

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Análise proteômica de estirpes selvagem PAL5
e mutante *lao*⁻ de *Gluconacetobacter*
diazotrophicus na presença e ausência de
triptofano e o efeito de sua inoculação em
plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.**

Patrícia Gonçalves Galvão

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE ESTIRPES SELVAGEM PAL5^T E
MUTANTE LAO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* NA PRESENÇA E
AUSÊNCIA DE TRIPTOFANO E O EFEITO DE SUA INOCULAÇÃO
EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.**

PATRÍCIA GONÇALVES GALVÃO

Sob a Orientação do pesquisador

José Ivo Baldani

e Co-orientação da pesquisadora

Marcia Soares Vidal

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Fitotecnia

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2012

633.61

G182a

T

Galvão, Patrícia Gonçalves, 1984-

Análise proteômica de estirpes selvagem PAL5^T e mutante lao⁻ de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença e ausência de triptofano e o efeito de sua inoculação em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar / Patrícia Gonçalves Galvão - 2012.

147 f.: il.

Orientador: José Ivo Baldani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Bibliografia: f. 113-136.

1. Cana-de-açúcar - Inoculação - Teses. 2. Plantas - Proteínas - Teses. 3. Proteínas - Análise - Teses. I. Baldani, José Ivo, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

PATRÍCIA GONÇALVES GALVÃO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

TESE APROVADA EM 01/03/2012

José Ivo Baldani - Ph.D. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Leonardo Oliveira Médici - Dr. UFRRJ

Adriana Silva Hemerly - Ph.D. UFRJ

Kátia Regina dos Santos Teixeira - Dra. Embrapa Agrobiologia

Segundo Urquiaga - Dr. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

A minha mãe Isabel, meus irmãos Lucas e Carine, e meu “grudinho” Jorge,
Ofereço!

Aos meus vovôs maravilhosos: grande “Seu Manél” e fofa Dona Fernanda,
Dedico!

**“Todos tentam realizar algo grandioso, sem reparar que a vida se compõe de coisas
pequenas!”**
Frank Clark

“Deixa a chuva cair, que o bom tempo há de vir.”
Zeca Pagodinho e Almir Guineto

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me permitir senti-lo ao meu lado, me guiando através do melhor caminho.

À Santa Clara e todos os guias espirituais que me acompanham, agradeço pela presença de sempre!

À minha mãe Isabel não encontro nem palavras pra agradecer. Agradecer por tudo é sempre muito *cliché*... mas é a pura verdade.

Ao meu pai pelas boas lembranças.

Aos meus irmãos Lucas e Carine, “azeitonas da minha empada”!

Vovó Fernanda e vovô Manuel, obrigada por terem sido muito mais do que lindas inspirações, principalmente meu vovô por todo o exemplo de vida! Dizer que amo vocês é pouco! Este trabalho é inteiramente dedicado a este casal!

Ao meu marido, meu grudinho Jorge por ter “segurado a onda” durante esses meses complicados! Agora poderemos “curtir nosso casório”! Amo-te!

Aos meus sogros Sonia e Jorge e cunhados Bárbara, Léo e Gustavo, obrigada pelas palavras de apoio sempre.

Ao meu orientador Dr. José Ivo Baldani, agradeço por ter confiado em mim quando eu só era uma estudante recém-chegada à Universidade e que trabalhava com passarinhos... já se foram muitos anos desde então e eu tenho muito a agradecer. Obrigada pela confiança, paciência e compreensão. Espero não ter decepcionado.

À minha orientadora Dra. Marcinha Vidal faltariam páginas pra agradecer o suficiente! Sua fé em mim e na minha pesquisa sempre me comoveu. Espero fazer por merecer os seus elogios de sempre e contar com essa parceria que se tornou uma bonita amizade. Obrigada por ter feito parte desse desafio na minha vida.

À Dra. Katia Teixeira, agradeço por ter me acompanhado durante todo o trabalho envolvendo a assustadora proteômica. Começar um trabalho com os olhos vendados se torna bem mais fácil quando temos ajuda no percurso. Sua experiência foi fundamental. Obrigada.

Ao Dr. Segundo Urquiaga, muito obrigada por toda a ajuda com os experimentos de inoculação em casa de vegetação. Entender o quão desconhecido e difícil este mundo agrônômico foi para esta bióloga ajudou a quebrar muitas barreiras internas. É uma honra conhecê-lo e ter trabalhado com o senhor!

À Dra. Adriana Hemerly, agradeço por ter me recebido diversas vezes em seu Laboratório de Biologia Molecular de Plantas. Agradeço a sua equipe de estudantes, em especial Thais Louise, pela troca de experiências.

Ao Dr. Luciano Huergo e aos colegas Rômulo, Jefferson, Claudinha, Cibele e Cris agradeço pela recepção na UFPR. Um agradecimento especial ao Fabio Cordeiro por ter dedicado o seu tempo, conhecimento e prática em me ajudar a trazer resultados pra casa. Não canso de agradecer.

Às amigas analistas Patrícia Gitahy e Aline Vieira agradeço não só pela ajuda profissional, mas também por terem me permitido invadir suas vidas com minha personalidade exagerada. A amizade de vocês é algo que vale muito a pena. Pat, você sempre será minha mãe molecular!

Aos amigos-irmãos Sandy e Péricles nem sei o que dizer. Vocês sabem o quão importantes são para mim e o quanto contribuíram para essa conquista. Obrigada por cada pedacinho de vocês nesse trabalho!

Aos amigos do laboratório de genética e bioquímica agradeço por terem tornado meus dias mais agradáveis: German, Leona, Paulo, Vivi, Helma, Mauro, Esdras, Leonardo, Jéssica, Paulinha, Anita, Cleiton, Rodrigo, Aninha, Marcela, Juliana, Vanessa, Dr. Jean e Dr. Stefan.

Aos amigos Carlos, Ana Paula e Celeste agradeço, principalmente, o auxílio com as análises estatísticas deste trabalho, mas os agradecimentos vão muito mais além...

Ao Geraldo Baêta, a pessoa mais solícita que já conheci e a todos os funcionários da Embrapa Agrobiologia, em especial Sr. Claudinho, Luiz Carlos, Wilson, Lucio, Mazinho, Carlinhos, Leandro, Naldo, Monalisa, Giselle, Tatiana, Ernani e Dr. Luc.

A Embrapa Agrobiologia, por toda a estrutura de trabalho.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela formação acadêmica.

Ao Curso de Pós-graduação em Agronomia - Fitotecnia, pela oportunidade e formação.

A CAPES, pela bolsa e auxílio financeiro.

A todos que, de alguma forma, colaboraram com este trabalho.

Agradeço!

“Só posso levantar as mãos pro céu, agradecer e ser fiel ao destino que Deus me deu. / Se não tenho tudo que preciso, com o que tenho, vivo e de mansinho lá vou eu... / Se a coisa não sai do jeito que eu quero também não me desespero, o negócio é deixar rolar. / E aos trancos e barrancos, lá vou eu! / E sou feliz e agradeço por tudo que Deus me deu. / Deixa a vida me levar, vida leva eu...” (Serginho Meriti e Eri do Cais)

