa, energia e metabolismo e ao *turnover* protéico.

Diversos estudos envolvendo a análise proteômica comparativa têm sido realizados com várias espécies vegetais. Em estudo visando

avaliar as mudanças nos padrões de proteínas em raízes e folhas de plantas de milho em resposta à disponibilidade de nitrato, Prinsi et al. (2009) identificaram 15 e 14 *spots* diferencialmente expressos em raízes e folhas, respectivamente. Nas raízes, a maioria das proteínas identificadas estavam envolvidas com a assimilação do nitrato e em vias metabólicas implicadas no balanço de energia e status redox da célula, entre as quais, a via das pentose-fosfato. Já, nas folhas, a maioria das proteínas caracterizadas estavam relacionadas à regulação da fotossíntese.

Irar et al. (2010) empregaram a análise proteômica comparativa associada à cromatografia líquida para identificar proteínas acumuladas em embriões maduros de dois genótipos de trigo duro, um tolerante e outro sensível à desidratação. Essas proteínas poderiam ser usadas como potenciais marcadores para tolerância à desidratação. No total, 12 *spots* foram identificados por MALDI-TOF-TOF e por cromatografia líquida, sendo que, cinco tiveram a expressão aumentada na variedade tolerante e, sete, apresentaram aumento de expressão na variedade sensível.

Já, Galván et al. (2011) estudaram a variabilidade genética de azinheira em três espécies dominantes na floresta Mediterrânea, através da análise proteômica de sementes obtidas de seus frutos secos (bolotas). Os dados obtidos permitiram agrupar as populações, com os grupos sendo correlacionados de acordo com a localização geográfica e condições climáticas, bem como a discriminação dos grupos méxico e xéricos.

A análise proteômica comparativa também é amplamente utilizada em estudos envolvendo a interação planta-bactéria. Afroz et al. (2013) destacaram as proteínas envolvidas na resposta do sistema imune primário das plantas ao ataque micro-organismos patógenos e afirmaram que uma comparação global detalhada das vias de resposta utilizando a proteômica tem permitido a identificação de novas proteínas, cuja função biológica leva a elucidação de mecanismos bioquímicos e celulares.

O perfil proteômico raízes de milho controle e inoculadas com *A. brasilense* FP2 foi analisado por Cangahuala-Inocente et al. (2013) e foram identificadas seis proteínas diferencialmente expressas, sendo duas exclusivamente expressas, duas com expressão aumentada e duas com expressão diminuída em raízes inoculadas com *A. brasilense* FP2.

Portanto, o estudo da interação planta-bactéria através da análise proteômica tem contribuído significativamente na direção à uma profunda compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento dessas associações (KNIEF; DELMOTTE; VORHOLT, 2011), podendo ser empregado para determinar os efeitos que os micro-organismos têm sobre as raízes, a fim de identificar genes e proteínas que são induzidas especificamente pelos micro-organismos; as

relações patogênicas entre raízes e organismos patogênicos e a comunicação molecular entre eles (MATHESIUS, 2009). Esses estudos estão no começo, mas possuem um grande potencial no que se refere a elucidar, não apenas as interações entre bactérias e suas plantas hospedeiras, mas também interações bactéria-bactéria entre diferentes táxons vivendo em associação com plantas.

CAPÍTULO 1

Detecção por PCR em tempo real visando o gene *nifA* da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 em raízes de milho

FALEIRO, A. C.; PEREIRA, T. P.; ESPÍNDULA, E.; BROD, F. C. A.; ARISI, A. C. M. Real time PCR detection targeting *nifA* gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125-133, Nov 01 2013.

RESUMO

A rizobactéria promotora de crescimento vegetal (RPCV) *Azospirillum brasilense* tem sido recomendada para o uso em inoculantes comerciais no Brasil. Métodos eficazes são necessários para monitorar cepas de RPCV no rizoplano, na rizosfera e na planta. Nosso objetivo foi desenvolver um método de PCR em tempo real para detecção de *A. brasilense*, em plântulas de milho visando o gene *nifA*. A análise *in silico* mostrou que esta sequência possui homologia apenas em *A. brasilense* e *A. lipoferum*, estando presente como uma única cópia no genoma de *A. brasilense*. Os pares de iniciadores foram desenhados e a sua especificidade foi verificada utilizando DNA de 12 espécies diferentes de bactérias. Plântulas de milho inoculadas foram cultivadas *in vitro* ou em vasos e o número de cópias de DNA bacteriano por grama de raiz foi quantificado 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação. Curvas padrão foram preparadas para a quantificação do DNA usando diluição em série de extratos de DNA de *A. brasilense*. A eficiência média de PCR e o coeficiente de correlação da curva padrão apresentaram valores dentro do intervalo aceitável para qPCR, a eficiência da PCR foi de 95% e o coeficiente de correlação foi de 0,98, indicando que o gene *nifA* era adequado para a análise quantitativa do genoma alvo bacteriano. Os iniciadores desenvolvidos visando *nifA* serão úteis para monitorar *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 em culturas e na certificação da qualidade de inoculantes.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, interação planta-bactéria, milho, qPCR, inoculante

INTRODUÇÃO

A rizobactéria promotora de crescimento vegetal (RPCV) *Azospirillum brasilense* tem sido conhecida por um longo tempo por exercer uma influência benéfica sobre plantas inoculadas (BALDANI, J.; BALDANI, 2005), como o milho e o trigo, por isso, tem sido recomendada para o uso em inoculantes comerciais no Brasil (HUNGRIA, M. et al., 2010). *Azospirillum brasilense* é uma diazotrófica usada como um organismo modelo em estudos de promoção associativa de crescimento vegetal (OKON, Y; HEYTLER; HARDY, 1983; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000), sendo o seu genoma publicado recentemente (WISNIEWSKI-DYE et al., 2011). O exato mecanismo de promoção de crescimento das plantas não é totalmente compreendido, mas este efeito tem sido atribuído principalmente à produção de fitormônios e à fixação biológica de nitrogênio, entre outros mecanismos (BASHAN et al., 2004).

Uma das principais características das espécies de *Azospirillum* é que são capazes de fixar o nitrogênio, converter N_2 para amônia, por meio do complexo nitrogenase. Os principais genes implicados neste processo são conhecidos como genes *nif* e são altamente conservados entre proteobactérias fixadoras de nitrogênio (RAYMOND et al., 2004; SANT'ANNA et al., 2011). A fixação biológica de nitrogênio é catalisada por um complexo sistema de metaloenzimas, o complexo da nitrogenase. Em *A. brasilense*, a fixação de nitrogênio ocorre sob limitação de nitrogênio em condições de crescimento microaeróbicas. A expressão do gene regulador *nifA* é regulada positivamente em resposta à privação de nitrogênio e a ativação de outros genes *nif* pela proteína NifA é inibida na presença de oxigênio ou de baixos níveis de nitrogênio (FADEL-PICHETH et al., 1999; SPEROTTO et al., 2004).

É importante monitorar o estabelecimento de uma linhagem de RPCV na rizosfera da planta (EL ZEMRANY et al., 2006), especialmente logo após a germinação. Técnicas são necessárias para um controle eficaz do número de células inoculantes na rizosfera. No entanto, poucas ferramentas estão disponíveis para avaliar o destino de linhagens de *Azospirillum* após a inoculação (COUILLEROT, O. et al., 2010). A identificação da presença de bactérias *Azospirillum* nos tecidos das plantas e na rizosfera ainda depende muito de métodos convencionais laboriosos que envolvem o uso repetido de meios seletivos e ensaios fisiológicos (SHIME-HATTORI et al., 2011; VIDEIRA et al., 2012). Em contraste com os métodos convencionais, amostras de campo podem ser testadas diretamente por PCR sem a necessidade de isolar e cultivar as

linhagens (RAJ et al., 2012). Recentemente métodos moleculares têm sido empregados para a identificação de *Azospirillum*, por exemplo, a análise por PCR BOX tem sido aplicada com sucesso para determinar a diversidade genética de isolados de *Azospirillum* em capim-elefante (VIDEIRA et al., 2012). Um método de PCR gênero-específico foi desenvolvido para a detecção e identificação de isolados de *Azospirillum*, tendo como alvo a sequência do gene regulador *nifA*. PCR convencional utilizando par de iniciadores AznifA-A foi positiva para *A. brasilense* (SHIME-HATTORI et al., 2011). Esta sequência pode ser uma boa candidata para um método de quantificação de *A. brasilense* nas raízes da planta por PCR em tempo real.

Métodos de PCR em tempo real foram desenvolvidos para quantificar RPCV usadas como inoculantes na Europa, *A. lipoferum* linhagem CRT1 (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010) e *A. brasilense* linhagens UAP-154 e CFN-535 (COUILLEROT, O. et al., 2010). Para a quantificação de *A. brasilense* linhagens UAP-154 e CFN-535, os iniciadores foram desenhados a partir de um marcador SCAR BOX, a fim de desenvolver um par de iniciadores específicos para cada linhagem (COUILLEROT, O. et al., 2010). Para *A. lipoferum* linhagem CRT1, iniciadores foram desenhados a partir de uma PCR-RFLP linhagem-específica (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método de PCR em tempo real com a finalidade de avaliar, de quantificar e de monitorar a presença de *A. brasilense* em plântulas de duas cultivares de milho, visando um gene codificante, *nifA*.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens bacterianas

Azospirillum brasilense linhagem FP2 (estirpe SP7 ATCC 29145 Nal^R Sm^R) (PEDROSA; YATES, 1984) foi cultivada num agitador orbital (120 rpm) a 30 °C em 30 mL de meio NFbHPN suplementado com 5 mg/L de lactato de sódio até DO₆₀₀ de 0,8 (~10⁸ células/mL). A correlação foi obtida entre a densidade óptica e o número de colônias por plaqueamento de culturas de células por diluição seriada em placas de ágar NFbHPN. *Herbaspirillum seropedicae* linhagem SmR1 (estirpe Z78 Sm^R ATCC 35893) e outras linhagens de *Herbaspirillum* utilizadas no presente trabalho foram cultivadas em agitador orbital (120 rpm) a 30 °C em 30 mL de meio NFbHPN suplementado com 5 mg/L de ácido málico (KLASSEN et al., 1997). *Rhizobium* (DE SOUZA et al., 2013),

Microbacterium e *Pseudomonas* foram cultivadas em meio LB a 28 °C. *E. coli* (ATCC 25922) foi cultivada em caldo de BHI, enquanto *B. subtilis* (ATCC 6051) e *B. cereus* (ATCC 14579) foram cultivadas em caldo nutriente, a 37 °C.

Germinação, inoculação e crescimento de mudas

Sementes de milho (variedades Pioneer 30F53 e Dekalb240) foram desinfetadas através de três lavagem com água ultrapura esterilizada, seguidas por 70% de etanol durante 3 minutos e por hipoclorito de sódio a 2% e 2,5% de Tween 20, durante 30 min. As sementes foram então lavadas por três vezes com água ultrapura esterilizada por agitação suave, transferidas para placas contendo ágar-água 0,8% (experimentos *in vitro*) ou para papel saturado em água (experimento em potes) e mantidas durante 3 dias em câmara de crescimento a uma temperatura de 25 °C, no escuro, durante a germinação.

Para o experimento *in vitro*, após a diluição da suspensão bacteriana, trinta plântulas foram incubadas em 30 mL de meio líquido e $\sim 10^5$ células bacterianas.mL⁻¹ de *A. brasilense* linhagem FP2 em meio NFb lactato sem fonte de nitrogênio e fósforo num agitador orbital (80 rpm) durante 30 min a 30 °C (RONCATO-MACCARI et al., 2003). As plântulas controle foram submetidas as mesmas condições, porém, sem a presença da bactéria. Após a incubação, as sementes germinadas foram lavadas em uma solução salina de 0,9% durante 1 min e colocadas em tubos de vidro contendo meio líquido para plantas (EGENER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 1999). As mudas de cada tratamento foram cultivadas lado a lado, em uma câmara de ambiente controlado durante 10 dias (16 h de fotoperíodo, a 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 25 °C luz/23 °C escuro e 40 % de umidade).

Para o experimento em potes, as sementes germinadas foram transferidas para potes contendo areia esterilizada e meio líquido para planta (EGENER et al., 1999) sem nitrogênio, 1 mL de $\sim 10^8$ células bacterianas.mL⁻¹ de *A. brasilense* linhagem FP2 foi adicionado a cada semente. Sementes controle foram submetidas às mesmas condições, porém, sem a presença da bactéria. As mudas de cada tratamento foram cultivadas lado a lado durante 10 dias numa câmara de ambiente controlado, ajustado para 16 h de fotoperíodo, radiação fotossinteticamente ativa de 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a temperatura de 25 °C, regadas diariamente.

Três experimentos independentes foram realizados em diferentes meses. Plântulas de milho foram coletadas aleatoriamente 1, 4, 7 e 10 dias

após a inoculação (DAI). O material foi imediatamente utilizado para o ensaio de colonização das raízes ou congelado em nitrogênio líquido e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a extração de DNA.

Ensaio de colonização das raízes

Para determinar a colonização bacteriana da raiz, três plântulas *in vitro* foram coletadas aleatoriamente 1, 4, 7 e 10 DAI. As raízes foram desinfetadas com etanol a 70% durante 2 minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 1% durante 2 minutos e lavadas três vezes em água destilada. O material da raiz de cada plântula foi pesado e macerado com um pistilo e almofariz esterilizados em solução salina estéril (NaCl 0,9%) na proporção 1:10. Os extratos foram diluídos dez vezes seriadamente e plaqueados em meio NFb lactato contendo $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ de ácido nalidíxico para determinar as unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de raiz fresca após 2 dias de incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BALSANELLI et al., 2010).

Protocolos de extração de DNA

O DNA genômico foi extraído e purificado a partir de raízes ou partes aéreas de milho congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante com algumas modificações. As amostras foram incubadas durante 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ com um tampão CTAB (20 g/L de CTAB, $1,4\text{ mol L}^{-1}$ NaCl, $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de tampão Tris, 20 nmol L^{-1} de Na_2EDTA , pH 8,0) em vez da incubação com o tampão AP1 fornecido no kit. Também foram adicionados $20\text{ }\mu\text{L}$ de proteinase K (20 mg/mL) a cada amostra e as amostras foram incubadas durante 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DINON et al., 2012). O DNA foi extraído a partir de culturas bacterianas de *A. brasilense* linhagem FP2 e outras espécies, em 10^8 células/mL, após o choque térmico. As alíquotas de culturas (2 mL), foram centrifugadas (6000 x g , 3 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), os pellets foram estocados à temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à extração do DNA. Os pellets foram suspensos em $100\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura e retornados para $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min e imediatamente aquecidos a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Após o resfriamento da suspensão de células à temperatura ambiente e centrifugação (13.000 x g , 10 s), o DNA foi purificado utilizando o kit de purificação Wizard® Genomic DNA (Promega™, Madison, WI, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração de DNA foi determinada num espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 (Wilmington, DE, EUA), com medições a 260 e 280 nm.

Desenho dos Iniciadores

Para a detecção *Azospirillum*-específica por PCR em tempo real, iniciadores AznifAF12 (5' CGCAGCAACTGATATGCAAAA 3') e AznifAF19 (5' GCGTGCTTCCGTGACAAGT 3') foram desenhados visando a sequência *nifA*, acesso *GenBank* n.º AY677086.1 (FADEL-PICHETH et al., 1999) de *A. brasilense* usando Primer Express 1.0 (Applied Biosystems). O fragmento resultante de 96 pb está dentro do fragmento amplificado AznifA-A de 439 pb, produto de amplificação quando utilizado o par de iniciadores AznifA-A desenhado para detecção de DNA *Azospirillum*-específico (SHIME-HATTORI et al., 2011).

Detecção por PCR

O par de iniciadores AznifA-A, que amplifica um fragmento de 439 pb desenhado para detecção de DNA *Azospirillum*-específico (SHIME-HATTORI et al., 2011), foi utilizado para a detecção do DNA bacteriano em raízes ou em parte aérea de milho. O par de iniciadores ZEO, que amplificam um fragmento de 329 pb do gene da zeína específica de milho (DINON; BOSCO; ARISI, 2010), foi utilizado para detectar DNA de milho. As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de 2X PCR Master Mix (Promega™, Madison, WI, EUA), 50 ng de DNA molde e 20 nmol L⁻¹ de cada um dos iniciadores AznifA-A ou 500 nmol L⁻¹ de cada iniciador ZEO. As amplificações foram efetuadas num Minicycler™ (MJ Research Inc. Watertown, MA, EUA), com os seguintes programas. Para iniciadores ZEO: desnaturação a 95 °C durante 3 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 1 min, 60 °C durante 1 min e 72 °C durante 1 min e extensão final a 72 °C durante 7 minutos. Para iniciadores AznifA-A: desnaturação a 94 °C durante 3 min, seguido por 45 ciclos de 94 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s e 72 °C durante 1 min e extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2%. Todos os iniciadores de PCR foram sintetizados por IDT (Coralville, Iowa, EUA).

Quantificação por PCR em tempo real

A PCR quantitativa em tempo real foi realizada em ABI Prism 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems),

600 nmol L⁻¹ de cada iniciador, água e DNA molde. O protocolo de amplificação consistia de: incubação inicial a 50 °C durante 2 min, 95 °C de incubação durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 minuto. Todos os experimentos de PCR em tempo real foram analisados usando as configurações automáticas para cada experimento. Todas amostras foram analisadas em triplicata por qPCR a uma concentração final de 50 ng de DNA por reação (DNA extraído de amostras de plantas) ou 6 ng DNA por reação (DNA extraído de amostras de cultura bacteriana pura). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$), usando o pacote *Agricolae* no software R v2.15.3 (R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>).

A construção das curvas padrão

O DNA genômico isolado a partir da cultura bacteriana (30 ng) foi diluído 10 vezes seriadamente em água a concentrações finais equivalentes $10^{6,5}$ - $10^{1,5}$ cópias de DNA por reação. Os números de cópias foram calculados utilizando o valor 1C de 7,530,241 pb para o genoma de *Azospirillum brasilense* Sp245 (PRJEA162161), a constante de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$) e a massa molecular do DNA (660 Da/pb), assim $10^{6,5}$ cópias de DNA de *A. brasilense* corresponde a 30 ng de DNA molde. A curva de diluição seriada de DNA bacteriano foi também preparada na presença de DNA de raízes de milho (30 ng por reação), isolado a partir de plântulas controle. O DNA genômico isolado a partir das raízes de milho inoculado foi também diluído 10 vezes seriadamente em água a concentrações finais equivalentes $10^{6,5}$ - $10^{1,5}$ cópias de DNA de DNA bacteriano por reação. Uma curva padrão para cada diluição em série de DNA foi gerada através da representação gráfica do valor de ciclo limiar (Ct) versus o logaritmo do número de cópias de DNA bacteriano. As eficiências de amplificação foram determinadas usando a equação $E = 10^{(1/s)-1}$, onde E é a Eficiência calculada e s é o coeficiente angular obtido a partir da curva padrão.

RESULTADOS

Colonização de milho após a inoculação com *Azospirillum brasilense*

Para ambas as variedades, o ensaio de colonização radicular mostrou que cerca de 10^4 UFC/g estava presente nas raízes inoculadas 4, 7 e 10 DAI (Tabela 1.1). A presença de bactérias 1 DAI não foi detectada

em raízes da variedade P30F53, enquanto $10^{3,7}$ UFC/g foram contadas na variedade DKB240 (Tabela 1.1). A presença de *A. brasilense* não foi detectada em raízes controle. A fim de confirmar a contagem em placa, *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 foi cultivada até DO_{600} de 0,8, e a contagem média foi de $6,2 \times 10^7$ UFC/mL (Tabela S1.1).

Tabela 1.1 - Número de bactérias (\log_{10} UFC/g de raiz fresca), de plântulas milho (variedades DKB240 e P30F53) cultivadas *in vitro* após a inoculação com *Azospirillum brasilense* linhagem FP2. As raízes foram coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI).

DAI	DKB240 (\log_{10} UFC/g)	P30F53 (\log_{10} UFC/g)
1	3,68	n.d.
4	4,09	4,40
7	4,25	4,36
10	4,58	4,35

n.d. não detectado

PCR convencional

O DNA total foi isolado a partir de raízes de plântulas controle e inoculadas crescidas *in vitro* para monitorar *A. brasilense*. Um resumo da detecção por PCR de *Azospirillum brasilense*, em plântulas de milho cultivadas *in vitro* está apresentado na Tabela S1.2. A PCR utilizando iniciadores AznifA-A (SHIME-HATTORI et al., 2011) detectou o fragmento esperado de 439 pb em todas as raízes inoculadas 7 e 10 DAI, e foi detectado em duas das três amostras de raízes inoculadas 4 DAI para ambas as variedades de milho e em uma das três amostras de raízes inoculadas 1 DAI para a variedade DKB240, mas não foi detectado em todas as amostras inoculadas 1 DAI para a variedade P30F53. Como esperado, não foi detectado em todas as raízes de plântulas controles.

Plântulas de milho (Pioneer 30F53) foram inoculadas com 10^8 células/semente de *Azospirillum brasilense* linhagem FP2, cultivadas em potes e coletadas 1, 4, 7 e 10 DAI. O DNA total foi isolado de raízes e parte aérea controles e inoculadas para monitorar *A. brasilense*. A PCR utilizando iniciadores AznifA-A detectou o fragmento esperado em todas as raízes inoculadas 4, 7 e 10 DAI, enquanto não foi detectado em todas as raízes controle e foi detectado em uma de três amostras de raízes inoculadas 1 DAI (dados não apresentados). A amplificabilidade do DNA de todas as amostras foi verificada por PCR, usando iniciadores ZEO,

específicos para a detecção de DNA do milho. A PCR utilizando iniciadores ZEO detectou o fragmento amplificado esperado de 329 pb em todas as amostras de raízes, ao mesmo tempo em que não foi detectado no DNA bacteriano (dados não apresentados), tal como esperado. O fragmento amplificado AznifA-A não foi detectado em todas as amostras de parte aérea, plântulas controle e inoculadas, enquanto o fragmento amplificado ZEO foi detectado em todas as amostras de parte aérea (dados não apresentados).

Otimização da quantificação do DNA bacteriano por PCR em tempo real

O par de iniciadores AznifAF12/AznifAF19 para quantificação de *Azospirillum* visando uma sequência que está localizada dentro do fragmento amplificado com iniciadores AznifA-A foi desenhado e usado para detecção por PCR *Azospirillum*-específica (SHIME-HATTORI et al., 2011). A análise *in silico* mostrou que essa sequência apresentou homologia apenas com sequências *nifA* de *A. brasilense* e *A. lipoferum* disponível no *GenBank*, estando presente como uma única cópia no genoma de *A. brasilense* 245 (WISNIEWSKI-DYE et al., 2011).

O DNA total foi isolado a partir de raízes controle e inoculadas de ambas variedades, da RPCV *A. brasilense* e outras espécies. As concentrações de DNA de raízes de milho estavam na faixa de 30-220 ng/ μ L e a razão DO_{260nm}/DO_{280nm} era de cerca de 1,8.

O fragmento amplificado esperado apresentou um T_m calculado de 82 °C e um T_m observado de 81,25 °C para um Ct de valor 15,51 usando 6 ng de DNA molde. Amostras de DNA (6 ng) de cinco espécies testadas (*H. seropedicae*, *H. hiltneri*, *H. rubrisubalbicans*, *Microbacterium* sp. e *Pseudomonas* sp.) não apresentaram amplificação, sete espécies (*H. huttiense*, *H. lusitanum*, *H. frisingense*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *E.coli* e *Rhizobium* sp.) apresentaram amplificações não específicas com diferentes T_m em valores de Ct tardio (superior a 32) e uma amostra de DNA de *Burkholderia tropica* apresentou amplificação em valor de Ct tardio e T_m semelhante (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 - Valores de Ct e Tm gerados pelo ensaio de especificidade por qPCR utilizando iniciadores AznifAF12/AznifAF19 e DNA extraído a partir de *Azospirillum brasilense* ou outras bactérias como DNA molde.

DNA Molde ^a	Ct Médio	Tm1	Tm2	Tm3
<i>A. brasilense</i> FP2	15,51	81,25	-	-
<i>H. seropedicae</i>	-	-	-	-
<i>H. hiltneri</i>	-	-	-	-
<i>H. huttiense</i>	38,04	72,56	62,27	-
<i>H. lusitanum</i>	36,66	75,96	62,27	-
<i>H. rubrisubalbicans</i>	-	-	-	-
<i>H. frisingense</i>	34,37	72,93	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	34,18	74,40	81,57	65,76
<i>Bacillus subtilis</i>	38,73	62,27	-	-
<i>E.coli</i>	37,65	79,00	62,27	-
<i>Rhizobium</i> sp.	32,68	81,75	63,19	-
<i>Microbacterium</i> sp.	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-
<i>Burkholderia tropica</i>	33,19	81,29	66,13	-

^a As amostras foram analisadas para a concentração final de 6 ng DNA por reação para todas as amostras (n=2).

(-) significa Ct ou Tm não detectado

A avaliação do ensaio de PCR em tempo real foi baseada nas curvas-padrão estabelecidas por diluição em série de DNA bacteriano isolado a partir de três culturas puras independentes de *A. brasilense*. A eficiência de amplificação e robustez da qPCR foi estimada por uma diluição seriada $10^{6.5}$ - $10^{1.5}$ cópias do genoma de *A. brasilense* diluídos em água (Figura 1.1A). Os parâmetros da reação (eficiência, coeficiente angular e coeficiente de correlação) foram determinados por sete curvas padrão e são apresentadas na Tabela 1.3. A eficiência média foi de 95% e o coeficiente de correlação foi de 0,98 após uma análise de regressão entre o log da quantidade de DNA e os valores de Ct em um intervalo de seis ordens de magnitude. Os coeficientes de variação (CV) dos valores de Ct foram calculados a partir de sete corridas de PCR em tempo real e está abaixo de 15% (Tabela 1.4). A relação Ct versus log UFC de culturas puras de *A. brasilense* foi estimado (Figura 1.1B).

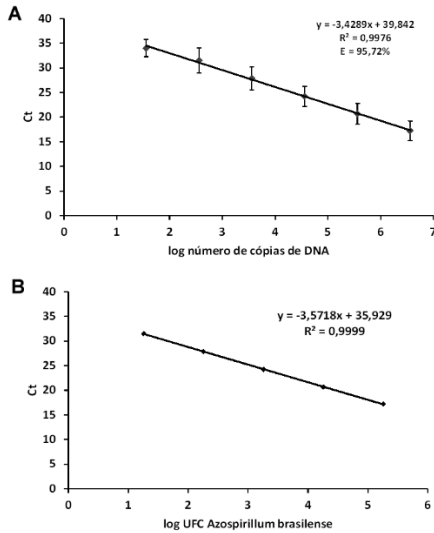


Figura 1.1 - Curva padrão gerada qPCR utilizando três extrações de DNA a partir de *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 como DNA molde. (A) Ct versus log do número de cópias de DNA. Média Ct \pm DP (n = 14). (B) Ct versus log UFC (n = 3).

Tabela 1.3 - Parâmetros das curvas padrão de qPCR para a quantificação de *Azospirillum brasilense* usando diluição seriada de DNA bacteriano.

Experimento qPCR	Amostra de DNA	Eficiência (%)	Coefficiente Angular	R^2
1	A	90	-3,57	0,99
1	B	98	-3,38	0,98
1	C	90	-3,60	0,99
2	B	90	-3,59	0,99
3	A	99	-3,34	0,99
4	B	98	-3,38	0,96
5	A	100	-3,32	0,99
Média		95	-3,45	0,98
DP		4,73	0,13	0,01

Tabela 1.4 - Comparação dos valores de Ct para ensaios de qPCR de *Azospirillum brasilense* para 6 diluições seriadas de DNA bacteriano.

Número de Cópias	Ct							Média		
	1A	1B	1C	2B	3A	4B	5A	Ct	DP	CV
10 ^{6,5}	17,80	18,40	18,06	13,30	14,67	20,97	17,37	17,22	2,53	14,70
10 ^{5,5}	20,92	21,65	21,34	17,28	18,08	24,84	20,69	20,69	2,49	12,00
10 ^{4,5}	24,74	25,08	24,95	21,21	21,50	28,05	24,16	24,24	2,33	9,60
10 ^{3,5}	28,75	28,83	28,44	24,60	24,86	32,29	27,27	27,86	2,63	9,50
10 ^{2,5}	31,85	33,07	31,73	27,74	28,30	36,23	31,55	31,50	2,87	9,10
10 ^{1,5}	35,47	34,49	36,34	31,49	31,26	35,60	33,47	34,02	2,02	5,90

Eficiências de amplificação, também foram estimadas por diluição seriada do DNA isolado a partir das raízes de milho inoculado (variando 104-118%) e por diluição seriada do DNA bacteriano, na presença de DNA (quantidade fixa de 30 ng) isolado a partir das raízes controle de milho (120%) (Tabela 1.5). Na presença de DNA de milho, foi possível detectar $10^{1,5}$ cópias de DNA bacteriano por reação de PCR. Usando apenas o DNA de milho como molde, não há nenhuma amplificação como esperado.

Tabela 1.5 - Parâmetros das curvas padrão de qPCR para a quantificação de *Azospirillum brasilense* usando diluição seriada de DNA de raízes de milho inoculadas ou diluição seriada de DNA bacteriano na presença de DNA *background* de raízes controle de milho.

Amostras de DNA	Eficiência (%)	Coefficiente Angular	R^2
DNA de raízes de milho inoculadas			
D1	106	-3,20	0,99
E1	117	-2,97	0,99
F1	118	-2,95	0,97
F2	104	-3,24	0,99
DNA bacteriano e DNA de raízes controle de milho			
G	120	-2,92	0,99

Quantificação do DNA bacteriano em raízes de milho por PCR em tempo real

Usando o DNA isolado a partir de raízes de milho inoculadas com *A. brasilense* e cultivadas *in vitro*, a quantificação do DNA foi realizada com base na equação da curva padrão (Figura 1.1A). Em relação à amplificação das amostras de DNA isoladas a partir de raízes inoculadas de plântulas de milho cultivadas *in vitro*, os valores de Ct foram de 31 (1 DAI) a 16 (10 DAI), enquanto que nenhuma amplificação ou valores tardios Ct (superior a 35) foram observados para as amostras de DNA isoladas a partir de raízes controle. O número de cópias de DNA bacteriano por grama de massa fresca de raiz aumentou de $3,3 \times 10^6$ (1 DAI) para $5,3 \times 10^9$ (10 DAI) quando raízes inoculadas de milho da variedade DKB240 foram analisadas (Figura 1.2A) e, da mesma maneira, variando de $6,0 \times 10^6$ (1 DAI) para $6,8 \times 10^9$ (10 DAI) na variedade P30F53 (Figura 1.2B).