BIOGRAFIA

Patrícia Gonçalves Galvão nasceu aos 26 dias do mês de outubro de 1984, no município de Duque de Caxias, no estado do Rio de Janeiro. Filha de Carlos Marcio Xavier Galvão e Isabel Cristina Gonçalves Galvão, concluiu em 2000, o ensino médio no Colégio Santa Maria. Em 2001, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde foi bolsista de iniciação científica do CNPq de agosto de 2004 a fevereiro de 2006, quando obteve a titulação de licenciada em Ciências Biológicas. Em fevereiro de 2008, obteve pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), o título de Mestre em Biotecnologia Vegetal. No mês de março do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado na UFRRJ, junto ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, desenvolvendo as análises experimentais na Embrapa Agrobiologia-CNPAB, sob orientação do Dr.^a José Ivo Baldani e da Dra. Marcia Soares Vidal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes processos de colonização da raiz. As bactérias endofíticas formam microcolônias na superfície das raízes e podem penetrá-las através de ferimentos naturais ou de rachaduras que se formam na coifa ou em locais de emergência das raízes laterais (esquema de Patrícia Galvão e Péricles Galisa, adaptado de HARDOIM et al., 2008).	21
Figura 2: Diferentes formas de promoção do crescimento vegetal. As bactérias em associação com as plantas podem promover o crescimento vegetal (1) através do aumento da disponibilidade de elementos para o vegetal, como por exemplo, o nitrogênio atmosférico através da fixação biológica, e Fe e P através da solubilização desses nutrientes antes indisponíveis para a planta; (2) através da produção de fitormônios, como auxinas, citocininas e giberelinas; ou (3) através da atividade da ACC deaminase que reduz os níveis de etileno induzidos por estresse. As bactérias também podem beneficiar as plantas indiretamente, competindo com patógenos e reduzindo seu crescimento e/ou atividade (esquema de Patrícia Galvão e Péricles Galisa, adaptado de WEYENS et al., 2009).	23
Figura 3: Provável rota biossintética do etileno em plantas e a ação da enzima ACC deaminase de bactérias (adaptado de TAIZ e ZEIGER, 2009).	29
Figura 4: Estrutura química de duas auxinas naturais (adaptado de Taiz e Zeiger, 2009).	31
Figura 5: Estrutura química de duas auxinas sintéticas (adaptado de Taiz e Zeiger, 2009). ...	31
Figura 6: Via de biossíntese dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina. (Fonte: http://www.genome.jp/kegg)	32
Figura 7: Contexto genômico dos genes <i>trp</i> em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 (Representação esquemática de Patrícia Galvão).....	34
Figura 8: Via de biossíntese do triptofano (Representação esquemática de Patrícia Galvão, adaptado de Pittard, 1996).....	35
Figura 9: Prováveis rotas biossintéticas de AIA em bactérias (Representação esquemática de Patrícia Galvão adaptada de FU e WANG, 2011).	38
Figura 10: Representação esquemática da via da Indol-3-acetamida (Representação esquemática de Patrícia Galvão baseada no KEGG).	39
Figura 11: Representação esquemática da via da Indol-3-piruvato (Representação esquemática de Patrícia Galvão baseada no KEGG).	39
Figura 12: Representação esquemática da via da Triptamina (Representação esquemática de Patrícia Galvão baseada no KEGG).....	40

Figura 13: Representação esquemática da via da Indol-3-acetaldoxina (Representação esquemática de Patrícia Galvão baseada no KEGG).	40
Figura 14: Representação esquemática da primeira dimensão da eletroforese bidimensional. Neste esquema vê-se a focalização isoelétrica de uma mistura de proteínas que se distribuem em cinco grupos de ponto isoelétrico diferentes, representados pelas cores: roxa, amarela, laranja, verde e azul; No início da focalização, ocorre a migração das proteínas para o pólo negativo (catodo) e para o pólo positivo (anodo) segundo suas cargas até que as proteínas encontrem o pH no qual as suas cargas se tornam nulas - o pI (Representação esquemática de Patrícia Galvão, adaptada de Dos Santos, 2008).	50
Figura 15: Representação esquemática da segunda dimensão da eletroforese bidimensional. Após a primeira dimensão, a tira de IPG é disposta sobre o gel de SDS – PAGE onde ocorre a separação por volume molecular das proteínas (Representação esquemática de Patrícia Galvão, adaptada de Dos Santos, 2008).....	51
Figura 16: Gel de SDS-PAGE contendo o perfil protéico de uma réplica biológica de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 e uma da mutante <i>lao⁻</i> , cultivadas na ausência de triptofano (colunas 1 - 3 e 7 – 9) e na presença de 100 ug.ml ⁻¹ de triptofano (colunas 4 - 6 e 10 – 12). As colunas consecutivas de cada tratamento três réplicas técnicas contendo 50ug de proteínas. M: Marcador de Peso Molecular - BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Cat. No. 10747-012; Lot. 845065).....	59
Figura 17: Gel de 2DE-PAGE com tiras na faixa de pH de 3 a 10 revelando o perfil protéico de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 cultivada em meio LGI-P na ausência de triptofano (A) e na presença de 100 ug.ml ⁻¹ de triptofano (B), e de <i>G. diazotrophicus</i> <i>lao⁻</i> cultivada em meio LGI-P na ausência de triptofano (C) e na presença de 100 ug.ml ⁻¹ de triptofano (D).....	60
Figura 18: Gel de 2DE-PAGE com tiras na faixa de pH de 4 a 7 revelando o perfil protéico de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 cultivada em meio LGI-P na ausência de triptofano (A) e na presença de 100 ug.ml ⁻¹ de triptofano (B), e de <i>G. diazotrophicus</i> <i>lao⁻</i> cultivada em meio LGI-P na ausência de triptofano (C) e na presença de 100 ug.ml ⁻¹ de triptofano (D).	61
Figura 19: Mapa 2DE contendo proteínas extraídas de 3 replicatas biológicas de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano (imagens A a C) e cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml ⁻¹ de triptofano (D a F). Os <i>spots</i> das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos estão numerados: superóxido dismutase (nº 9), pré-proteína translocase subunidade SecB (nº 17), Catalase (nº 69), proteína do tipo álcool desidrogenase <i>Zinc-type</i> (nº 70), fosfopiruvato hidratase (nº 73), Protease de Serina (nº 84), co-chaperonina GroES (nº 127), proteína G de biossíntese de	

glucano (n° 134), F0F1 ATP synthase subunit beta (n° 136), *trigger factor* (n° 146), HlyD family secretion protein (n° 149), chaperonina GroEL (n° 143, 145, 152 e 154)..... 62

Figura 20: Distribuição das proteínas diferencialmente expressas em *G. diazotrophicus* PAL5 de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual. 65

Figura 21: Ampliação de seis regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em LGI-P com 100 ug.ml⁻¹ de triptofano (PCT) quando comparadas com *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em LGI-P sem acréscimo de triptofano (PST). Em (A) é possível observar as isoformas da chaperonina GroEL enquanto que em (B) observa-se co-chaperonina GroES (n° 127) e a superóxido dismutase (n° 9). Já na imagem (C) pode-se observar uma proteína G de biossíntese de glucano (n° 134) e uma proteína F0F1 ATP sintase subunidade beta (n° 136). Na figura (D) é possível observar uma proteína secretora da família HlyD (n° 149) enquanto que na figura (E) observa-se uma catalase (n° 69), uma proteína do tipo álcool desidrogenase *Zinc-type* (n° 70) uma protease de serina (n° 84). Em (F) é possível observar uma pré-proteína translocase subunidade SecB (n° 17). 66

Figura 22: Distribuição das proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* PAL5 após a adição de triptofano no meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual..... 67

Figura 23: Distribuição das proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* PAL5 após a adição de triptofano no meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual..... 68

Figura 24: Ampliação de duas regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em LGI-P com 100 ug.ml⁻¹ de triptofano (PCT) quando comparadas com *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em LGI-P sem acréscimo de triptofano (PST). Em (A) observa-se uma fosfopiruvato hidratase (n° 73) enquanto que em (B) é possível observar um *trigger factor* (n° 146). 68

Figura 25: Mapa 2DE contendo proteínas extraídas de 3 replicatas biológicas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* lao⁻ cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano (imagens A a C) e cultivada em meio LBI-P acrescido de 100 ug.ml⁻¹ de triptofano (D a F). Os *spots* das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos estão numerados: superóxido dismutase (n° 67), proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (n° 70), alcanal

monooxigenase (n° 71), ribose-5-fosfato isomerase A (n° 76), succinato-CoA ligase (formadora de GDP) (n° 78), 2,3,4,5-tetrahidropiridina 2,6-carboxilato N-succiniltransferase (n° 82), oxidoreductase (n° 95), proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 100, 132 e 135), gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (n° 111) peroxiredoxina (n° 161), pirofosfatase inorgânica (n° 174), aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (n° 197). 69

Figura 26: Distribuição das proteínas diferencialmente expressas em *G. diazotrophicus* lao^- cultivada em meio LGI-P com adição de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual..... 72

Figura 27: Distribuição das proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* lao^- após a adição de triptofano no meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual..... 73

Figura 28: Ampliação de quatro regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* lao^- cultivada em LGI-P com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (LCT) quando comparadas com *G. diazotrophicus* lao^- cultivada em LGI-P sem acréscimo de triptofano (LST). Em (A) é possível observar a pirofosfatase inorgânica (n° 174) enquanto que em (B) observa-se uma isoforma da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 100). Já na imagem (C) pode-se observar uma superóxido dismutase (n° 67) e uma ribose-5-fosfato isomerase A. Na figura (D) é possível observar outra isoforma da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 132). 73

Figura 29: Distribuição das proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* lao^- após a adição de triptofano no meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual..... 74

Figura 30: Ampliação de quatro regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* lao^- cultivada em LGI-P com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (LCT) quando comparadas com *G. diazotrophicus* lao^- cultivada em LGI-P sem acréscimo de triptofano (LST). Em (A) é possível observar uma peroxiredoxina (n° 161) enquanto que em (B) observa-se uma proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (n° 70) e uma alcanal monooxigenase (n° 71). Na imagem (C) pode-se observar uma succinato-CoA ligase (formadora de GDP) (n° 78) e 2,3,4,5-tetrahidropiridina 2,6-carboxilato N-succiniltransferase (n° 82). Já na figura (D) é possível observar gliceraldeido-3-fosfato

desidrogenase (n° 111) e uma aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (n° 197).