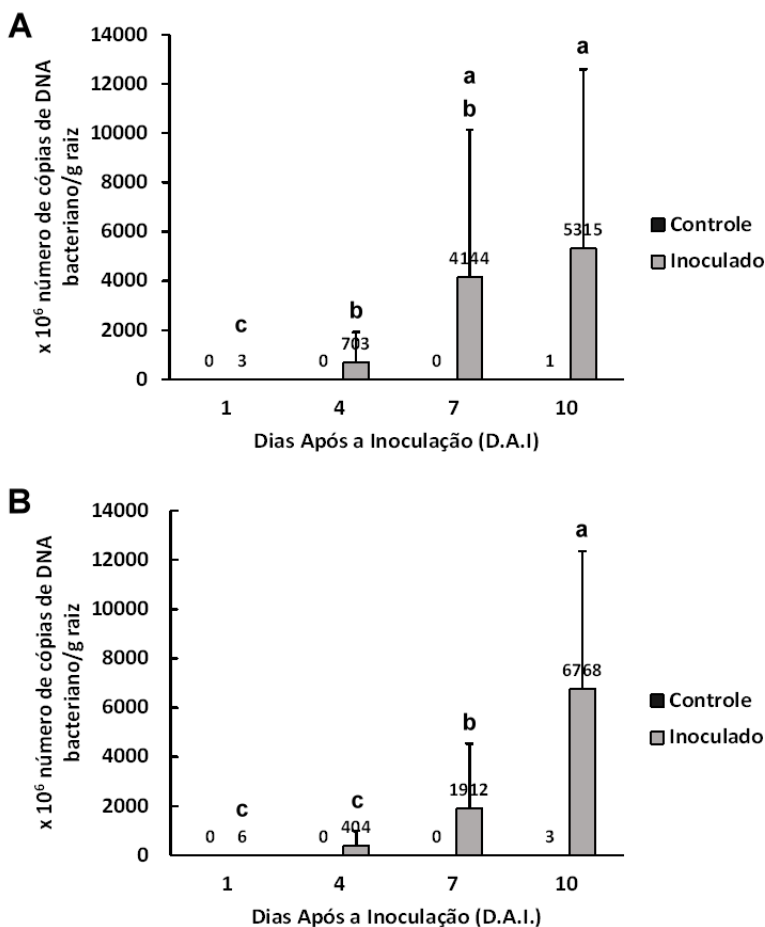


Figura 1.2 – Número de cópias de DNA bacteriano em plantas de milho cultivadas *in vitro* após a inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe FP2. (A) a variedade DKB240 e (B) P30F53 variedade. As amostras inoculadas foram coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação. Os dados são apresentados como médias \pm DP (n=9). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de amostragem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Em relação à amplificação das amostras de DNA isoladas a partir de raízes de plântulas inoculadas cultivadas em potes, os valores de Ct foram de 26 (1 DAI) para 19 (7 DAI) e os valores de Ct tardios foram observados para as amostras de DNA isoladas a partir de raízes controle.

O número de cópias de DNA bacteriano por grama de massa fresca de raiz foi de $1,4 \times 10^8$, $1,9 \times 10^8$, $5,2 \times 10^8$ e $6,2 \times 10^7$ em plântulas de milho inoculadas da variedade P30F53 cultivadas em potes 1, 4, 7 e 10 DAI, respectivamente (Figura 1.3).

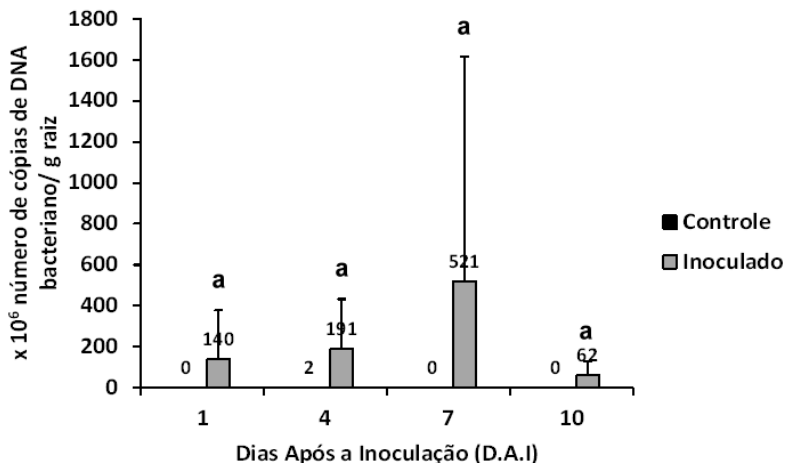


Figura 1.3 – Número de cópias de DNA bacteriano em plântulas de milho (variedade P30F53) cultivado em potes após a inoculação com *Azospirillum brasilense* linhagem FP2. Amostras inoculadas coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI). Os dados são apresentados como médias \pm DP (n=9). Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre os tempos de amostragem pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$). (ESPÍNDULA, 2013)

DISCUSSÃO

Azospirillum tem sido amplamente utilizado como inoculante de sementes para fitoestimulação de cereais, incluindo o milho (DOBBELAERE, S et al., 2001; DOBBELAERE, S et al., 2003; HUNGRIA, M. et al., 2010). As raízes são o principal local de interação entre plantas e micro-organismos, desempenhando um papel importante neste processo (MERCADO-BLANCO; PRIETO, 2012).

Quando avaliou-se a colonização bacteriana das raízes do milho por contagem em placas, o número de bactérias por grama de raiz (massa fresca) era de cerca de 10^4 UFC/g, 4, 7 e 10 DAI (Tabela 1.2). A colonização das raízes de milho pela RPCV *H. seropedicae* linhagem SmR1 foi analisada nos mesmos tempos de coleta, quando as plântulas

foram cultivadas *in vitro* e a contagem de bactérias por grama de raiz foi de 10^6 - 10^7 nos mesmos tempos de coleta (BALSANELLI et al., 2010).

A fim de detectar a presença de *A. brasilense* nas raízes inoculadas e para testar a sua ausência em raízes controle, foi utilizado um método de detecção por PCR visando o gene *nifA* (SHIME-HATTORI et al., 2011). Foi confirmado que os iniciadores AznifA-A podem ser usados para monitorar a presença *A. brasilense* em raízes para as duas variedades testadas (Figura S1.1 e S1.2).

Métodos eficazes são necessários a fim de monitorar linhagens de RPCV na rizosfera. Os recentes avanços em métodos moleculares têm facilitado a quantificação dos simbiontes alvo em plantas (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010; COUILLEROT, O. et al., 2010). Neste trabalho, foi desenvolvido um método de PCR em tempo real para a quantificação de *Azospirillum brasilense* visando gene *nifA*. Um gene codificante fisiologicamente relevante para esta qPCR foi escolhido para alvo e poderia ser utilizado para monitorizar outras linhagens de *A. brasilense* capazes de fixar o nitrogênio e contendo a mesma sequência alvo.

No genoma *A. brasilense*, há uma cópia do gene *nifA*, assim é possível estimar o número de cópias do genoma de *A. brasilense* usando este alvo. *Azospirillum* possui o maior número de cromídeos entre todos os genomas procarióticos sequenciados até o momento e tem a maior proporção de seu genoma em replicons não-cromossômicos, 59,8% para *A. brasilense* Sp245 (WISNIEWSKI-DYE et al., 2011). Replicons diferentes podem ter diferentes números de cópias em uma célula, por isso a relação linear entre o número de cromossomos e o número de células não é necessariamente verdadeira (Figura 1.1).

A especificidade dos iniciadores AznifAF12/AznifAF19 foi avaliada utilizando 13 espécies (Tabela 1.2). Uma espécie testada (*Burkholderia tropica*) apresentou um fragmento amplificado com Tm semelhante a *A. brasilense*, embora ΔCt ($Ct B. tropica - Ct. A. brasilense$) foi de 17,7. Isto significa que o Ct observado com 6 ng de *Burkholderia tropica* correspondeu ao Ct observado usando 6×10^{-5} ng de *A. brasilense* (Tabela 1.4).

Curvas padrão foram preparadas para a quantificação do genoma utilizando diluição seriada de uma solução de DNA de *A. brasilense*. Três preparações independentes de DNA bacteriano foram utilizadas em experimentos de qPCR, a fim de produzir curvas de calibração absoluta. Tais experimentos objetivaram avaliar o comportamento analítico geral deste método de qPCR determinando eficiência de PCR (*E*) e coeficiente

de correlação (R^2), bem como o coeficiente de variação (CV), que indica a repetibilidade das medições. A eficiência de PCR e o coeficiente de correlação apresentaram valores dentro do intervalo aceitável para qPCR (Tabela 1.3), os valores de eficiência da PCR foram entre 90% e 100%, com valor de E médio de 95%, e valor de R^2 de 0,99 para 5 curvas, 0,98 e 0,96 para as outras duas curvas. De acordo com a definição de requisitos mínimos de desempenho para qPCR, o R^2 deve estar acima de 0,98 e a eficiência da PCR entre 90% e 110%, o que significa coeficientes angulares entre -3,6 e -3,1 (COSTA et al., 2012; JIANG et al., 2009; ZEL et al., 2008). As eficiências de PCR e a linearidade da curva padrão indicaram que o gene *nifA* era adequado para a análise quantitativa do DNA alvo.

Outros métodos de PCR em tempo real para linhagens de *Azospirillum* apresentaram valores semelhantes para os parâmetros de qPCR. O método de qPCR proposto para *A. lipoferum* linhagem CRT1, os valores de E estavam entre 80% e 99% e os valores de R^2 foram superiores a 0,98 (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010), enquanto que para o método de qPCR desenvolvido para *A. brasilense* linhagens UAP-154 e CFN-535, os valores de E foram cerca de 90% e os valores de coeficiente de correlação (R^2) foram superiores a 0,99 (COUILLEROT, O. et al., 2010).

A fim de avaliar o efeito da presença de DNA de plantas para a amplificação do DNA alvo bacteriano, a eficiência de amplificação deste método qPCR foi estimada com diluição seriada de DNA bacteriano na presença de uma quantidade constante de DNA de raízes de milho, ou com diluição seriada de DNA de raízes de milho inoculadas com *A. brasilense*. Em ambos os casos, os valores de E eram superiores na presença de DNA de fundo do que na presença de uma solução de DNA bacteriano puro (Tabela 1.5). A presença de DNA de milho pode ter um efeito sobre a amplificação (ANDERSEN et al., 2006). Além disso, investigações anteriores sugeriram que os diferentes métodos de extração poderiam influenciar a quantificação de DNA por PCR em tempo real (PEANO et al., 2004). Por exemplo, as curvas de calibração obtidas com DNA extraído a partir do milho MON 810 eram diferentes dependendo do método de extração utilizado (CORBISIER et al., 2007).

Foi possível estimar o número de cópias do genoma bacteriano em raízes de milho inoculadas. Para ambas as variedades de milho cultivadas *in vitro*, o número de cópias de DNA bacteriano por grama de massa fresca de raiz aumentou significativamente de 4 para 10 DAI (Figura 1.2).

Parece que a população de *Azospirillum brasilense* aumentou rapidamente no início da interação com raízes do milho *in vitro*.

No entanto, para a variedade de milho P30F53 cultivada em potes, o número de cópias de DNA bacteriano por grama de massa fresca de raiz não apresentou diferenças significativas entre amostras coletadas em 1, 4, 7 e 10 DAI. Observou-se uma aparente discrepância entre os números de cópias do genoma por grama de raiz fresca por qPCR (Figura 1.2) e UFC/g de massa fresca de raiz por contagem em placa de raízes inoculadas (Tabela 1.1). Por outro lado, a comparação de Ct determinado por qPCR em função do log de UFC determinado por contagem em placa de diluição em série da cultura de *A. brasilense* apresentou uma relação linear (Figura 1.1B).

Em trabalho anterior (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2013), sementes de milho foram inoculadas *in vitro* com *A. brasilense* nas mesmas condições utilizadas no presente estudo, no entanto, o crescimento de *A. brasilense* durante a interação planta-bactéria não foi monitorado. A eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massa foram empregadas para analisar as mudanças no perfil de proteínas de raízes de milho em resposta a *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 10 dias após a inoculação e 87 *spots* de proteínas diferencialmente expressas foram revelados. Observou-se uma diminuição significativa de uma proteína apresentando homologia com a proteína semelhante a glicoproteína rica em hidroxiprolina (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2013), que está envolvida na via de sinalização de defesa (SUJEETH et al., 2012).

CONCLUSÕES

O presente trabalho relata o desenvolvimento de ensaio de qPCR para a quantificação de *A. brasilense* linhagem FP2 no interior de raízes de plantas. Os iniciadores desenvolvidos visando gene *nifA* serão úteis para avaliar, quantificar e monitorar a presença de *A. brasilense* FP2 em plântulas de cultivares de milho, além de permitir verificar a qualidade de inoculantes utilizados nas culturas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Fixação Biológica de Nitrogênio, CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil. ACF é beneficiário de uma

bolsa de doutoramento da FAPEMAT - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso, Brasil. TPP e EE são beneficiários de bolsas de mestrado da CAPES, Ministério da Educação, Brasil. FCAB é beneficiário de bolsa de pós-doutorado da CAPES PNPd e ACMA é beneficiário de bolsa de pesquisa do CNPq (PQ-2). Gostaríamos de expressar nossa gratidão a Fábio de Oliveira Pedrosa, Leda Chubatsu e Michelle Tadra-Sfeir, Universidade Federal do Paraná, pelo fornecimento da linhagem *A. brasilense* FP2, *H. seropedicae* linhagem SMR1 e outros *Herbaspirillum*, à Luciane Passaglia pelo fornecimento de *Rhizobium*, *Microbacterium* e *Pseudomonas*.

Material Suplementar

Tabela S1.1 - Contagem em placa (alíquota de 0,1 ml) da cultura de *A. brasilense* (DO₆₀₀nm 0,8) após diluição seriada.

Diluição Seriada	Contagem em Placa	UFC/mL
10 ⁻⁴	>250	-
10 ⁻⁵	27	2,7 x 10 ⁷
	31	3,1 x 10 ⁷
10 ⁻⁶	6	6,0 x 10 ⁷
	13	1,3 x 10 ⁸
10 ⁻⁷	1	-
	1	-

Tabela S1.2 - Detecção de *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 em raízes de plântulas de milho (variedades P30F53 e DKB240) por PCR usando iniciadores AznifA-A. As plantas foram cultivadas *in vitro*.

DAI	Replicata Biológica	Plântulas controle		Plântulas inoculadas	
		DKB240	P30F53	DKB240	P30F53
1	1	-	-	-	-
	2	-	-	+	-
	3	-	-	-	-
4	1	-	-	-	-
	2	-	-	+	+
	3	-	-	+	+
7	1	-	-	+	+
	2	-	-	+	+
	3	-	-	+	+
10	1	-	-	+	+
	2	-	-	+	+
	3	-	-	+	+

+ significa presença e - significa ausência de amplificação.