..... 74

Figura 31: Mapa 2DE contendo proteínas extraídas de 1 replicata biológica de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (A) e *lao*⁻ (B) cultivada em meio LGI-P. Os spots das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos estão numerados: fator de alongação da transcrição (n° 0), lipoproteína de membrana externa (n° 3), ribose-5-fosfato isomerase A (n° 13), proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (n° 35), alcanal monooxigenase (n° 38), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (n°41), isoformas da chaperonina GroEL (n° 62, 71, 122), 6-fosfogluconolactonase (n° 73), succinato-CoA ligase (n° 77), oxidoreductase (n° 89), isoformas da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 90 e 93), fosfopiruvato hidratase (n° 120), superóxido dismutase (n° 134) e uma proteína hipotética (n° 148)..... 75

Figura 32: Distribuição das proteínas diferencialmente expressas em *G. diazotrophicus* *lao*⁻ cultivada em meio LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual. 78

Figura 33: Distribuição das proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* *lao*⁻ em meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual. 79

Figura 34: Ampliação de duas regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* *lao*⁻ quando comparadas com a estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus*. Em (A) é possível observar a lipoproteína de membrana externa (n° 3), a superóxido dismutase (n° 134) e uma proteína hipotética (n° 148) enquanto que em (B) observa-se uma ribose-5-fosfato isomerase A (n° 13), oxidoreductase (n° 89) e duas isoformas da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 90 e 93). 79

Figura 35: Distribuição das proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* *lao*⁻ em meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual. 80

Figura 36: Ampliação de três regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* *lao*⁻ quando comparadas com a estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus*. Em (A) é possível observar a proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (n° 35), a alcanal monooxigenase (n° 38), o gliceraldeído-3-

fosfato desidrogenase (n°41), o succinato-CoA ligase (n° 77) e duas isoformas da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 90 e 93). Já em (B) observa-se uma fosfopiruvato hidratase (n° 120) e três isoformas da chaperonina GroEL (n° 62, 71, 122), enquanto que em (C) é possível observar o fator de alongação da transcrição (n° 0) e o 6-fosfogluconolactonase (n° 73).....	81
Figura 37: Plântulas de arroz crescidas em tubos de vidro com solução de Hoagland (Foto: Patrícia Galvão).	94
Figura 38: Plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas: (A) repicadas em câmara de fluxo laminar, (B) individualizadas, (C) em frascos de vidro com meio de cultivo MS em fase de enraizamento e (D) contendo folhas e raízes em abundância para a inoculação da bactéria. (Fotos: Patrícia Galvão)	95
Figura 39: Plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas cultivadas em condição de hidroponia (Foto: Patrícia Galvão)	96
Figura 40: Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar em bandejas de isopor do tipo plantágil. (A): Plântulas não-inoculadas; Plântulas inoculadas sete dias após a inoculação com (B): <i>G. diazotrophicus</i> estirpe selvagem PAL5; (C): <i>G. diazotrophicus</i> estirpe mutante MAd3A; D: <i>G. diazotrophicus</i> estirpe mutante lao ⁻ (Fotos: Patrícia Galvão).	97
Figura 41: Plantas de cana-de-açúcar não-inoculadas e inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> crescidas em vasos contendo 5 Kg de substrato areia:vermiculita. (Fotos: Patrícia Galvão). .	97
Figura 42: Coleta do experimento 120 DAI. (A) Plantas adultas de cana-de-açúcar sendo retiradas dos vasos, (B) Separação das folhas de uma planta de cana-de-açúcar e (C) Raízes sendo cuidadosamente lavadas para retirar o excesso de substrato.....	99
Figura 43: Pesos frescos das plântulas de arroz não inoculadas (controle) e inoculadas com diferentes concentrações de <i>G. diazotrophicus</i> . As médias foram obtidas de dez repetições de cada tratamento. As letras representam médias que diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.	100
Figura 44: Microscopia óptica de raízes de plântulas de arroz (A) não inoculadas e inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> nas concentrações de (B) 10 ⁴ UFC.ml ⁻¹ , (C) 10 ⁵ UFC.ml ⁻¹ , (D) 10 ⁶ UFC.ml ⁻¹ , (E)10 ⁷ UFC.ml ⁻¹ e (F) 10 ⁸ UFC.ml ⁻¹ . (Fotos de Patrícia Galvão).....	102
Figura 45: Plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas coletadas 3 DAI e que foram inoculadas com a estirpe selvagem e mutante de <i>G. diazotrophicus</i> . (Foto: Patrícia Galvão)	104
Figura 46: (A) Formação de película característica de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 e lao ⁻ em meio LGI-P semi-sólido a partir de plantas coletadas 7 DAI (B) Formação de colônias	

características de <i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻ , em meio LGI-P sólido a partir de plantas coletadas 7 DAI. (Fotos: Patrícia Galvão).....	105
Figura 47: Foto das raízes das plantas não-inoculadas e inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> PAL5, nif ⁻ e lao ⁻ adubados com 60 kg N.ha ⁻¹ ou 120 kg N.ha ⁻¹ (Foto: Patrícia Galvão).....	106
Figura 48: Biomassa seca das plantas de cana-de-açúcar controle e inoculadas com diferentes estirpes de <i>G. diazotrophicus</i> coletadas 120 dias após inoculação e adubadas com 60 ou 120 kg.ha ⁻¹ de sulfato de amônia marcado com 0,5% de N ¹⁵ em excesso. As letras representam médias que diferiram pelo teste de Tuckey a *5% ou **10% de probabilidade	108
Figura 49: Foto das plantas de cana-de-açúcar 120 dias após a inoculação com <i>G. diazotrophicos</i> PAL5 e mutantes nif ⁻ e lao ⁻ adubadas com 60 ou 120 kg N.ha ⁻¹ cultivadas em um mesmo bloco experimental (Foto: Patrícia Gavão).....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reguladores do crescimento vegetal.	27
Tabela 2: Enzimas envolvidas na via de biossíntese de triptofano e os seus respectivos genes.	33
Tabela 3: Disposição dos sete genes estruturais da via do triptofano no cromossomo de algumas bactérias	34
Tabela 4: Condições de voltagem empregadas da isoeletrofocalização das amostras de proteínas nas tiras de 13 cm de pH 4-7.	55
Tabela 5: Expressão diferencial e categorias funcionais das proteínas identificadas no controle (<i>G. diazotrophicus</i> PAL5 cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano-PST) e no tratamento (<i>G. diazotrophicus</i> PAL5 cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml ⁻¹ de triptofano-PCT).....	63
Tabela 6 Expressão diferencial e categorias funcionais das proteínas identificadas no controle (<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻ cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano) e no tratamento (<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻ cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml ⁻¹ de triptofano). ...	70
Tabela 7: Expressão diferencial e categorias funcionais das proteínas identificadas no controle (<i>G. diazotrophicus</i> PAL5) e no tratamento (<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻).....	76
Tabela 8: Resultado da análise do substrato areia:vermiculita (2:1).	97
Tabela 9: Médias dos números de raízes adventícias e laterais, comprimento da parte aérea e peso fresco das plântulas de cana-de-açúcar até dez dias após a inoculação com <i>G. diazotrophicus</i>	103
Tabela 10: Número de células (x 10 ⁸) por grama de peso fresco de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar variedade SP70-1143 micropropagadas e inoculadas com a estirpe selvagem e mutantes de <i>G. diazotrophicus</i>	105
Tabela 11: Análise das plantas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas e adubadas com 60 e 120 kg.ha ⁻¹ de N coletadas 120 DAI.	107
Tabela 12: Eficiência do uso do adubo nitrogenado das plantas inoculadas com diferentes estirpes de PAL5 (selvagem e mutantes) e adubadas com 120 kg.ha ⁻¹ de sulfato de amônio marcado com 5% de N ¹⁵ em excesso.	110