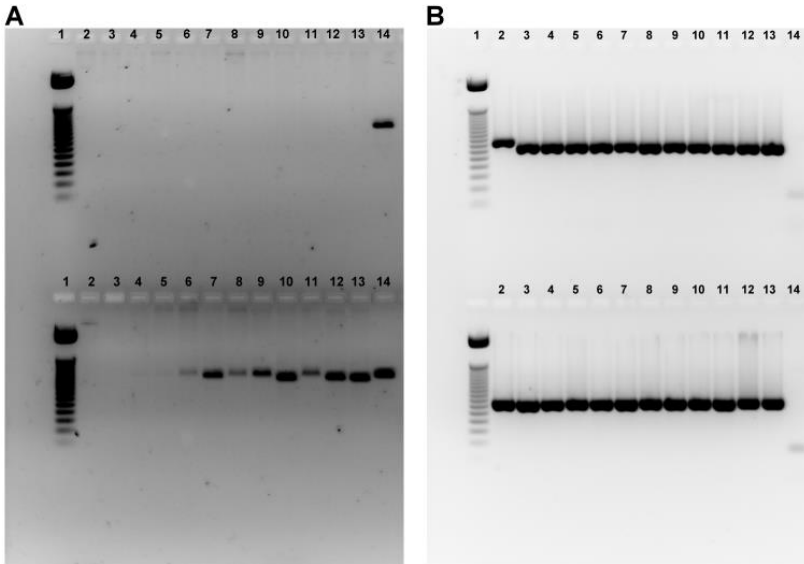


Figura S1.1 - PCR de raízes de milho, utilizando iniciadores (A) AznifA-A visando o gene *nifA* de *Azospirillum brasilense* (439 pb) e (B) visando gene zeína de milho ZEO (329 pb). As plântulas (variedade DKB 240) foram cultivadas *in vitro*. Superior: 1 – Marcador Molecular (50 pb); 2 a 4 – Controle 1 D.A.I.; 5 a 7 – Controle 4 D.A.I.; 8 a 10 – Controle 7 D.A.I.; 11 a 13 – Controle 10 D.A.I.; 14 – *Azospirillum brasilense* FP2. Legenda Parte Inferior: 1 – Marcador Molecular (50 pb); 2 a 4 – Inoculado 1 D.A.I.; 5 a 7 – Inoculado 4 D.A.I.; 8 a 10 – Inoculado 7 D.A.I.; 11 a 13 – Inoculado 10 D.A.I.; 14 – *Azospirillum brasilense* FP2. 10 µl do produto de PCR + 1 mL de tampão de carregamento por canaleta.

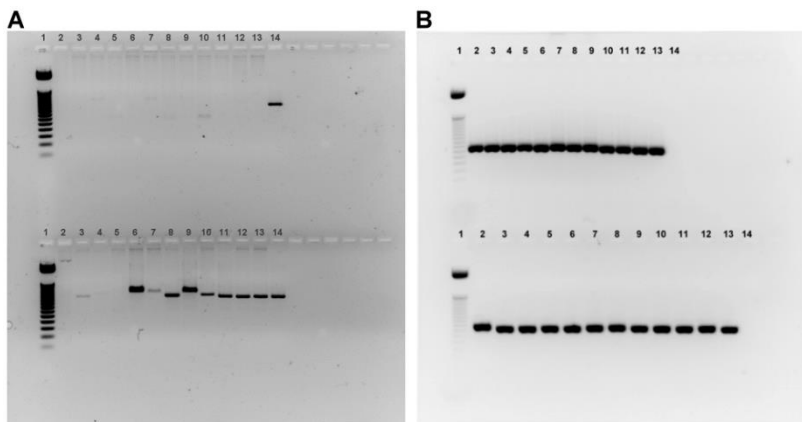


Figura S1.2 - PCR de raízes de milho, utilizando iniciadores (A) AznifA-A visando o gene *nifA* de *Azospirillum brasilense* (439 pb) e (B) visando gene zeína de milho ZEO (329 pb). As plântulas (variedade P30F53) foram cultivadas *in vitro*. Superior: 1 – Marcador Molecular (50 pb); 2 a 4 – Controle 1 D.A.I.; 5 a 7 – Controle 4 D.A.I.; 8 a 10 – Controle 7 D.A.I.; 11 a 13 – Controle 10 D.A.I.; 14 – *Azospirillum brasilense* FP2. Legenda Parte Inferior: 1 – Marcador Molecular (50 pb); 2 a 4 – Inoculado 1 D.A.I.; 5 a 7 – Inoculado 4 D.A.I.; 8 a 10 – Inoculado 7 D.A.I.; 11 a 13 – Inoculado 10 D.A.I.; 14 – *Azospirillum brasilense* FP2. 10 µl do produto de PCR + 1 mL de tampão de carregamento por canaleta.

CAPÍTULO 2

Perfil proteômico de raízes de milho (variedade P30F53) inoculado com *Azospirillum brasilense* linhagem FP2

FALEIRO, A. C.; VALENTIM NETO, P. A.; BÁLSAMO, G. M.; SOUZA, T. V.; SANTOS, M.; ARISI, A. C. M*. **Proteomic profile of *Zea mays* roots (P30F53) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2**

RESUMO

As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) são consideradas como tendo um efeito benéfico sobre as plantas hospedeiras. *Azospirillum brasilense* é uma diazotrófica relacionada com culturas agrícolas importantes, tais como milho e trigo, e tem sido utilizada como organismo-modelo para investigar promoção do crescimento de plantas associadas. A promoção do crescimento vegetal pelos RPCV envolvem vários mecanismos, entre eles, a capacidade de fixação biológica do nitrogênio e a produção de fitormônios. Contudo, os mecanismos para a promoção do crescimento não são totalmente compreendidos. Comparando-se plântulas da variedade P30F53, controle e inoculadas com *A. brasilense* FP2, foram encontradas diferenças significativas 7 dias após a inoculação (DAI) em 7 dos 8 parâmetros avaliados (massa fresca e tamanho da folha, massa fresca e tamanho da raiz principal, número de raízes laterais, massa fresca e número de raízes adventícias e massa fresca total das raízes). A observação de raízes através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que *A. brasilense* FP2 se liga à superfície radicular, tanto na região do ápice quanto do terço médio, e podem ser encontradas como células simples ou agregadas. Neste estudo foi empregada a eletroforese em gel bidimensional e espectrometria de massa para analisar as mudanças no perfil de proteínas de raízes de milho em resposta a *A. brasilense* linhagem FP2 sete dias após a inoculação, sendo detectados 46 *spots* de proteínas diferencialmente acumuladas em raízes de milho da variedade Pioneer 30F53. As proteínas foram identificadas a partir da sua impressão digital da massa de peptídeos através de pesquisa na base de dados NCBIInr, e uma identidade presumida pode ser atribuída para 3 *spots* considerando *e*-valor < 0,05. Duas proteínas (*spots* 411 e 904) apresentaram homologia com proteínas hipotéticas de *Zea mays*, sendo ZEAMMB73_130777 e ZEAMMB73_607847, respectivamente. Uma proteína apresentou homologia com uma proteína hipotética de *Oryza sativa*.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, interação planta-bactéria, proteômica, RPCV

INTRODUÇÃO

Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) são consideradas como tendo um efeito benéfico sobre as plantas hospedeiras e, dentre elas, *Azospirillum brasilense* que é um diazotrófo relacionado com culturas agrícolas importantes, tais como milho e trigo, e tem sido utilizada como organismo-modelo para investigar a promoção do crescimento vegetal. Sabe-se há muito tempo, que *A. brasilense* tem efeitos benéficos sobre as plantas inoculadas (ARRUDA et al., 2013; HUNGRIA, M. et al., 2010). A inoculação com *A. brasilense* tem a capacidade de promover o desenvolvimento de raízes laterais e adventícias em diversas plantas (FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012; MOLINA-FAVERO et al., 2008), bem como favorece o crescimento das plantas por meio de uma interação eficiente com as raízes das plantas hospedeiras (KATSY; PRILIPOV, 2009). A bactéria coloniza a superfície da raiz e estimula a proliferação de raízes nas plantas através da produção de auxinas, resultando em maior exsudação radicular da planta (FIBACH-PALDI et al., 2012; LIN et al., 2011). No entanto, os mecanismos de promoção do crescimento não estão completamente entendidos, o efeito tem sido principalmente atribuído à produção de fitormônios e à fixação biológica de nitrogênio, entre outros mecanismos (CASTELLEN et al., 2009; DE-BASHAN; BASHAN, 2004).

Por mais de 100 anos, o milho tem sido um dos principais produtos agrícolas utilizados como alimento, na produção de rações e matéria-prima industrial para biocombustíveis e bioprodutos (FEUILLET; EVERSOLE, 2009). O rendimento da cultura de milho no Brasil para a safra 2012/2013 foi de 81.007,20 milhões de toneladas e a área total de milho plantado no Brasil foi de 15.821,90 milhões de hectares (CONAB, 2013). Estudos realizados com várias espécies de plantas provaram ser possível conseguir um aumento de 5 a 30% de rendimento por meio da inoculação com *Azospirillum*, especialmente quando usado com baixas quantidades de fertilizante químico nitrogenado (OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Em experimentos de campo conduzidos no Brasil, inoculantes líquidos e à base de turfa carregando uma combinação de linhagens de *A. brasilense* aumentou a produção de milho em 27%. Os efeitos da inoculação foram atribuídos ao aumento geral na absorção de vários macro e micronutrientes (HUNGRIA, M. et al., 2010). Em experimentos realizados em casa de vegetação, este aumento da produtividade pode ser ainda maior (HOLGUIN et al., 1999), sendo também possível observar mudanças significativas nos perfis

metabólicos secundários de raízes e parte aérea de milho inoculadas com linhagens de *Azospirillum* (WALKER et al., 2012).

A interação precoce entre RPCV e plântulas é importante para o estabelecimento na rizosfera de células bacterianas ou promoção bem sucedida do crescimento vegetal (WALKER et al., 2012). Portanto, para que RPCV tenham um efeito benéfico sobre o crescimento da planta através de uma melhoria do estado nutricional de seu hospedeiro, é necessária uma relação íntima entre a RPCV e a planta hospedeira. No entanto, o grau de intimidade entre a RPCV e a planta hospedeira pode variar dependendo de onde e como a RPCV coloniza a planta hospedeira (VERMA et al., 2010).

Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares pelo qual as plantas controlam esta associação pode contribuir para a melhoria desta interação (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012; MONTEIRO et al., 2012; VARGAS et al., 2012). Embora tenha havido avanços significativos na elucidação dos detalhes de interações planta-bactéria nos últimos anos (GUTIERREZ-LUNA et al., 2010; KARTHIKEYAN et al., 2012), muitas questões fundamentais sobre estes processos precisam ser resolvidas (YANG et al., 2013). Porém, as abordagens que analisam apenas uma única via bioquímica muitas vezes perdem a multiplicidade de efeitos que plantas e bactérias têm um sobre o outro, motivando o emprego de abordagens mais amplas, como a análise proteômica, que permite aos pesquisadores investigar a resposta detalhada de plantas e bactérias (CHENG et al., 2010).

A eletroforese em gel bidimensional (2DE) combinada com a espectrometria de massa é um dos métodos mais amplamente utilizados para comparar proteomas de plantas para identificar proteínas expressas diferencialmente (CHENG et al., 2010). Assim, este estudo teve como objetivo, através da análise proteômica e da espectrometria de massa, detectar e identificar proteínas diferencialmente acumuladas em raízes de milho da variedade P30F53 em resposta à inoculação com *A. brasilense* linhagem FP2.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação de mudas e condição de crescimento

Sementes de milho (*Zea mays*, cv. P30F53) foram desinfectadas através de três lavagens com água ultrapura esterilizada, seguida de etanol a 70% durante 3 min e por hipoclorito de sódio a 2% e 2,5% de Tween-20 (USB, Cleveland, OH, EUA), durante 30 minutos. As sementes foram então lavadas três vezes com água ultrapura esterilizada por agitação suave, transferidas para placas de ágar contendo 0,8% de ágar e mantidas durante 3 dias em câmara de crescimento a uma temperatura de 25 °C, no escuro, para a germinação.

Azospirillum brasilense linhagem FP2 (cepa Sp7 ATCC 29145 NaI^R Sm^R) (PEDROSA; YATES, 1984) foi cultivada em um agitador orbital (120 rpm) a 30 °C em 30 mL de meio NFbHPN suplementado com 5 mg de lactato de sódio/L (PEDROSA; YATES, 1984) até alcançar a DO₆₀₀ de 0,8 (10⁸ células/mL). Após diluição da suspensão bacteriana, trinta plântulas foram incubadas em 30 mL de meio NFb lactato, 1 mL 10⁵ células bacterianas.mL⁻¹ de *A. brasilense* linhagem FP2, sem fonte de nitrogênio em um agitador orbital (80 rpm) durante 30 min a 30 °C (BALSANELLI et al., 2010). As plântulas controle foram submetidas às mesmas condições, no entanto, sem a presença da bactéria.

Após a incubação, as sementes pré-germinadas foram lavadas com solução salina a 0,9% durante 1 min e, em seguida, transferidas para tubos de vidro contendo meio de cultivo líquido para plantas (EGENER et al., 1999). As plântulas de cada tratamento foram cultivadas lado a lado numa câmara de ambiente controlado durante 10 dias (16h de fotoperíodo, 150 µmol.m⁻².s⁻¹, 25 °C claro/23 °C escuro e 40% de umidade). Amostras de raízes coletadas 7 DAI foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C para extração de proteínas. Três experimentos independentes foram realizados em diferentes períodos de tempo.

Avaliação dos parâmetros de crescimento

O comprimento da raiz e da parte aérea, bem como a massa fresca e número de raízes laterais foram mensurados 1, 4, 7 e 10 DAI. Todos os dados dos parâmetros de crescimento foram analisados pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon ($P < 0,05$), utilizando o software R v2.15.3 (R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org/>).

Microscopia eletrônica de varredura

Os terços médio e o ápice de raízes inoculadas com *A. brasilense* foram coletados 7 DAI. As amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,2, lavadas com o mesmo tampão e desidratadas uma série alcoólica (20, 40, 60, 70, 80, 90, 96%, 100%) durante 30 minutos a cada concentração. Após a desidratação completa, as amostras foram secas ao ponto crítico do CO₂ Leica EM CDP 300, de acordo com Horridge e Tamm (1969). As amostras secas foram fixadas em suportes de alumínio com o auxílio de fita de carbono dupla face e revestidas com 20 nm de ouro por pulverização catódica marca Leica, modelo SCD500 para o estudo ultraestrutural em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-6390LV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica Universidade Federal de Santa Catarina (LCME – UFSC).

Extração de proteínas por eletroforese em gel bidimensional

A extração da proteínas foi realizada utilizando o protocolo proposto por Prinsi et al. (2009), com modificações nos tempos de centrifugação, conforme descrito a seguir. Uma amostra de raízes controle e uma de raízes inoculadas coletadas 7 DAI foram usadas para cada triplicata biológica, gerando três extratos de proteína a partir de cada tratamento. Raízes congeladas foram moídas em nitrogênio líquido até a formação de um pó fino usando um almofariz e pilão estéreis, cerca de 250 mg de cada amostra (três raízes) foram extraídas com 4 mL de tampão de extração (0,5 mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8; 0,7 mol L⁻¹ de sacarose; 100 mmol L⁻¹ EDTA; PMSF 1 mmol L⁻¹; 1% (m/v) de CHAPS, 14 mmol L⁻¹ DTT; inibidor de protease Roche) por homogeneização em vórtex. Após centrifugação a 20000 x g durante 20 min a 4 °C, a fase superior foi transferida para um novo tubo e o tampão de precipitação (12,5% (m/v) de TCA e 0,125% (m/v), DTT em acetona pura) foi adicionado. Após a incubação a -20 °C durante 1 hora e centrifugação a 20000 x g durante 20 min a 4 °C, o sedimento foi lavado com metanol e acetona contendo 0,1% (m/v) de DTT. Peletes de proteínas secas foram ressuspensos em solução de reidratação *DeStreak*. Após incubação durante 30 min à temperatura ambiente e centrifugação a 10000 x g durante 30 min a 4 °C, o sobrenadante foi usado para purificação da proteína utilizando 2D Cleanup Kit. As concentrações de proteína foram determinadas usando o 2D Quant Kit (GE Healthcare®).