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	19
GENERAL ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	21
2 OBJETIVOS	44
3 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	44
CAPÍTULO I.....	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1 INTRODUÇÃO.....	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
3 RESULTADOS	59
4 DISCUSSÃO.....	82
5 CONCLUSÕES.....	87
CAPÍTULO II.....	88
RESUMO	89
ABSTRACT	90
1 INTRODUÇÃO.....	91
2 MATERIAIS E MÉTODOS	94
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	100
4 CONCLUSÕES.....	111
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
7 ANEXOS	13737

RESUMO GERAL

GALVÃO, Patrícia Gonçalves. **Análise proteômica de estirpes selvagem PAL5 e mutante lao⁻ de *Gluconacetobacter diazotrophicus* cultivadas na ausência e presença de triptofano e o efeito de sua inoculação em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.** 2012. 147f. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Este estudo teve por objetivo avaliar o perfil de expressão de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 e seu mutante defectivo na produção de compostos indólicos (lao⁻) cultivados na presença e ausência de triptofano através da técnica de 2DE-PAGE. A análise por espectrometria de massa permitiu a identificação de 24 proteínas diferencialmente expressas. A maioria das proteínas com a expressão diminuída em PAL5 cultivada em meio com triptofano em relação ao meio de cultivo sem esse aminoácido pertenceu à categoria modificação pós-traducional, turnover de proteínas e chaperonas. No mutante lao⁻ cultivado nas mesmas condições, a maioria das proteínas que apresentaram expressão diferencial pertencia à categoria produção e conversão de energia. Em adição, a maioria das proteínas que foram diferencialmente expressas no mutante lao⁻ em comparação com a estirpe selvagem PAL5 pertencia à categoria metabolismo e transporte de carboidratos. Por outro lado, não foram observadas proteínas relacionadas à biossíntese de triptofano em nenhuma condição analisada possivelmente devido ao baixo rendimento das identificações por espectrometria. Além das análises dos perfis de proteínas, os mutantes lao⁻ e *nif* de *G. diazotrophicus* foram inoculados em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas com o objetivo de determinar a influência das auxinas na promoção do crescimento dessa cultura em comparação com a estirpe selvagem PAL5. O primeiro experimento, conduzido em condições de hidroponia pelo período de 10 dias, mostrou efeito significativo da inoculação da estirpe selvagem na promoção de crescimento da parte aérea das plantas, enquanto que o mutante lao⁻, não diferiu estatisticamente do controle não inoculado. O outro experimento, foi conduzido por 120 dias em vasos com substrato areia:vermiculita contendo 30 ou 60 ppm de sulfato de amônio enriquecido com ¹⁵N e as plântulas foram inoculadas *in vitro*. Os resultados mostraram uma diferença visual nas raízes das plantas inoculadas com PAL5, que se mostraram mais volumosas, aparentando um número mais elevado de raízes secundárias e pêlos radiculares. Já as plantas inoculadas com lao⁻ apresentaram raízes mais grossas, com um número muito reduzido de ramificações ou pêlos radiculares. A biomassa seca da parte aérea das plantas inoculadas com PAL5 foi superior àquelas inoculadas com as estirpes mutantes para as duas doses de nitrogênio, porém essa diferença não foi significativa. Não foram observadas evidências de contribuição da FBN, porém as plantas inoculadas com PAL5 foram menos eficientes na recuperação do N fertilizante. Em conclusão, o presente estudo mostra a ocorrência de diversas proteínas diferencialmente expressas tanto na estirpe selvagem como em lao⁻ quando crescidas na presença e ausência do aminoácido triptofano. A definição do papel dessas proteínas no metabolismo da bactéria requer estudos adicionais, inclusive em diferentes condições de cultivo. Em adição, a inoculação dessas bactérias em plantas de cana-de-açúcar mostrou o efeito hormonal da bactéria no desenvolvimento das raízes e, por conseguinte na maior eficiência de uso do N aplicado. Entretanto, dado a limitação de espaço físico dos vasos para o desenvolvimento das plantas, sugere-se a realização de novos experimentos, em condições mais apropriadas, para confirmar a influência da produção de índoles e da FBN durante a associação da bactéria com as plantas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: triptofano, proteoma, inoculação, fitormônio, diazotrofo

GENERAL ABSTRACT

GALVÃO, Patrícia Gonçalves. **Proteomic analysis of PAL5 wild strain and lao⁻ mutant strain of *Gluconacetobacter diazotrophicus* cultivated in the presence and absence of tryptophan and the inoculation effect on sugarcane micropropagated plants.** 2012. 147f. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The objective of this study was to evaluate the protein profile expression of *G. diazotrophicus* PAL5 and its defective mutant in the indole compound production (lao⁻) grown in the presence or absence of tryptophan through 2DE-PAGE technique. The spectrometric analysis allowed the identification of 24 differentially expressed proteins. The majority of the proteins down regulated in the wild type PAL5 cultivated with tryptophan as compared to the cultivation without the amino acid belonged to the category of transductional modification, protein turnover and chaperones. For the mutant lao⁻ grown in the same conditions, the majority of the proteins that presented differential expression belonged to the category of production and conversion of energy. In addition, the majority of the protein differentially expressed in the mutant lao⁻ as compared to the wild-type PAL5 strains belonged to carbohydrates metabolism and transport. On the other hand, no proteins related to the tryptophan biosynthesis were detected in any condition, possibly due to the low yield of the proteins during the spectrometric analysis. Furthermore, mutants lao⁻ and nif⁻ of *G. diazotrophicus* were used for inoculation of micropropagated sugarcane plants in order to determine the influence of auxins produced by the bacteria in the plant growth promotion in comparison with PAL5. The first experiment, carried out in hydroponic conditions for 10 days showed a significant inoculation effect of the wild type on plant shoot. The other experiment was conducted in a period of 120 days in pots containing sand:vermiculite substrate fertilized with 30 and 60 ppm with ammonium sulphate enriched with ¹⁵N. The plants were inoculated *in vitro* with the wild type and mutants lao⁻ and nif⁻, and the results showed a visual difference in the roots inoculated with PAL5 that showed higher volume suggesting a higher number of secondary roots and root hairs. On the other hand, the plants inoculated with the lao⁻ mutant were tickier and showed lower number of secondary roots and root hairs. The shoot biomass of plants inoculated with PAL5 was higher than those inoculated with the mutant strains for both N dose, however the difference was not significant. Plants grown with 60 kg N dose and inoculated with the mutants showed lower accumulation of dry shoot mass than plants inoculated with the wild type strain. In conclusion, the present study showed the occurrence of several differentially expressed proteins either in the wild type strain or in the mutant lao⁻ grown in LGI-P with and without tryptophan. The role played by these proteins in the metabolism of the bacteria requires additional studies, including different growth conditions. In addition, the inoculation of micropropagated sugarcane plants suggested a hormonal effect of the bacteria mainly on the root development e consequently in the N use efficiency. However, the size of the pots may have limited the plant development, suggesting that new experiments should be carried out in more appropriated conditions to confirm the influence of the indol production and the BNF during the association of the *G. diazotrophicus* and sugarcane plants.

Keywords: tryptophan, proteomic, inoculation, phytohormone, diazotroph

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Interação planta-microrganismo

Muitas bactérias colonizam as plantas sendo capazes de se multiplicar e colonizar todos os nichos encontrados nas raízes, em todos os estágios do crescimento vegetal e na presença de uma microflora competitiva (ANTOUN e KLOEPPER, 2001) (Figura 1). A interação de bactérias com as plantas pode ter um efeito neutro, quando o crescimento vegetal não é afetado. Essas bactérias também podem influenciar o crescimento de forma prejudicial, quando são classificadas como bactérias deletérias, ou de forma benéfica, caracterizadas como bactérias promotoras do crescimento.

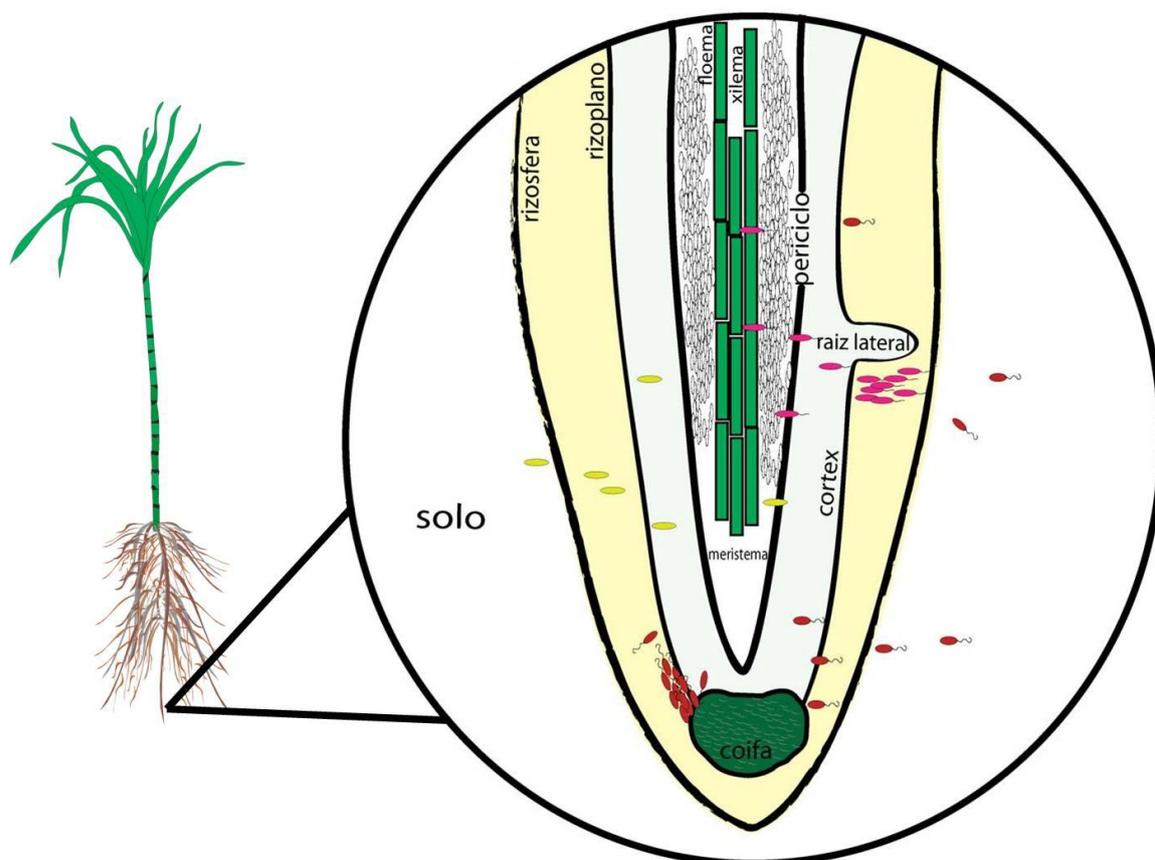


Figura 1: Diferentes processos de colonização da raiz. As bactérias endofíticas formam micro-colônias na superfície das raízes e podem penetrá-las através de ferimentos naturais ou de rachaduras que se formam na coifa ou em locais de emergência das raízes laterais (esquema de Patrícia Galvão e Péricles Galisa, adaptado de HARDOIM et al., 2008).

1.2 Bactérias promotoras do crescimento vegetal

As bactérias que beneficiam o crescimento das plantas o fazem através do aumento da disponibilidade de nutrientes, da produção de fitormônios ou reduzindo os efeitos negativos de patógenos (BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2001; VESSEY, 2003). Esses organismos são chamados de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) (KLOEPPER e SCHROTH, 1978; BURDMAN et al., 2000; DOBBELAERE e OKON, 2007; LUCY et al.,

2004; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; KLOEPPER, 2003). As BPCVs são normalmente conhecidas como biofertilizantes, quando promovem o crescimento vegetal especificamente através do aumento da disponibilidade de nutrientes ou do acesso a eles pela planta, como através do incremento da área superficial de raiz (SOMERS et al. 2004). Por outro lado, quando promovem o crescimento através do controle de organismos deletérios, são comumente designados agentes de controle biológico ou biopesticidas (SOMERS et al., 2004).

As BPCVs mais conhecidas incluem membros do gênero *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* e *Arthrobacter*, sendo que algumas delas são encontradas na superfície das raízes enquanto outras invadem os tecidos das plantas sem causar sintomas aparentes de doença, quando são conhecidas como endofíticas (STURZ e NOWAK, 2000, HARDOIM et al., 2008; ROSENBLUETH e MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Um dos mecanismos de ação das BPCVs mais importantes e estudados é o suprimento de nitrogênio para as plantas através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Este é um dos mais importantes processos conhecidos na natureza, sendo realizado apenas por microrganismos procariotos, ditos diazotróficos, que são capazes de reduzir o N² atmosférico tornando-o assimilável. Desde 1893, ano em que a primeira bactéria diazotrófica foi descrita, diversos estudos sobre o tema foram executados (REIS et al., 2006). Apesar da sua importância, a FBN não é o único mecanismo promotor de crescimento vegetal exercido pelas BPCVs.

1.3 Promoção do crescimento vegetal por bactérias

O modo de ação das BPCVs pode ser dividido em mecanismos que diretamente beneficiam o crescimento das plantas e mecanismos que indiretamente promovem o crescimento vegetal (GLICK et al., 1998; GLICK et al. 1999; PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2003; MANTELIN e TOURAINÉ, 2004; SPAEPEN et al., 2009) (Figura 2).

A promoção indireta ocorre quando BPCVs promovem o crescimento vegetal através do aperfeiçoamento de condições restritas de crescimento (GLICK et al., 1999), enquanto que na promoção direta, geralmente está envolvido o fornecimento de algum composto que é sintetizado pela bactéria e que facilita a captação de nutrientes pela planta.

Muitos esforços têm sido feitos nas últimas duas décadas para elucidar esses mecanismos diretos e os indiretos através dos quais as BPCVs aprimoram o crescimento das plantas (SPAEPEN et al., 2009). Nos próximos tópicos desta revisão, alguns desses processos serão discutidos com mais detalhes.