Eletrforese em gel bidimensional (2DE)

A 2DE foi realizada utilizando Ettan IPGphor 3, sistema SE 600 Ruby (GE Healthcare®) usando o protocolo de acordo com o fabricante. As proteínas totais (250 µg) foram misturadas em 250 µL de tampão de reidratação (7 mol L⁻¹ de ureia, 2 mol L⁻¹ tiourea, 2% m/v de CHAPS, 0,28% m/v de DTT, 1% v/v de tampão IPG e 0,002% de azul de bromofenol) e focalização isoeétrica (IEF), utilizando tiras IPG de 13 centímetros de gradiente linear de pH 4-7 (Imobiline DryStrip, GE Healthcare®). A IEF foi realizada utilizando os seguintes passos: 50 V por 30 min, 500 V por 60 min, 1000 V por 60 min, 4000 V por 60 min, 8000 V para 140 min e 8000 V por 30 min até que um total de 21 kWh tivesse sido acumulado. As proteínas foram subsequentemente reduzidas com DTT e alquiladas com iodoacetamida, antes da segunda dimensão (SDS-PAGE), com uma solução contendo 6 mol L⁻¹ de ureia, 30% glicerol, 2% de SDS, 75 mmol L⁻¹ de Tris-HCl, pH 8,8, 0,002% de azul de bromofenol e 1% m/v de DTT, durante 15 min, e com a mesma solução contendo 2,5% m/v de iodoacetamida em vez de DTT, durante 15 min. A tira de gel equilibrada foi então colocada no topo do gel SDS-PAGE 12,5% e selada com 0,5% de agarose contendo azul de bromofenol. A corrida em gel de SDS-PAGE foi realizada a 15 mA por gel durante 25 min, depois a 30 mA por gel até que linha de frente atingisse o fim do gel. Imediatamente, os géis foram fixados em solução contendo 50% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético, e corante Comassie Blue Brilhante contendo 10% (m/v) de sulfato de amônio, 10% (v/v) de ácido fosfórico, 20% (v/v) de metanol. Os géis corados foram mantidos em 1% (m/v) de ácido acético a 4 °C até serem visualizados utilizando um scanner Labscan (GE Healthcare®). As imagens resultantes dos seis géis foram exportadas para ImageMaster™ software Platinum v.7.0 (GE Healthcare®). Os seguintes parâmetros foram utilizados para a detecção dos *spots*: saliência ≥ 100, área ≥ 11 e suavidade ≥ 6. Os volumes de proteína foram normalizados com base no volume total de *spots* válidos e a abundância de cada *spot* de proteína foi estimada pela percentagem em volume (% vol.). As proteínas foram aceitas como diferencialmente acumuladas entre os tratamentos, quando eles apresentaram uma variação de mais de duas vezes. *Spots* reproduzíveis em repetições biológicas e representando diferença significativa (ANOVA $P < 0,05$) foram incluídos na análise.

Digestão de proteínas e análise de MALDI-TOF-MS

Os *spots* de proteínas de géis corados foram excisados manualmente e submetidos ao processo de descoloração em 400 μL de uma solução (v/v) 50% acetonitrila (ACN), 25 mmol L^{-1} de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) durante 30 minutos à temperatura ambiente. O procedimento foi repetido duas vezes. A solução foi substituída por 200 μL de acetonitrila pura durante 5 minutos e secou-se sob vácuo. As proteínas foram então incubadas durante 30 minutos em gelo na presença de 10 μL de tripsina 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de (tripsina V5280, Promega), seguido de 18h em NH_4HCO_3 a 37 °C. Após tripsinização, os peptídeos foram misturados 1:1 com matriz de MALDI digeridos com 1 μL de solução da matriz ácida saturada (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, 50% de ACN e 0,1% de TFA), colocados em placa e deixados para cristalizar à temperatura ambiente. Dados de EM foram adquiridos usando laser onde 2000-3000 disparos foram acumulados para cada espectro obtido a partir do espectrômetro de massa Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics). O espectrômetro de massa foi ajustado para o modo MALDI-TOF impressão digital de massa do peptídeo (PMF - *peptide mass fingerprint*), com o modo totalmente automático usando FlexControl™. Neste estudo, foram utilizados 20 kV de aceleração e frequência do laser de 50 Hz. A calibração externa foi realizada utilizando uma mistura de íons de peptídeos $[\text{M} + \text{H}]^+$ de angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina e hormônio adrenocorticotrófico. O espectro gerado foi analisado por FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As proteínas foram analisadas por PMF e a lista de massas derivada de peptídeos foi pesquisada em NCBI^{Inr} utilizando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com/cgi/protein-view>). Os seguintes parâmetros foram utilizados para pesquisas no banco de dados: Taxonomia: Viridiplantae e Proteobacteria; enzima: tripsina. O limite de erro de massa do peptídeo foi fixado em ± 120 ppm; EM tolerância da massa do íon foi fixado em 0,6 Da; carga do peptídeo 1 H^+ Carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina foram selecionadas como modificações fixa e variável, respectivamente. Quando as proteínas foram identificadas como "putativa não-caracterizada", as sequências homólogas foram encontrados utilizando a pesquisa BLAST contra a UniProtKB.

RESULTADOS

Avaliação dos parâmetros de crescimento

Aumento significativo foi observado nas plântulas inoculadas para comprimento da raiz principal e da parte aérea e massa fresca da parte aérea 4 DAI, para todos os parâmetros medidos 7 DAI e para o comprimento da raiz principal e número de raízes laterais 10 DAI (Figura 2.1). Apenas o número de raízes adventícias não apresentou diferenças significativas para os períodos de tempo amostrados.

Microscopia eletrônica de varredura

Raízes de plântulas de milho crescidas em tubos de ensaio e inoculadas com *A. brasilense* FP2 foram coletadas 7 DAI e as observações através da MEV mostraram a presença de bactérias, tanto nos terços médios como no ápice da raiz com diferentes graus de colonização. É possível visualizar as células individuais (Figuras 2.2, 2.3A e 2.3B, 2.5A e 2.5B), o início da formação de biofilmes que reveste a superfície da raiz (Figura 2.4), bem como os grupos pequenos de bactérias (Figuras 2.5A e 2.5B). As células bacterianas observadas exibiram a forma vibrióide de *A. brasilense* (Figura 2.6) e exibiram um espesso material do tipo fibrilar ligando-os às raízes e uns aos outros sobre a superfície da raiz (Figura 2.4).

Em estudo anterior, empregando a técnica de qPCR (FALEIRO et al., 2013), *A. brasilense* FP2 foi detectado apenas a partir do 4.º dia após a inoculação. Assim, os resultados obtidos a partir da microscopia eletrônica de varredura estão de acordo com os resultados encontrados previamente.

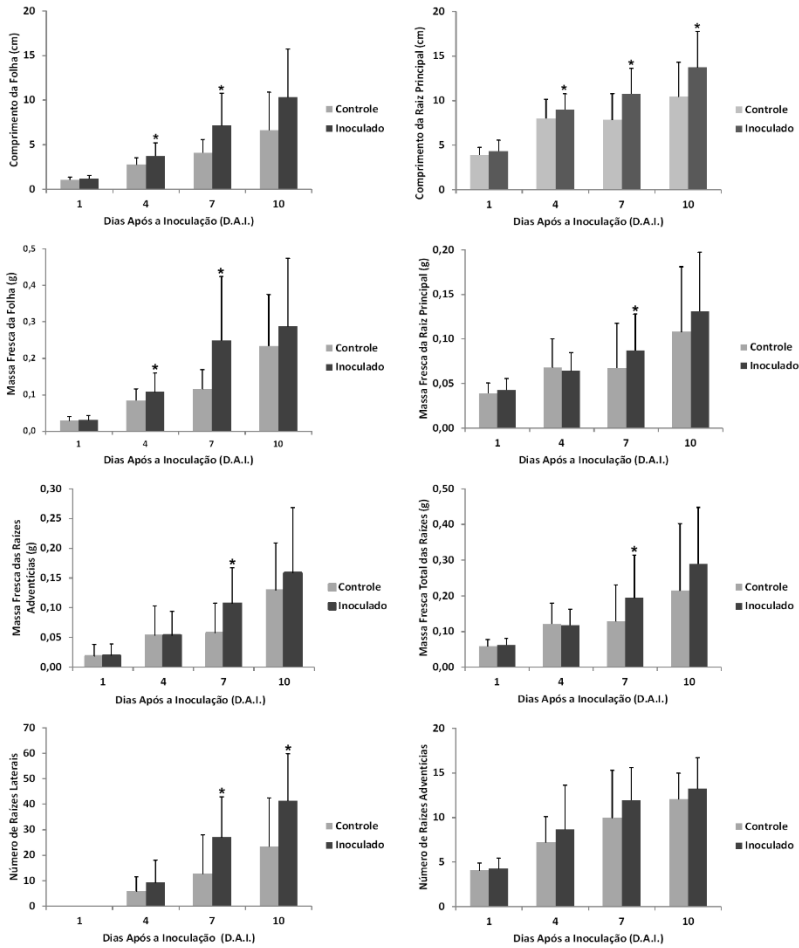


Figura 2.1 - Parâmetros de crescimento de plântulas de milho (variedade P30F53) cultivadas *in vitro* após a inoculação com *Azospirillum brasilense* FP2. Amostras controle e inoculadas coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos (controle e inoculado) em cada tempo de amostragem para o teste *Wilcoxon* ($P < 0,05$). Os dados são apresentados como médias \pm DP ($n = 27$).

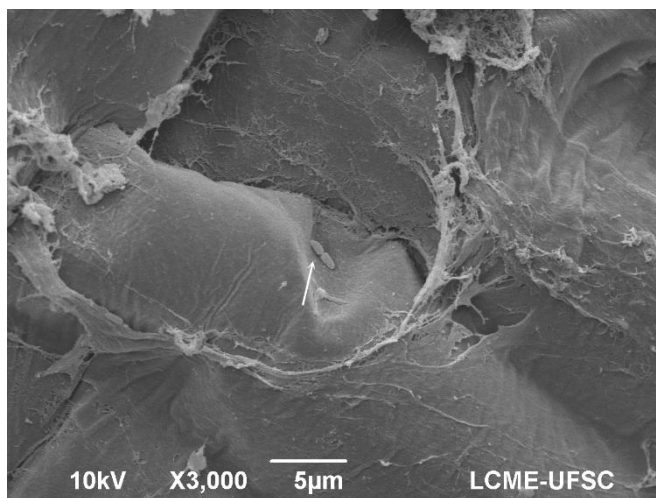


Figura 2.2 – Eletromicrografia de superfície de raízes de milho inoculadas com *A. brasilense* FP2. Bactérias como células simples associadas às células epidérmicas da região do ápice da raiz de milho da variedade P30F53 4 DAI.

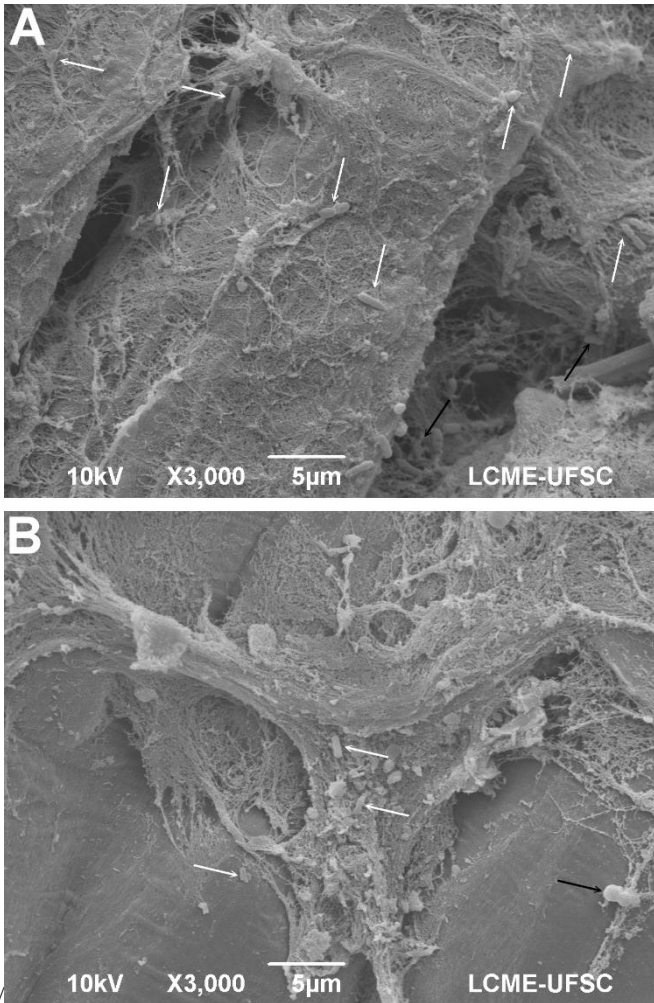


Figura 2.3 – Eletromicrografia de superfície de raízes de milho (variedade P30F53) inoculadas com *A. brasilense* FP2. A e B: Bactérias como células simples (setas brancas) e bactérias reunidas em pequenos grupos (setas pretas) associados com as células epidérmicas de ápice da raiz (B).

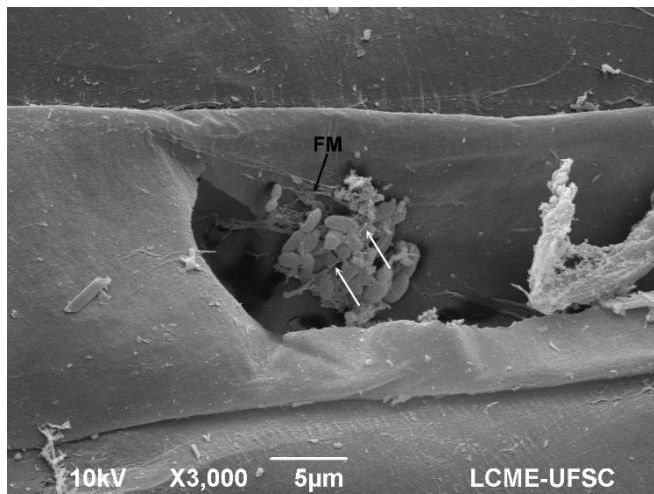


Figura 2.4 – Eletromicrografia de superfície de raízes de milho inoculadas com *A. brasilense* FP2, mostrando a formação de biofilme sobre a superfície das células da epiderme na região do terço médio da raiz de milho da variedade P30F53 7 DAI. Note-se a presença de espesso material do tipo fibrilar (FM), produzido pelas células bacterianas.

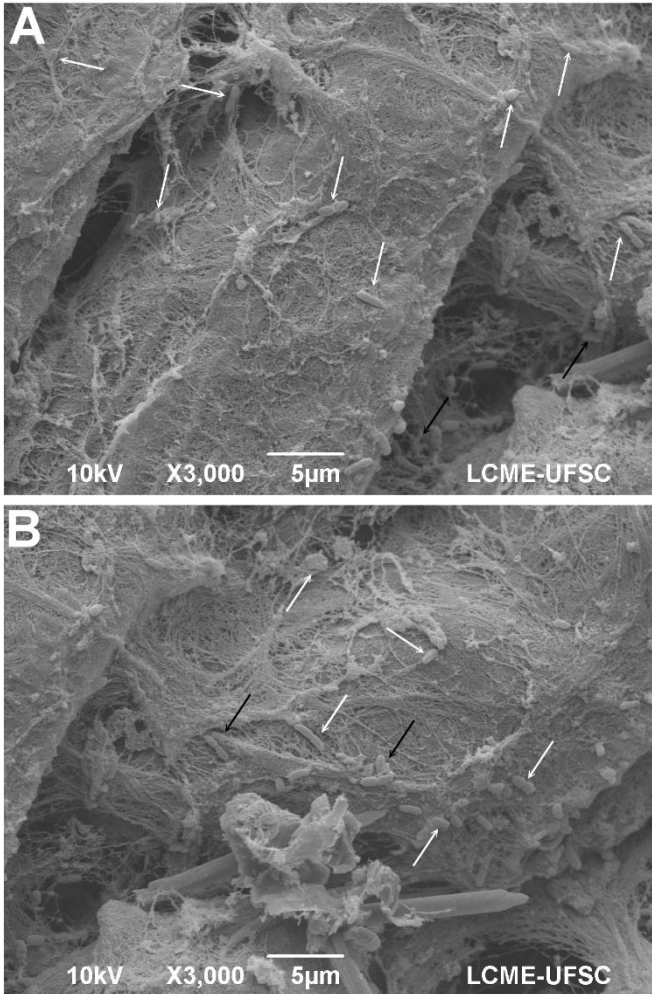


Figura 2.5 – Eletromicrografia de superfície de raízes de milho inoculadas com *A. brasilense* FP2. A e B: Bactérias como células simples (setas brancas) e células agregadas (setas pretas) associados com as células epidérmicas da região do ápice de raiz de milho da variedade P30F53 10 DAI.

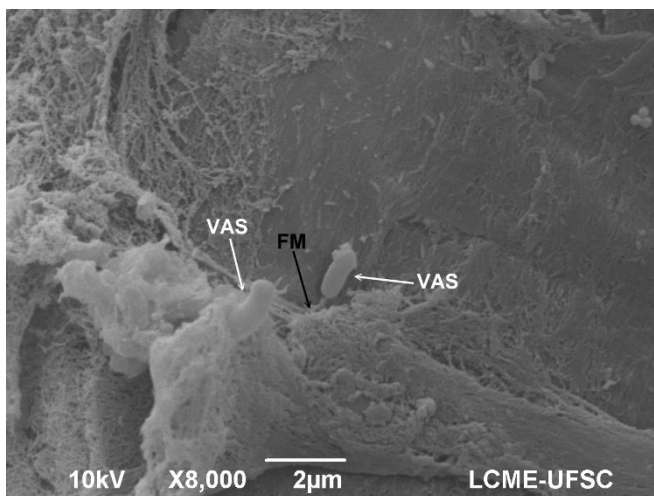


Figura 2.6 – Forma vibríóide de *A. brasilense* FP2 (VAS) na superfície de células da epiderme na região do terço médio da raiz de milho (P30F53) 7 DAI. Note-se a presença de espesso material do tipo fibrilar (FM), produzido pelas células bacterianas.

Eletroforese em gel bidimensional (2DE)

Um total de 961 diferentes *spots* de proteína e 908 *spots* correspondentes (presentes em todos os géis) (99%) foram detectados em mapas 2DE de três raízes controle e um total de 993 *spots* e 822 *spots* correspondentes (98%) foram detectados em mapas 2DE de três raízes inoculadas (Figura 2.7).

A variabilidade entre as replicatas biológicas foi avaliada a partir dos gráficos de dispersão de *spots* correspondentes. Comparando os *spots* combinados de mapas 2DE de três replicatas de raízes controle, os coeficientes angulares foram de 1,03 e os coeficientes de correlação dos gráficos de dispersão estavam na faixa de 0,902-0,933 (Tabela 2.1). No que diz respeito aos *spots* correspondentes de três géis (triplicatas) de raízes inoculadas, o coeficiente angular variou de 0,925-1,06 e os coeficientes de correlação de gráficos de dispersão estavam na faixa de 0,845-0,919 (Tabela 2.1). A análise proteômica revelou 46 *spots* de proteínas diferencialmente acumuladas, 15 tiveram sua expressão aumentada e, 19, reprimida nas raízes inoculadas em relação às raízes controle, 5 foram exclusivamente expressos em raízes controle e 7

exclusivamente expressos em raízes inoculadas e, destas proteínas, apenas 3 foram identificadas (Tabela 2.2).

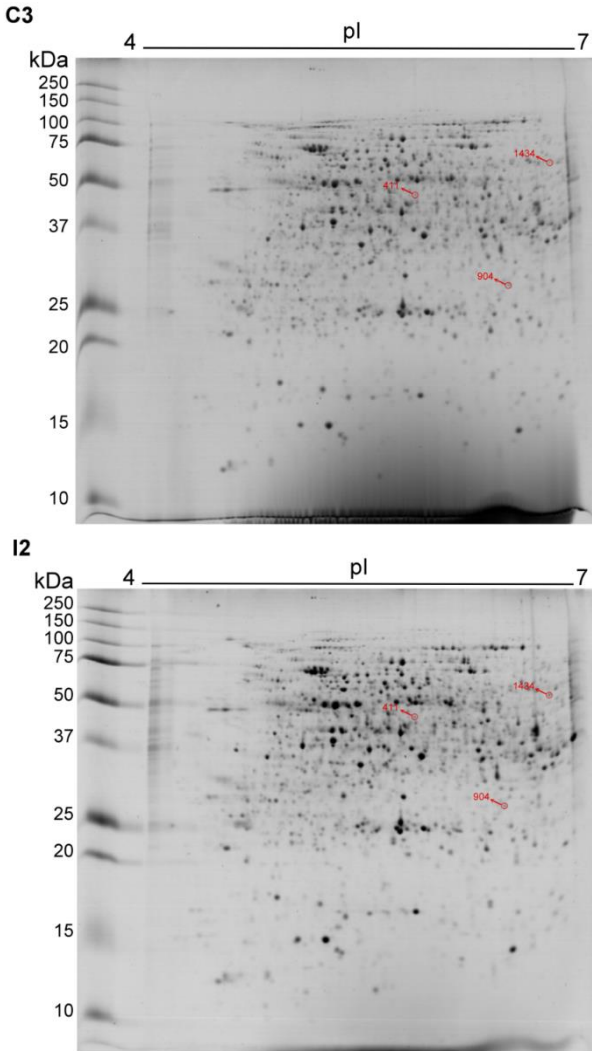


Figura 2.7 - Géis de referência (2DE) do proteoma de raízes de milho da variedade P30F53, raízes de milho controle (C3) e inoculadas com *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 (I2). O *spot* 411 apresentou expressão diminuída em raízes controle, enquanto os *spots* 904 e 1434 apresentaram expressão aumentada nas raízes inoculadas.

Tabela 2.1 - Número total de *spots* e de *spots* correspondentes, coeficiente angular e coeficiente de correlação dos gráficos de dispersão dos mapas 2DE de raízes controle (C) e raízes inoculadas (I).

Gel	Total de <i>spots</i>	<i>Spots</i> Correspondentes	% <i>Spots</i> Correspondentes	Coeficiente Angular	Coeficiente de Correlação
C3 (ref)	961	853	89	-	-
C1	913	901	99	1,03	0,902
C2	954	874	92	1,03	0,933
I2 (ref)	993	849	85	1,06	0,919
I1	837	811	97	1,01	0,845
I3	929	811	87	0,925	0,918

Espectrometria de Massa

Todas as proteínas diferencialmente acumuladas foram analisadas por espectrometria de massa. As proteínas foram identificadas a partir da sua impressão digital da massa de peptídeos através de pesquisa na base de dados NCBIInr, e uma identidade presumida pode ser atribuída para 3 *spots* considerando *e*-valor < 0,05 (Tabela 2.3).

Tabela 2.2 - *Spots* de proteínas diferencialmente acumulados nas raízes de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* linhagem FP2 com relação as raízes controle de milho.

Acumulação Diferencial	Número de <i>spots</i> de proteína	Número de proteínas identificadas
Proteínas com expressão aumentada	15	2
Proteínas com expressão diminuída	19	1
Proteínas exclusivas em raízes controle	5	-
Proteínas exclusivas em raízes inoculadas	7	-

Proteínas foram consideradas como sendo diferencialmente expressas se acumuladas em níveis diferentes, com nível de confiança de 95% pelo teste *t* de Student. Proteínas exclusivos apresentaram % Vol $\geq 0,2$.

O *spot* 904 apresentou expressão aumentada (3,48 vezes) nas raízes de plantas inoculadas em relação as amostras controle. A proteína (*spot* 904) apresentou homologia com a proteína hipotética (ZEAMMB73_607847) de *Zea mays*.

O *spot* 1434 apresentou expressão aumentada (2,36 vezes) nas raízes de plantas inoculadas em relação as amostras controle. A proteína (*spot* 1434) apresentou homologia com uma proteína hipotética de *Oryza sativa*.

O *spot* 411 apresentou expressão diminuída, (0,25 vezes) nas raízes de plantas inoculadas em relação as amostras controle. A proteína (*spot* 411) apresentou homologia com a proteína hipotética (ZEAMMB73_130777) de *Zea mays*.

Tabela 2.3 - Proteínas identificadas por espectrometria de massa a partir de mapas 2DE de raízes de milho controle e inoculadas com *Azospirillum brasilense* linhagem FP2.

<i>Spot ID</i> ^a	Nome da Proteína	Número de Acesso ^b	<i>Score Mascot</i>	Cobertura %	e-valor	MW Teor (kDa)	MW Exp (kDa)	pI Teor.	pI Exptl.	I/C ^c	Espécie
904	TPA: hypothetical protein ZEAMMB73_607847, partial	gi 414591381	62	20	0,043	31,97	28	9,73	6,57	3,48	<i>Zea mays</i>
1434	Hypothetical protein (<i>Oryza sativa</i> japonica group)	gi 15528848	63	13	0,039	55,58	58	8,97	6,87	2,36	<i>Oryza sativa</i>
411	TPA: hypothetical protein ZEAMMB73_130777	gi 414869158	61	42	0,050	11,50	47	10,17	6,21	0,25	<i>Zea mays</i>

a. ID do *spot* no gel

b. Número de acesso do banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

c. Relação de % volume de *spot* em raízes inoculadas (I) por % de volume de *spot* em raízes controle (C).

DISCUSSÃO

Em estudo anterior, a colonização de raízes de milho por *A. brasilense* foi avaliada pelo método de cultivo convencional, contagem em placa, nas mesmas condições experimentais. O ensaio de colonização radicular mostrou que cerca de 10^4 UFC/g estava presente em raízes inoculadas 4, 7 e 10 DAI. Não foi detectada a presença de bactérias em raízes coletadas 1 DAI. A presença de bactérias não foi detectada em todas as raízes controle (FALEIRO et al., 2013).

Parâmetros de crescimento avaliados para a variedade P30F53, apresentaram diferenças significativas para massa fresca e tamanho da folha; massa fresca e tamanho da raiz principal, número de raízes laterais; massa fresca total das raízes e massa fresca das raízes adventícias. Apenas o número de raízes adventícias não apresentou diferença significativa para períodos de coleta amostrados (Figura 2.1). No caso da fitoestimulação por *Azospirillum*, os efeitos positivos diretos sobre o crescimento das plantas pode ocorrer a partir da fixação de nitrogênio associativa (DE-BASHAN; BASHAN, 2004; WALKER et al., 2011), pela ação de fitormônios, como auxinas (alongamento celular, a formação de raízes laterais), citocinina (divisão e diferenciação celular) e giberelinas (formação de raízes laterais e folhas), que são produzidos, não só pelas plantas, mas também por *A. brasilense* (BASHAN et al., 2010; DODD et al., 2010; SAHARAN; NEHRA, 2011). A produção de fitormônios tem sido proposta como o principal modo de ação da RPCV *Azospirillum* (DOBBELAERE, S et al., 2003). A estimulação do crescimento e da ramificação das raízes (EL ZEMRANY et al., 2006; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009) promove uma melhoria na absorção de água e de minerais pela planta (EL ZEMRANY et al., 2006; FALLIK; OKON, 1996). Estes hormônios são sintetizados pela planta desde o início do desenvolvimento e permanecem durante toda a vida da planta.

Numerosos estudos têm mostrado que RPCV podem estimular o crescimento das plantas por meio de vários processos, incluindo a fixação biológica, a síntese de hormônios e outras moléculas; solubilização de fosfato, e exercendo controle biológico de agentes patogênicos (FIGUEIREDO et al., 2010; HUNGRIA, M. et al., 2010; IKEDA et al., 2013). Trabalhos recentes revelaram o controle do metabolismo de nitrogênio em *A. brasilense* (INABA et al., 2009; RAJENDRAN et al., 2011) e os mecanismos moleculares de uma bem-sucedida interação planta-RPCV (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012; VARGAS et al., 2012). Cangahuala-Inocente et al. (2013), empregou eletroforese

bidimensional e espectrometria de massa para analisar as mudanças no perfil proteômico de raízes de milho (variedade DKB240) em resposta à *A. brasilense* linhagem FP2 10 DAI e foram revelados 87 *spots* de proteínas diferencialmente acumuladas. Uma diminuição significativa de uma proteína apresentando homologia a proteína semelhante a glicoproteína rica em hidroxiprolina foi observada. Esta proteína está envolvida na via sinalizadora de defesa.

Considerando que as raízes são o local primário de interação entre as plantas e os micro-organismos, foi realizada a análise de raízes de milho coletadas 7 DAI para observar os eventos iniciais durante a interação planta-bactéria.

A análise ultraestrutural teve como objetivo detectar as bactérias na superfície da raiz 4, 7 e 10 DAI. Os diferentes padrões de adsorção, como células individuais dispersas aleatoriamente (Figuras 2.2, 2.3A e 2.3B, 2.5A e 2.5B), biofilmes (Figura 2.4), e agregados bacterianos (Figura 2.5A e 2.5B) assim como a ancoragem de *A. brasilense* à superfície radicular por uma rede de material do tipo fibrilar (Figura 2.6) são, provavelmente, características comuns do gênero (GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012; LEVANONY; BASHAN, 1991). A principal razão para esta ancoragem pode ser explicada pela constante produção de compostos químicos pelas regiões de crescimento da raiz, o que pode atrair células de *Azospirillum* (BASHAN; LEVANONY; KLEIN, 1986), além dos polissacarídeos extracelulares produzidos por *A. brasilense* (BURDMAN et al., 1998; LERNER et al., 2009; VOLFSOON et al., 2013). Este mecanismo de atração é chamado quimiotaxia e está relacionada com a capacidade das bactérias associadas com a planta metabolizarem compostos aromáticos (HARWOOD; RIVELLI; ORNSTON, 1984; PARALES; HARWOOD, 2002), sugerindo que compostos aromáticos derivados da planta poderiam servir para recrutar rizobactérias benéficas à planta para a rizosfera (NEAL et al., 2012).

Essa ligação entre *A. brasilense* FP2 e as raízes de milho inoculadas (variedade P30F53) foi detectada a partir do 4.º dia após a inoculação, a partir do qual também foram detectadas diferenças significativas para massa fresca e comprimento da folha e comprimento da raiz principal. Considerando que esses eventos são estimulados, basicamente, pela ação de fitormônios, tais como, auxinas e giberelinas, esses resultados evidenciam a influência de *A. brasilense* FP2 na síntese desses fitormônios, contribuindo para um melhor desenvolvimento da raiz e da parte aérea de plântulas de milho cultivadas *in vitro*.