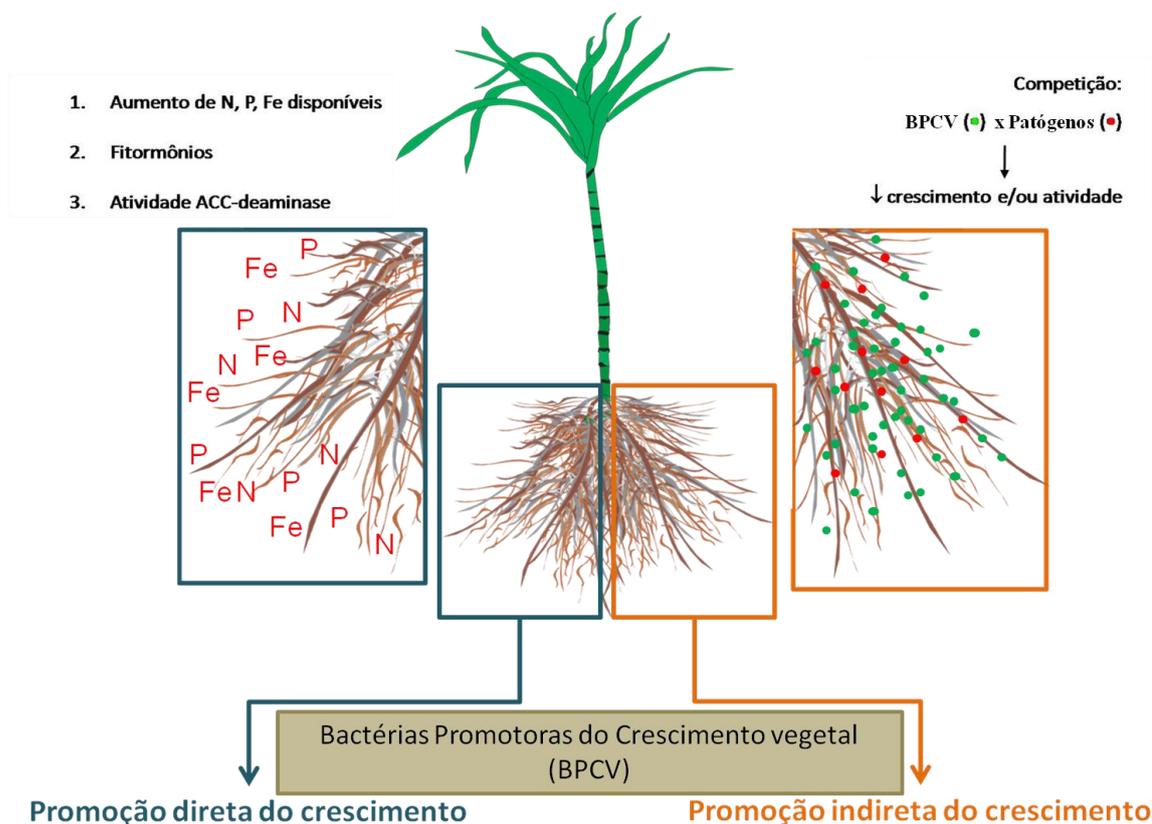


Figura 2: Diferentes formas de promoção do crescimento vegetal. As bactérias em associação com as plantas podem promover o crescimento vegetal (1) através do aumento da disponibilidade de elementos para o vegetal, como por exemplo, o nitrogênio atmosférico através da fixação biológica, e Fe e P através da solubilização desses nutrientes antes indisponíveis para a planta; (2) através da produção de fitormônios, como auxinas, citocininas e giberelinas; ou (3) através da atividade da ACC deaminase que reduz os níveis de etileno induzidos por estresse. As bactérias também podem beneficiar as plantas indiretamente, competindo com patógenos e reduzindo seu crescimento e/ou atividade (esquema de Patrícia Galvão e Péricles Galisa, adaptado de WEYENS et al., 2009).

1.3.1 PROMOÇÃO INDIRETA DO CRESCIMENTO VEGETAL

As BPCVs beneficiam indiretamente o crescimento das plantas através da supressão de microorganismos deletérios que inibem o desenvolvimento vegetal (BURDMAN et al., 2000; DOBBELAERE e OKON, 2007; LUCY et al., 2004).

Dependendo da cultura e da doença em questão, as perdas de produtividade devido à ocorrência de fitopatógenos são estimadas entre 25 a 100% (GLICK e BASHAN, 1997). Além disso, muitos dos produtos utilizados para o controle de doenças fúngicas e de bactérias causam muitas consequências ruins ao ambiente, aos organismos não-alvo e ao homem. Um dos mecanismos indiretos na promoção do crescimento vegetal utilizados pelas BPCVs envolve as várias substâncias produzidas por elas que possuem efeito no controle sobre fitopatógenos, entre elas, destacam-se os antibióticos, antifúngicos e algumas enzimas. A competição por nutrientes e sítios de colonização nas plantas além da resistência sistêmica induzida (ISR) são outros mecanismos indiretos utilizados pelas BPCVs (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009).

Entretanto, deve-se ressaltar que a maioria dos casos observados de controle eficiente foi realizada em condições controladas de laboratório ou de casa de vegetação.

1.3.2 PROMOÇÃO DIRETA DO CRESCIMENTO VEGETAL

Existem diversas maneiras pelas quais as bactérias podem facilitar diretamente o desenvolvimento de suas plantas hospedeiras. A produção de fitormônios e o melhoramento na nutrição vegetal são os dois mecanismos proeminentes cujas BPCVs diretamente contribuem para o crescimento vegetal (BROWN, 1974; DAVISON, 1988; KLOEPPER et al., 1989; LAMBERT e JOOS, 1989; PATTEN e GLICK, 1996; GLICK et al., 1999). Essa melhora na nutrição vegetal promovida pelas BPCVs se dá principalmente pela fixação biológica de nitrogênio, por um aumento na captação de fósforo através da solubilização de fosfatos inorgânicos e na captação de ferro através da produção de sideróforos (GLICK et al., 1999; PODILE e KISHORE, 2006).

Uma bactéria pode afetar o crescimento vegetal através de um ou mais mecanismos, e também pode utilizar diferentes habilidades para a promoção do crescimento durante períodos diferentes do ciclo celular da planta (NAVEED et al., 2008).

1.3.2.1 Promoção do crescimento vegetal através do aumento da disponibilidade de nutrientes

Além da indução de mudanças na morfologia ou fisiologia das raízes através da produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal pelas bactérias (BAREA et al., 1976), algumas BPCVs podem melhorar a nutrição vegetal fornecendo nutrientes específicos para as plantas, principalmente nitrogênio, fósforo e ferro, através da fixação de N_2 , solubilização de fosfatos inorgânicos e da produção de sideróforos (GLICK et al., 1999; PODILE e KISHORE, 2006).

- **Fixação biológica de nitrogênio**

A assimilação do nitrogênio dentro dos esqueletos de carbono é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas, provocando importante efeito na sua produtividade, biomassa e produção de grãos. O nitrato é a principal fonte de nitrogênio para a maioria das plantas (CAMPBELL, 1988). Elas adquirem o nitrato da solução do solo através da membrana plasmática das células da epiderme e do córtex das raízes. Uma vez dentro da célula, para ser incorporado dentro das estruturas orgânicas e cumprir sua função como nutriente essencial para a planta, o nitrato precisa ser reduzido a amônio.

Outra fonte de nitrogênio para as plantas é o nitrogênio atmosférico, apenas ao se tornar assimilável através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é um dos mais importantes processos conhecidos na natureza, sendo realizado apenas por microrganismos procariotos. Tais microrganismos, ditos diazotróficos, são capazes de reduzir o N_2 atmosférico tornando-o assimilável. A FBN e a transferência e/ou disponibilização deste nitrogênio assimilado para o metabolismo vegetal é o mecanismo mais estudado de promoção do crescimento vegetal por bactérias endofíticas. Todas as bactérias diazotróficas possuem como fator chave da FBN o complexo enzimático chamado nitrogenase, que dentre outros substratos alternativos, é responsável pela redução do nitrogênio atmosférico a amônia, com produção de H_2 (NEVES, 1993). Em muitos organismos ocorre apenas uma forma de nitrogenase, a nitrogenase dependente do molibdênio (Mo-nitrogenase), entretanto, duas outras formas foram identificadas inicialmente em *Azotobacter*: nitrogenase dependente de vanádio (V-nitrogenase) e nitrogenase dependente de ferro (Fe-nitrogenase) (BISHOP e PREMAKUMAR, 1992). Por ser um processo complexo, a FBN requer a expressão de um conjunto de genes denominados *nif*, que codificam proteínas envolvidas diretamente neste processo. Além dos genes *nif*, diversos autores têm descrito em bactérias diazotróficas outros

genes, como *ntrA*, *ntrB*, *fix*, *fdx*, *rnf* e *nod* que codificam proteínas com funções como: regulação em nível de metabolismo geral de compostos nitrogenados, sensoriamento e sinalização dos níveis de nitrogênio celular, transporte de elétrons para a nitrogenase e até mesmo o estabelecimento da interação planta-bactéria. O atual quadro de caracterização genética das bactérias diazotróficas demonstra tal complexidade do processo de fixação biológica de nitrogênio e supõe a existência de mais genes que elucidariam processos ainda não compreendidos (BALDANI *et al.*, 2002).

A contribuição de bactérias endofíticas para a nutrição de plantas leguminosas através da FBN é bastante conhecida. Nestas associações, bactérias Gram-negativas conhecidas com rizóbios colonizam tecidos endofíticos como simbioses, e promovem o desenvolvimento de estruturas de simbiose altamente especializadas denominadas de nódulos (VANRHIJN e VANDERLEYDEN, 1995). No entanto, a ocorrência da FBN entre espécies não leguminosas ainda é motivo de muita discussão.

Conforme revisado por Baldani e Baldani (2005), a pesquisa da FBN em *Poaceae* no Brasil foi iniciada por Johanna Döbereiner, alcançando expressividade a partir de 1958, com a descoberta da *Beijerinckia fluminense* associada à cana-de-açúcar (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958), e em 1966, do *Azotobacter paspali* associada à *Paspalum notatum* cv *batatais*. Dentre as bactérias diazotróficas que formam associação do tipo endofítica com poáceas, podem ser citados os gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Derxia*, *Erwinia*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Clostridium* e *Klebsiella* spp. (GRACIOLLI *et al.*, 1983, BALDANI *et al.*, 1999, REIS *et al.*, 2000).

- **Aumento na disponibilidade do fósforo (P) e na captação de ferro (Fe)**

O fósforo (P) é o segundo dentre os macronutrientes minerais que limitam o crescimento vegetal, após o nitrogênio. Porém, mesmo em solos ricos em P, a maioria encontra-se sob a forma insolúvel, estando a minoria disponível para as plantas (STEVENSON e COLE, 1999). Além disso, ¾ dos fertilizantes fosfatados aplicados no solo re-precipitam para as formas insolúveis (GOLDSTEIN, 1986), sendo necessárias grandes doses de adubos fosfatados para que as culturas obtenham alta produtividade.

Os microrganismos afetam diretamente a habilidade das plantas em adquirirem P do solo por meio de vários mecanismos, dentre eles, a promoção do crescimento de raízes laterais e pêlos radiculares por meio de fitohormônios. Esses microrganismos também estimulam processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização do P a partir de formas pouco disponíveis de fósforo inorgânico e orgânico. Vários microrganismos estão envolvidos nesses processos, mas as bactérias se destacam com o maior potencial para obtenção de fosfatos solúveis, sendo cerca de 40% das bactérias culturáveis capazes de solubilizar P (SPAEPEN, *et al.*, 2009), sendo os principais gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aereobacter* e *Flavobacterium* (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; VESSEY, 2003).

Essa solubilização de fosfatos inorgânicos pode ocorrer através da liberação de ácidos orgânicos, como ácido láctico, glicólico, cítrico, acético, glucônico, málico, oxálico, succínico e tartárico, dentre outros (KUCEY *et al.*, 1989), que acidificam o solo e liberam íons solúveis monobásicos ($H_2PO_4^-$) e dibásicos (HPO_4^{2-}). Com a geração destes íons, aumenta a forma disponível de fósforo para as plantas, e conseqüentemente amplia a sua captação pelas mesmas (GYANESHWAR *et al.* 2002).

Além do fósforo inorgânico presente nos solos, a sua forma orgânica também é de importância considerável, compreendendo cerca de 30 a 50% do total de fósforo no solo. Esta reserva pode ser mineralizada por microrganismos, tornando-a disponível para as plantas como fosfato solúvel. Esta mineralização se dá através de fosfatases ácidas e alcalinas das

BPCVs envolvendo a defosforilação através da hidrólise de ligações fosfo-éster e fosfo-anidrido (GYANESHWAR et al., 2002; RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999).

O fitato (mio-inositol hexaquifosfato) representa cerca de 20-50% do fósforo orgânico do solo, e a fitase (mio-inositol hexaquifosfato fosfohidrolase) é uma enzima pertencente ao grupo das fosfatases ácida que hidrolisa o fitato a mio-inositol e ácido ortofosfórico, (VOHARA e SATYANARAYANA, 2003). Essas enzimas já foram purificadas e caracterizadas de algumas estirpes de bactérias dos generos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (KEROVUO et al. 1998; GREINER et al. 1997). Um mutante de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 defectivo na produção de fitase deixou de promover o crescimento de plântulas de milho em meio com limitação de fosfato (BA IDRIS et al., 2002). Recentemente, em dois gêneros bacterianos, *Erwinia* e *Pseudomonas*, foi observado uma elevada capacidade de solubilização de fosfatos associados à produção de ácidos orgânicos, (SHIN et al., 2005). Exemplos de associação benéfica entre BPCVs solubilizadoras de fosfato e algumas culturas são: *Azotobacter chroococcum* e trigo (KUMAR e NARULA, 1999), *Bacillus circulans* e trigo (SINGH e KAPOOR, 1998), *Enterobacter agglomerans* e tomate (KIM et al. 1998), *Pseudomonas chlororaphis* ou *P. putida* e soja (CATTELAN et al. 1999).

Outro nutriente essencial para as plantas é o ferro (Fe). A deficiência em ferro promove diversas alterações metabólicas devido ao seu papel como co-fator em um grande número de enzimas essenciais a processos fisiológicos importantes, tais como respiração, fotossíntese e fixação de nitrogênio. Da mesma maneira que o fósforo, o Fe é muito abundante nos solos, mas sua grande maioria é encontrada sob a forma de hidróxido férrico, indisponível para as plantas.

As bactérias desenvolveram uma estratégia para uma captação mais eficiente de Fe através da produção e secreção de compostos orgânicos quelantes de ferro, chamados Sideróforos (do grego: *sideros*, ferro e *foros*, transportador) (BUYER et al., 1993). Essas moléculas de baixo peso molecular (<1 kDa) atuam do lado externo da membrana celular, capturando moléculas de ferro Fe^{+3} em solução com muita afinidade e ligando-se especificamente a receptores do complexo localizados na membrana, por onde são absorvidos, tornando assim o ferro absorvido disponível para o metabolismo microbiano ou para o crescimento dos vegetais (NEILANDS e LEONG, 1986; RAAIJMAKERS et al. 1995).

Não são apenas para as bactérias que os complexos sideróforos- Fe^{+3} facilitam a captação de Fe. Uma grande quantidade de trabalhos evidencia que diversas espécies vegetais são capazes de reconhecer e absorver os complexos sideróforos- Fe^{+3} (SHARMA et al., 2003). Vários pesquisadores acreditam que este processo seja vital na absorção de Fe para as plantas (MASALHA et al. 2000) e o papel desses sideróforos em aumentar a nutrição de ferro vegetal foi bem estabelecido através de análises de mutações e a produção dessas moléculas (KLOPPER et al. 1991). Estirpes mutantes de BPCVs, deficientes na produção de sideróforos, perderam sua capacidade de promover o crescimento, enquanto que a complementação da produção dessas moléculas restaurou sua atividade. A biossíntese e os mecanismos de captação de ferro através dos sideróforos foram intensivamente estudados em espécies de *Pseudomonas*, sendo esta espécie a maior produtora dentre as bactérias Gram negativas (DAVID et al. 2005). Um mutante de *P. fluorescens* com sua produção de sideróforos 17 vezes superior à normal, apresentou um aumento na colonização e na promoção do crescimento de *Vigna radiata* (KATIYAR e GOEL, 2004). O tratamento de sementes de milho com estirpes produtoras de sideróforos *Pseudomonas* spp. GRP3A, PRS9 e *P. chlororaphis*, promoveu um aumento na germinação, no comprimento de raízes e parte aéreas e no peso seco das plântulas (SHARMA e JOHRI, 2003). Em outras BPCVs, como *Azospirillum* e *Rhizobia*, a produção de sideróforos também já foi documentada (WHIPPS, 2001). Estudos de Rengel e colaboradores (1999) demonstraram o sucesso do uso de

sideróforos como biofertilizantes, visando aumentar a concentração de micronutrientes em grãos destinados ao consumo humano, principalmente arroz, feijão, milho.

Vários pesquisadores acreditam que este processo da absorção de Fe seja vital para as plantas (MASALHA et al. 2000), entretanto a real contribuição destes complexos para as necessidades de Fe das plantas ainda permanece ambígua.