Experimentos de proteômica foram realizados a fim de detectar as proteínas diferenciais envolvidas na interação planta-bactéria. A análise proteômica comparativa confiável requer metodologia validada (CHENG et al., 2010). O impacto de eletroforese bidimensional (2DE) sobre a repetibilidade do padrão dos *spots* foi investigada comparando a variabilidade entre as triplicatas. Para verificar a variabilidade do gel ou variações experimentais, tais como disparidades na intensidade de coloração ou carregamento do gel, gráficos de dispersão para os *spots* correspondentes foram analisados entre as triplicatas (Tabela 2.1). A variabilidade observada neste estudo, entre os *spots* detectados em géis de replicatas biológicas, realizados a partir de três amostras diferentes foi considerada aceitável, pois os valores de CV encontram-se abaixo de 19%. O CV inerente à técnica de 2DE foi definido na faixa de 20-30%, um valor que é mantido em laboratórios e experimentos (MOLLOY et al., 2003). Entre as 46 proteínas diferencialmente acumuladas de raízes de milho (variedade P30F53) inoculadas com *A. brasilense* FP2, três *spots* foram identificados por EM (Tabela 2.3).

Uma proteína (*spot* 904), com concentração 3,48 vezes maior nas raízes inoculadas, apresentou homologia com uma proteína hipotética ZEAMMB73_607847 de *Zea mays*. Esta proteína foi identificada como sendo homóloga (71% de identidade) ao fator de fusão do gameta masculino em *Arabidopsis* HAP2 (*GCS1*) que é expresso apenas no esperma haplóide e é necessário para a orientação eficaz do tubo polínico para os óvulos. Em *Arabidopsis* a proteína é uma proteína candidata de membrana com um sinal de secreção N-terminal, um único domínio transmembrana e um domínio C-terminal rico em histidina. Está envolvida num mecanismo singular para a fusão de gametas, onde uma primeira proteína espécie-específica se liga às membranas dos gametas masculino e feminino em conjunto, após o que, uma segunda proteína globalmente conservada, quer direta ou indiretamente, causa a fusão das duas membranas juntas. A proteína amplamente conservada é representada por este domínio HAP2-GCS1 conservado a partir de plantas eucariotas inferiores (VON BESSER et al., 2006).

O *spot* 1434 (MW 58 kDa e pI 6,87), com concentração 2,36 vezes maior nas raízes inoculadas, apresentou homologia com uma proteína hipotética de *Oryza sativa* grupo Japonica que apresentou baixa homologia (46% de identidade) com o domínio NB-ARC. O domínio NB-ARC é um motivo de sinalização encontrado em bactérias e eucariotas. Este domínio foi estruturalmente caracterizado na proteína apoptótica humana fator apoptótico 1 ativador de protease (Apaf-1) (VAN DER BIEZEN; JONES, 1998). É um domínio ATPase funcional e ao seu estado

de ligação de nucleotídeos é proposto regular a atividade da proteína de resistência (proteína R) (VAN OOIJEN et al., 2008), que confere especificidade para o sistema imune inato em plantas (TAMELING et al., 2006). Propõe-se que a ligação e hidrólise do ATP por este domínio induza alterações conformacionais da proteína total, levando à formação do apoptossomo (VAN DER BIEZEN; JONES, 1998).

Uma proteína (*spot* 411, MW 47 e pI 6,21), com diminuição de acúmulo em relação ao controle (0,25 vezes) em raízes inoculadas, foi identificada como uma proteína hipotética ZEAMMB73_130777 de *Zea mays* e apresentou homologia (100% de identidade) com a PaaI_tioesterase, uma acil-CoA tioesterase tetramérica, uma das várias proteínas responsáveis pela degradação do ácido fenilacético (PA) em bactérias (DILLON; BATEMAN, 2004). O fenilacetato é uma substância-chave produzida na biodegradação de certos compostos aromáticos, tais como os ácidos n-fenilalcanóicos com um número par de átomos de carbono. A degradação do fenilacetato é catalisada por uma série de enzimas codificadas pelo grupo de genes *paa* (KUNISHIMA et al., 2005). A similaridade de sequência entre PaaI e a cadeia média acil-CoA tioesterase II e III de *E. coli* e a tioesterase humana sugere que todas elas pertencem à mesma superfamília tioesterase (KUNISHIMA et al., 2005). A dobra conservada, presente nessas tioesterases é referida como uma dobra assimétrica, semelhantes às de 4-hidroxibenzoil-CoA-tioesterase (4HBT) e os beta-desidratases hidroxidecanoil-ACP (FabA/FabZ) (LEESONG et al., 1996). De modo geral, as acil-CoA tioesterases atuam no metabolismo de ácidos graxos (DILLON; BATEMAN, 2004).

CONCLUSÃO

A análise dos parâmetros de crescimento mostrou que a variedade P30F53 responde a *A. brasilense* FP2, pois existem diferenças significativas para massa fresca e tamanho da folha; massa fresca e tamanho da raiz principal, número de raízes laterais; massa fresca total das raízes e massa fresca das raízes adventícias. Esses resultados associados ao resultado de estudos anteriores (BRACCINI et al., 2012; HUNGRIA, M. et al., 2010; PICCININ et al., 2013) sugerem que *A. brasilense* FP2 é um ótimo candidato para o desenvolvimento de inoculantes.

Além disso, o estudo ultraestrutural mostrou que *A. brasilense* linhagem FP2 liga-se à superfície da célula, tanto no ápice da raiz como no terço médio, e pode ser encontrado a partir de células individuais até

formando um biofilme, que é uma estrutura de grande importância para o processo de ligação entre as bactérias e as plantas. Essa ligação foi detectada a partir do 4.º dia após a inoculação, a partir do qual também foram detectadas diferenças significativas para massa fresca e comprimento da folha e comprimento da raiz principal. Considerando que esses eventos são estimulados, basicamente, pela ação de fitormônios, tais como, auxinas e giberelinas, esses resultados evidenciam a influência de *A. brasilense* FP2 na síntese desses fitormônios, contribuindo para um melhor desenvolvimento da raiz e da parte aérea de plântulas de milho cultivadas *in vitro*.

Nosso estudo de proteômica revelou 46 proteínas diferencialmente acumuladas de raízes de milho (variedade P30F53) inoculadas com *A. brasilense* FP2 e três proteínas foram identificados por EM. As proteínas identificadas estão envolvidas na orientação do tubo polínico até o óvulo (*spot* 904); no mecanismo de defesa vegetal, a partir da regulação da atividade da proteína R (*spot* 1434); e no metabolismo de ácidos graxos (*spot* 411).

AGRADECIMENTOS

O presente estudo foi apoiado financeiramente pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Fixação Biológica de Nitrogênio, INCT FBN, CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil. ACF é beneficiário de uma bolsa de doutoramento da FAPEMAT - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso, Brasil. Gostaríamos de expressar nossa gratidão ao CEBIME UFSC pelas instalações para a espectrometria de massa, ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, Universidade Federal do Paraná, pelo fornecimento da linhagem *A. brasilense* FP2.

Material suplementar

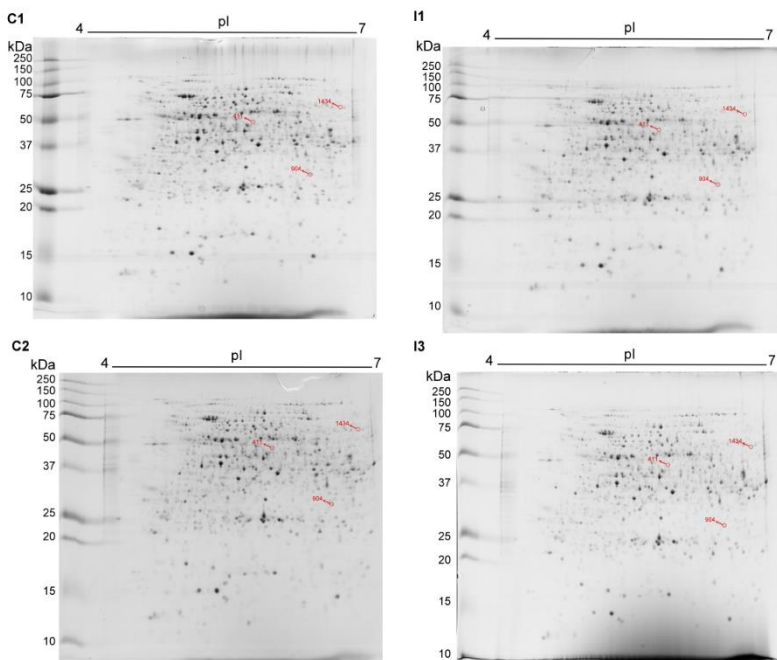


Figura S2.1 – Padrão do proteoma (2DE) da variedade de milho P30F53, géis de raízes controle (C1 e C2) e inoculadas (I1 e I3) com *Azospirillum brasilense* linhagem FP2.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inoculação de sementes de milho da variedade P30F53 com *A. brasilense* FP2 mostrou que diferenças significativas 7 DAI em quase todos os parâmetros analisados, evidenciando a ação de fitormônios (auxinas e giberelinas) nos resultados obtidos e concordando com vários estudos sobre o uso desta bactéria como inoculante em diversas e importantes culturas.

Além disso, os resultados obtidos a partir de qPCR e estudos ultraestruturais, mostram a presença de *A. brasilense* FP2 associado às raízes a partir do 4.º DAI, corroborando com os resultados obtidos para os parâmetros de crescimento, onde as diferenças significativas entre raízes controle e inoculadas surgem a partir do mesmo período de amostragem.

O presente trabalho relata o desenvolvimento de ensaio de qPCR para a quantificação de *A. brasilense* em raízes de plantas. Os iniciadores desenvolvidos apresentando como alvo o gene *nifA* serão úteis para monitorar o crescimento de *Azospirillum brasilense* em culturas. O desenvolvimento de iniciadores para a quantificação de *A. brasilense* nas raízes de plantas por qPCR permitirá avaliar a presença da bactéria na rizosfera e o monitoramento do estabelecimento desta bactéria durante o desenvolvimento das culturas, auxiliando, assim, na compreensão do mecanismo da interação planta-bactéria e, conseqüentemente, os seus efeitos sobre as culturas.

Esses iniciadores poderão, ainda, ser empregados para verificar a qualidade de inoculantes disponíveis usados como forma de reduzir a adubação nitrogenada sem perda de rendimento das culturas.

Segundo Hungria (2011), devido às perdas da fertilização nitrogenada, a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas e o preço médio dos fertilizantes nitrogenados no mercado nacional, o uso de linhagens selecionadas de *A. brasilense* como inoculante, poderá resultar numa economia estimada de US\$ 2 bilhões de dólares por ano e menores danos ao meio ambiente.

A análise proteômica revelou 46 proteínas diferencialmente acumuladas em raízes de milho (variedade P30F53) inoculadas com *A. brasilense* FP2, sendo que, destas, três *spots* foram identificados por espectrometria de massa e apresentaram homologia com proteínas hipotéticas de milho e arroz. Aparentemente, as proteínas hipotéticas identificadas por EM estão relacionadas a processos celulares como sinalização celular, metabolismo de ácidos graxos e mecanismo de defesa contra patógenos. Assim, é necessário a realização de estudos buscando

compreender melhor o mecanismo da interação planta-bactéria e determinar quais linhagens de *A. brasilense* são mais eficientes na promoção do crescimento vegetal, bem como, a melhor forma de inoculação de *A. brasilense* para as diversas culturas de gramíneas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFROZ, A. et al. Plant-bacterium interactions analyzed by proteomics. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. Article 21, p. 18, 2013.
- ALONI, R. et al. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Annals of Botany**, v. 97, n. 5, p. 883-893, MAY 2006.
- ALVES, M. et al. The analysis of *Lupinus albus* root proteome revealed cytoskeleton altered features due to long-term boron deficiency. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 8, p. 1351-1363, Aug 12 2011.
- ANDERSEN, C. et al. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, DEC 27 2006.
- ANDREWS, M.; HODGE, S.; RAVEN, J. Positive plant microbial interactions. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 3, p. 317-320, 2010.
- ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, JAN 2013.
- ARSÈNE, F. et al. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, n. 6, p. 748-757, NOV-DEC 1994.
- BALDANI, J.; BALDANI, V. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 77, n. 3, p. 549-579, SEP 2005.
- BALDANI, J. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, MAY-JUN 1997.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen-nov, sp-nov, a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, JAN 1986.
- BALDE, A. et al. Agronomic performance of no-tillage relay intercropping with maize under smallholder conditions in Central Brazil. **Field Crops Research**, v. 124, n. 2, p. 240-251, NOV 14 2011.
- BALSANELLI, E. et al. *Herbaspirillum seropedicae rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2233-2244, AUG 2010.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.; SPARKS, D. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - A critical assessment. **Advances in Agronomy**, Vol 108, v. 108, p. 77-136, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, FEB 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, AUG 2004.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H.; KLEIN, E. EVIDENCE FOR A WEAK ACTIVE EXTERNAL ADSORPTION OF *AZOSPIRILLUM-BRASIENSE* CD TO WHEAT ROOTS. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 3069-3073, NOV 1986.

BODDEY, R.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 241-250, 1995.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. **Association of *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical Gramineae in non-symbiotic nitrogen fixation and organic matter in the tropics.** 12TH International Congress of Soil Science. KANWAR, J. S. New Delhi, India: Indian Society of Soil Science: 28-48 p. 1982.

BOUFFAUD, M. et al. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? **Molecular Ecology**, v. 21, n. 1, p. 195-206, JAN 2012.

BRACCINI, A. et al. SEED INOCULATION WITH *Azospirillum brasilense*, ASSOCIATED WITH THE USE OF BIOREGULATORS IN MAIZE. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.

BRANDÃO, A.; BARBOSA, H.; ARRUDA, M. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 8, p. 1433-1440, JUN 16 2010.

BROEK, A. V. et al. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 5, p. 592-600, SEP-OCT 1993.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 113-125, JUL 2012.

BURDMAN, S. et al. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology-Uk**, v. 144, p. 1989-1999, Jul 1998.

CAMUS-KULANDAIVELU, L. et al. Maize adaptation to temperate climate: Relationship between population structure and polymorphism in the *Dwarf8* gene. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2449-2463, APR 2006.

CANAS, R. A. et al. Can genetic variability for nitrogen metabolism in the developing ear of maize be exploited to improve yield? **New Phytologist**, v. 194, n. 2, Apr 2012.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. et al. Identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. **European Journal of Soil Biology**, v. 58, p. 45-50, SEP-OCT 2013.

CARRENO-LOPEZ, R. et al. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. **Molecular and General Genetics**, v. 264, n. 4, p. 521-530, NOV 2000.

CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009.

CASTELLEN, P. et al. Structural organization of the *glnBA* region of the *Azospirillum brasilense* genome. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 100-105, 2009.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A New Acid-Tolerant Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, n. 1, p. 23-31, May 1988.

CHENG, Z.; MCCONKEY, B.; GLICK, B. Proteomic studies of plant-bacterial interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1673-1684, OCT 2010.

CHUBATSU, L. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 197-207, JUL 2012.

CIAMPITTI, I.; VYN, T. Physiological perspectives of changes over time in maize yield dependency on nitrogen uptake and associated nitrogen efficiencies: A review. **Field Crops Research**, v. 133, p. 48-67, JUL 11 2012.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Terceiro levantamento - Safra 2013/2014**. Brasília: Observatório Agrícola. 1: 72 p. 2013.

CORBISIER, P. et al. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt176 corn by real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3249-3257, MAY 2 2007.

COSTA, J. et al. Single-Tube Nested Real-Time PCR as a New Highly Sensitive Approach to Trace Hazelnut. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 33, p. 8103-8110, AUG 22 2012.

COUILLEROT, O. et al. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, 2010.

COUILLEROT, O. et al. Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 528-538, 2010.

COUILLEROT, O. et al. Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4639-4649, MAY 2013.

DE-BASHAN, L.; BASHAN, Y. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). **Water Research**, v. 38, n. 19, p. 4222-4246, NOV 2004.

DE SOUZA, R. et al. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p. 585-603, MAY 2013.

DILON, S.; BATEMAN, A. The Hotdog fold: wrapping up a superfamily of thioesterases and dehydratases. **Bmc Bioinformatics**, v. 5, AUG 12 2004.

DINON, A.; BOSCO, K.; ARISI, A. Monitoring of Bt11 and Bt176 genetically modified maize in food sold commercially in Brazil from 2005 to 2007. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1566-1569, JUL 2010.

DINON, A. et al. Primers and Probes Development for Specific PCR Detection of Genetically Modified Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Embrapa 5.1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4672-4677, MAY 9 2012.

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

DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and A-irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, n. 4, p. 284-297, Oct 2002.

DOBBELAERE, S. et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.

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

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesq Agrop Bras** n. 1, p. 357-365, 1966.

_____. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 5, p. 310-313, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí, RJ: EMBRAPA - SPI, 1995. 60 ISBN 85-85007-65-6.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In: STEWART, W. P. D. (Ed.). **Nitrogen fixation by free-living micro-organisms**: Cambridge: Cambridge University Press, 1975. p.39-56.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de Beijerinckia. **Revista de biologia**, v. 1, p. 261-272, 1958.

DODD, I. C. et al. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 3, p. 361-379, 2010.

DOS REIS, F. et al. Inoculation of *Azospirillum amazonense* in two maize genotypes under different N treatments. **Revista Brasileira De Ciencia Do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, MAY-JUN 2008.

DOS SANTOS, M. F. et al. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 917-931, Mar 10 2010.

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

EL ZEMRANY, H. et al. Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1712-1726, JUL 2006.

ESPÍNDULA, E. **Expressão diferencial de genes de plântulas de milho inoculadas com *Azospirillum brasilense* FP2 e quantificação de DNA bacteriano por qPCR.** 2013. 137 (Master). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

FADEL-PICHETH, C. et al. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **Fems Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281-288, OCT 15 1999.

FALEIRO, A. et al. Real time PCR detection targeting *nifA* gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125-133, Nov 01 2013.

FALLIK, E.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 511-515, SEP 1996.

FASOLI, E. et al. Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 501-510, APR 13 2009.

FEUILLET, C.; EVERSOLE, K. Solving the Maze. **Science**, v. 326, n. 5956, p. 1071-1072, NOV 20 2009.

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

FIGUEIREDO, M. D. V. B. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. v. 18, p. 21-43, 2010.

GALVAN, J. et al. Studies of variability in Holm oak (*Quercus ilex* subsp ballota [Desf.] Samp.) through acorn protein profile analysis. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 8, p. 1244-1255, AUG 12 2011.

GOMES, D. F. et al. Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: identification of conserved and specific responses to heat stress. **Bmc Microbiology**, v. 12, May 30 2012.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, DEC 2004.

GUERRERO-MOLINA, M.; WINIK, B.; PEDRAZA, R. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 205-212, OCT 2012.

- GUTIERREZ-LUNA, F. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. **Symbiosis**, v. 51, n. 1, p. 75-83, JUL 2010.
- HARWOOD, C.; RIVELLI, M.; ORNSTON, L. AROMATIC-ACIDS ARE CHEMOATTRACTANTS FOR *PSEUDOMONAS-PUTIDA*. **Journal of Bacteriology**, v. 160, n. 2, p. 622-628, 1984.
- HOLGUIN, G.; PATTEN, C.; GLICK, B. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 1, p. 10-23, APR 1999.
- HORRIDGE, G.; TAMM, S. CRITICAL POINT DRYING FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF CILIARY MOTION. **Science**, v. 163, n. 3869, p. 817-&, 1969.
- HUERGO, L. et al. P-II signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology-Sgm**, v. 158, p. 176-190, JAN 2012 2012.
- HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **Fems Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 251-283, Mar 2013.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina - PR: Embrapa Soja. 325: 36 p. 2011.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.
- IDRIS, E. et al. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 619-626, JUN 2007.
- IKEDA, A. et al. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 154-160, JAN 2013.
- INABA, J. et al. *Azospirillum brasilense* P-II proteins GlnB and GlnZ do not form heterotrimers and GlnB shows a unique trimeric uridylylation pattern. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 94-99, JAN-FEB 2009.
- IRAR, S. et al. Proteomic analysis of wheat embryos with 2-DE and liquid-phase chromatography (ProteomeLab PF-2D) - A wider perspective of the proteome. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1707-1721, AUG 5 2010.

JIANG, L. et al. International Collaborative Study of the Endogenous Reference Gene, Sucrose Phosphate Synthase (SPS), Used for Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3525-3532, MAY 13 2009.

KANEKO, T. et al. Complete Genomic Structure of the Cultivated Rice Endophyte *Azospirillum* sp B510. **DNA Research**, v. 17, n. 1, p. 37-50, 2010.

KARTHIKEYAN, B. et al. ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. **Symbiosis**, v. 56, n. 2, p. 77-86, MAY 2012.

KATSY, E. I.; PRILPOV, A. G. Mobile elements of an *Azospirillum brasilense* Sp245 85-MDa plasmid involved in replicon fusions. **Plasmid**, v. 62, n. 1, p. 22-9, Jul 2009.

KATUPITIYA, S. et al. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen-fixation in association with wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1987-1995, MAY 1995.

KENNEDY, I.; CHOUDHURY, A.; KECSKES, M. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1229-1244, AUG 2004.

KHAMMAS, K. M. et al. *Azospirillum-irakense* sp-nov - A nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, n. 9, p. 679-693, 1989.

KLASSEN, G. et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 887-891, SEP 1997.

KNIEF, C.; DELMOTTE, N.; VORHOLT, J. Bacterial adaptation to life in association with plants - A proteomic perspective from culture to in situ conditions. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3086-3105, AUG 2011.

KUNISHIMA, N. et al. A novel induced-fit reaction mechanism of asymmetric hot dog thioesterase PaaI. **Journal of Molecular Biology**, v. 352, n. 1, p. 212-228, SEP 9 2005.

LEESONG, M. et al. Structure of a dehydratase-isomerase from the bacterial pathway for biosynthesis of unsaturated fatty acids: Two catalytic activities in one active site. **Structure**, v. 4, n. 3, p. 253-264, MAR 15 1996.

- LERNER, A. et al. The *Azospirillum brasilense* Sp7 noeJ and noeL genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis. **Microbiology-Sgm**, v. 155, p. 4058-4068, 2009.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y. ACTIVE ATTACHMENT OF *AZOSPIRILLUM-BRASILENSE* TO ROOT SURFACE OF NON-CEREAL PLANTS AND TO SAND PARTICLES. **Plant and Soil**, v. 137, n. 1, p. 91-97, NOV 1991.
- LI, H. et al. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression related to cell chemotactic and encystment of *Azospirillum brasilense*. **Microbiol Res**, v. 166, n. 8, p. 595-605, Dec 20 2011.
- LI, J. et al. Identification of plant growth-promoting bacteria-responsive proteins in cucumber roots under hypoxic stress using a proteomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 84, p. 119-131, Jun 12 2013.
- LIN, S. Y.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 4, p. 837-44, May 2011.
- LUCANGELI, C.; BOTTINI, R. Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L) treated with uniconazole. **Symbiosis**, v. 23, n. 1, p. 63-71, 1997.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.
- LUQUE-ALMAGRO, V. et al. Bacterial nitrate assimilation: gene distribution and regulation. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, p. 1838-1843, DEC 2011 2011.
- MASCIARELLI, O. et al. Alternative Mechanism for the Evaluation of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production by *Azospirillum brasilense* Strains and Its Effects on the Germination and Growth of Maize Seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590-597, OCT 2013.
- MATHESIUS, U. Comparative proteomic studies of root-microbe interactions. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 353-366, APR 13 2009.
- MEHNAZ, S. et al. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1848-1856, OCT 2010.
- MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 41, n. 11, p. 1681-1685, 2006.

MERCADO-BLANCO, J.; PRIETO, P. Bacterial endophytes and root hairs. **Plant and Soil**, v. 361, n. 1-2, p. 301-306, DEC 2012.

MOLINA-FAVERO, C. et al. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 7, p. 1001-1009, JUL 2008.

MOLLOY, M. P. et al. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. **Proteomics**, v. 3, n. 10, p. 1912-1919, Oct 2003.

MONTAÑEZ, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21-28, 2012.

MONTEIRO, R. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, JUL 2012.

MOREIRA, F. M. D. S. et al. Bactérias Diazotróficas Associativas - Diversidade, Ecologia e Potencial de Aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MORGAN, J. A. W.; BENDING, G. D.; WHITE, P. J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1729-1739, Jul 2005.

NEAL, A. et al. Benzoxazinoids in Root Exudates of Maize Attract *Pseudomonas putida* to the Rhizosphere. **Plos One**, v. 7, n. 4, APR 24 2012.

NESTLER, J.; SCHUTZ, W.; HOCHHOLDINGER, F. Conserved and Unique Features of the Maize (*Zea mays* L.) Root Hair Proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 5, p. 2525-2537, MAY 2011.

OKON, Y.; HEYTLER, P.; HARDY, R. N₂-FIXATION BY *AZOSPIRILLUM-BRASIENSE* AND ITS INCORPORATION INTO HOST *SETARIA-ITALICA*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 694-697, 1983.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum* - an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, DEC 1994.

OKUMURA, R. et al. Influence of different nitrogen levels on growth and production parameters in maize plants. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 9, n. 3-4, p. 510-514, JUL-OCT 2011.

PARALES, R.; HARWOOD, C. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 266-273, JUN 2002.

PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J. Light-microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 734-742, 1978.

PEANO, C. et al. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and Non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 6962-6968, NOV 17 2004.

PEDRAZA, R. O. et al. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 36-43, 2009.

PEDROSA, F. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **Plos Genetics**, v. 7, n. 5, MAY 2011.

PEDROSA, F.; YATES, M. REGULATION OF NITROGEN-FIXATION (NIF) GENES OF *AZOSPIRILLUM-BRASIENSE* BY NIFA AND NTR (GLN) TYPE GENE-PRODUCTS. **Fems Microbiology Letters**, v. 23, n. 1, p. 95-101, 1984.

PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 75, n. 5, p. 1143-50, Jul 2007.

PICCININ, G. et al. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 393-397, MAY 2013.

PICCOLI, P. et al. Hydrolysis of [17,17-H-2(2)]gibberellin A(20) glucoside and [17,17-H-2(2)]gibberellin A(20) glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in a nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. **Plant Growth Regulation**, v. 23, n. 3, p. 179-182, NOV 1997.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**: ed. Cambridge: Cambridge University Press 1982.

PRINZI, B. et al. Evaluation of protein pattern changes in roots and leaves of *Zea mays* plants in response to nitrate availability by two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Bmc Plant Biology**, v. 9, AUG 23 2009.

RADWAN, T.; MOHAMED, Z.; REIS, V. Effect of inoculation with *Azospirillum* and *Herbaspirillum* on production of indolic compounds and growth of wheat and rice seedlings. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987-994, OCT 2004.

RAJ, M. et al. Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid, Sensitive Detection, and Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing Greater Yam Anthracnose. **Molecular Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 277-284, NOV 2012.

RAJENDRAN, C. et al. Crystal structure of the GlnZ-DraG complex reveals a different form of P-II-target interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 47, p. 18972-18976, NOV 22 2011.

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, MAR 2004.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Curr Opin Plant Biol**, v. 14, n. 4, p. 435-43, Aug 2011.

REINHOLD, B. et al. *Azospirillum-halopraeferens* sp-nov, a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa-fusca* (L) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 1, p. 43-51, JAN 1987.

RESTOVICH, S.; ANDRIULO, A.; PORTELA, S. Introduction of cover crops in a maize-soybean rotation of the Humid Pampas: Effect on nitrogen and water dynamics. **Field Crops Research**, v. 128, p. 62-70, MAR 14 2012.

ROESCH, L. F. W. et al. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1377-1383, 2007.

RONCATO-MACCARI, L. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **Fems Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, JUL 1 2003.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 2011, n. LSMR-21, 20, p. 1-30, 2011.

SANT'ANNA, F. et al. Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. **Bmc Genomics**, v. 12, AUG 12 2011.

SAUBIDET, M.; FATTA, N.; BARNEIX, A. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 2, p. 215-222, AUG 2002.

SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, v. 25, n. 1-3, p. 159-179, 1998.

SHIME-HATTORI, A. et al. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. **J Appl Microbiol**, v. 111, n. 4, p. 915-24, Oct 2011.

SPEROTTO, R. et al. The electron transfer flavoprotein fzxABCX gene products from *Azospirillum brasilense* show a NifA-dependent promoter regulation. **Current Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 267-273, OCT 2004.

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

SUJEETH, N. et al. Characterization of a hydroxyproline-rich glycoprotein in pearl millet and its differential expression in response to the downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 2, p. 779-791, MAR 2012.

SUMNER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Adv. Soil Sci.**, v. 12, p. 53-123, 1990.

TAMELING, W. et al. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. **Plant Physiology**, v. 140, n. 4, p. 1233-1245, APR 2006.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. Taxonomic study of *Spirillum-lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen-nov and 2 species, *Azospirillum-lipoferum* (beijerinck) comb nov and *Azospirillum-brasilense* sp-nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.

TILMAN, D. et al. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, n. 5515, p. 281-284, APR 13 2001 2001.

VAN DER BIEZEN, E.; JONES, J. The NB-ARC domain: A novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current Biology**, v. 8, n. 7, p. R226-R227, MAR 26 1998.

VAN OOIJEN, G. et al. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 6, p. 1383-1397, APR 2008.

VARGAS, L. et al. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012.

VERMA, J. P. et al. Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production. **International Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 11, p. 954-983, 2010.

VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, AUG 2003.

VIDEIRA, S. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 51-66, JUL 2012.

VOLFSON, V. et al. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 67, p. 255-262, Dec 2013.

VON BESSER, K. et al. *Arabidopsis* HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. **Development**, v. 133, n. 23, p. 4761-4769, DEC 1 2006.

WALKER, V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, v. 189, n. 2, p. 494-506, 2011.

WALKER, V. et al. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 151-163, JUL 2012.

WISNIEWSKI-DYE, F. et al. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 12, DEC 2011.

WU, L. et al. Comparative Proteomic Analysis of the Effects of Salicylic Acid and Abscisic Acid on Maize (*Zea mays* L.) Leaves. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 3, p. 507-516, JUN 2013.

XU, S. et al. Proteome analysis of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 8, p. 1660-1670, Aug 2013.

YANG, T. et al. Plant symbionts: keys to the phytosphere. **Symbiosis**, v. 59, n. 1, p. 1-14, JAN 2013.

ZEL, J. et al. Method Validation and Quality Management in the Flexible Scope of Accreditation: An Example of Laboratories Testing for Genetically Modified Organisms. **Food Analytical Methods**, v. 1, n. 2, p. 61-72, JUN 2008.

ZOU, X. X. et al. Identification and functional characterization of NifA variants that are independent of GlnB activation in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology-Sgm**, v. 154, p. 2689-2699, Sep 2008.