1.3.2.2 Promoção do crescimento vegetal através da produção de fitormônios

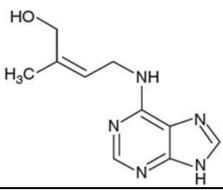
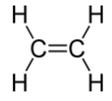
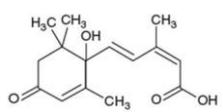
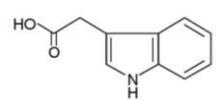
A produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal pelas bactérias já foi relatada para muitas espécies bacterianas e a hipótese de que esta produção contribui para os efeitos promotores do crescimento vegetal de algumas bactérias já foi lançada há mais de 50 anos (BAREA et al., 1976).

As diferentes substâncias produzidas pelas BPCVs podem induzir mudanças na morfologia ou fisiologia das raízes que aumentam sua área superficial e taxa de respiração, desta forma, influenciando a captação de nutrientes e o crescimento vegetal (BEATTIE et al., 2006).

É comumente aceito a existência de cinco classes principais de hormônios vegetais: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (Tabela 1). Entretanto, outros reguladores de crescimento já foram identificados tais como, estrigolactonas (GOMEZ-ROLDAN et al., 2008), brassinoesteróides, ácido salicílico, ácido jasmônico, poliaminas, e outros (SANTNER et al., 2009).

Vessey (2003) forneceu evidências que diferentes estirpes de BPCV promovem o crescimento vegetal devido à influência de diferentes fitormônios.

Tabela 1: Reguladores do crescimento vegetal.

Classe	Exemplo e Estrutura	Efeito Na Planta	Referências
Citocininas	<p style="text-align: center;">Zeatina</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do alongamento de raiz; • Expansão da folha por alongamento celular; • Atraso na senescência; 	<p style="text-align: right;">LETHAM, 1963</p> <p style="text-align: right;">MILLER et al., 1955</p>
	Giberelinas		
Etileno		<ul style="list-style-type: none"> • Hormônio do amadurecimento e do estresse; • Senescência e abscisão de flores e folhas; • Adaptação a estresses bióticos e abióticos; 	ADAMS e YANG, 1981
Ácido Abscísico		<ul style="list-style-type: none"> • Fechamento estomático; • Dormência de embriões; • Adaptação a estresses bióticos e abióticos; 	ADDICOTT e LYON, 1969
Auxinas	<p style="text-align: center;">AIA (ácido indol-3-acético)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Arquitetura de raiz e parte aérea; • Dominância apical; • Respostas trópicas; 	STRADER e BARTEL, 2008

- **Citocininas**

Após sua biossíntese nas raízes e em sementes em desenvolvimento, as citocininas são transportadas para a parte aérea via xilema, aonde regulam diversos processos como a divisão celular, expansão de folhas e retardo da senescência. O representante principal desta classe de fitormônio é a Zeatina (TAIZ e ZEIGER, 2009). O balanço entre auxinas e citocininas regula a diferenciação celular vegetal: se o equilíbrio for deslocado em direção à auxina, o desenvolvimento das raízes é favorecido, enquanto que sob concentrações maiores de citocinina o crescimento da parte aérea é induzido (SPAEPEN et al., 2009).

Em bactérias, as citocininas foram primeiramente descobertas em patógenos, cuja produção massiva desses fitormônios é um importante fator de virulência (BARASH e MANULIS-SASSON, 2007; COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995; JAMESON, 2000), contudo, a capacidade de produzir citocininas já é conhecida para diversas BPCVs (BAREA et al., 1976; De SALAMONE et al., 2001; FRANKENBERGER e ARSHAD, 1995).

Nesses microrganismos, a Zeatina é biossintetizada a partir do dimetilalil difosfato (DMAPP) e adenosina monofosfato (AMP). A enzima que cataliza a transferência do grupo isopentenil para AMP, a isopentenil transferase, já foi caracterizada em alguns microrganismos patogênicos, tais como *Pantoea agglomerans*, *Rhodococcus fascians* e diversas estirpes de *Agrobacterium* (AKIYOSHI et al., 1984; CRESPI et al., 1992; LICHTER et al., 1995a,b). O produto gerado, isopentenil adenosina-monofosfato é convertido posteriormente em zeatina (KAKIMOTO, 2003; PRINSEN et al., 1997).

Os mecanismos de ação envolvendo o papel das citocininas na interação planta-microrganismo são pouco conhecidos, principalmente, devido à falta de mutantes gerados que poderiam permitir a quantificação da contribuição da produção de citocininas bacteriana para os efeitos na promoção do crescimento vegetal. Especula-se que a produção de citocininas pelas bactérias contribui para a concentração de citocininas na planta, portanto influenciando em seu crescimento e desenvolvimento. Recentemente foi mostrado que citocininas bacterianas foram reconhecidas por receptores vegetais, o que levou a mudanças no desenvolvimento e a proliferação de tecidos (PERTRY et al., 2009).

Muitas bactérias produzem auxinas e citocininas, conseqüentemente, o efeito dessas BPCVs no crescimento vegetal irá depender do balanço entre esses dois fitormônios (SPAEPEN et al., 2009).

- **Giberelinas**

As giberelinas (GAs) são amplamente distribuídas no reino vegetal. Elas estão presentes em toda a planta, podendo ser detectadas em folhas, caules, sementes, embriões e pólen. Esses fitormônios executam um importante papel na mediação dos efeitos de estímulos ambientais sobre o desenvolvimento da planta. Fatores ambientais como fotoperíodo e temperatura, podem alterar os níveis de giberelinas ativas, afetando etapas específicas nas suas biossínteses. São associadas, mais freqüentemente, com o florescimento de algumas espécies e a promoção do crescimento do caule, onde aplicações de GAs em plantas intactas podem induzir um aumento significativo na sua altura. Existem cerca de 130 giberelinas identificadas nas plantas, porém, diversas observações têm confirmado que a GA1 é a forma ativa que controla o crescimento do caule. Apesar deste grande número de giberelinas presentes em plantas, análises genéticas têm demonstrado que somente algumas são hormônios biologicamente ativos e que a maioria serve como precursores ou representam formas inativas.

Apesar de algumas BPCVs, como *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, e algumas estirpes de *Azospirillum* e *Pseudomonas* sintetizarem giberelinas (GAUDIN et al. 1994; Gutierrez-Manero et al. 2001), informações sobre a produção deste fitormônios por outras bactérias ainda são muito raras, não existindo dados suficientes para dimensionar o papel desses compostos na promoção do crescimento vegetal (DE SALAMONE et al., 2001). Especula-se que como esse hormônio pode ser translocado das raízes para a parte aérea das plantas, as giberelinas sintetizadas por BPCVs nas raízes teriam efeito notável nos caules. Esse efeito ainda seria acentuado através da produção de auxinas pela bactéria, que estimularia o sistema radicular, aumentando o fornecimento de nutrientes para o dreno gerado na parte aérea.

Em um estudo realizado por Gutierrez-Manero e colaboradores (2001) foram obtidos fenótipos anões após a exposição de plântulas de *Alnus glutinosa* a um inibidor da biosíntese de giberelina. A inoculação dessas plântulas com as estirpes de bactérias produtoras de GA *Bacillus pumilus* e *B. licheniformis* reverteram o fenótipo anão, o mesmo efeito que foi observado quando as plântulas foram expostas a GA3.

- **Etileno**

O etileno, um fitormônio gasoso, está fundamentalmente relacionado aos sistemas de defesa e crescimento vegetais, mediando o amadurecimento, crescimento de raízes e germinação de sementes, por exemplo. Além disso, está envolvido na resposta a estresses e processos adaptativos, Alguns fatores como a luz, temperatura, salinidade, ataque de patógenos e estatus nutricional causam variações consideráveis nos níveis de etileno (ETESAMI, et al., 2009).

Como pode ser observado na Figura 3, a biossíntese do etileno se inicia a partir do ciclo da metionina, onde S-adenosil-metionina (AdoMet) é convertido a 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) através da ação da enzima ACC sintase. Posteriormente, o ACC é utilizado como substrato da ACC oxidase, que através de uma reação com consumo de oxigênio produz o etileno (TAIZ e ZEIGER, 2009).

A enzima ACC sintase é regulada por vários sinais, dentre eles o próprio etileno, alguns fatores ambientais e a auxina. Um aumento na concentração de AIA pode promover a produção de ACC, aumentando a síntese de etileno, que resulta em uma inibição do crescimento de raízes (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1998; ASGHAR et al., 2004; MATHESIUS, 1998; ETESAMI, et al., 2009).

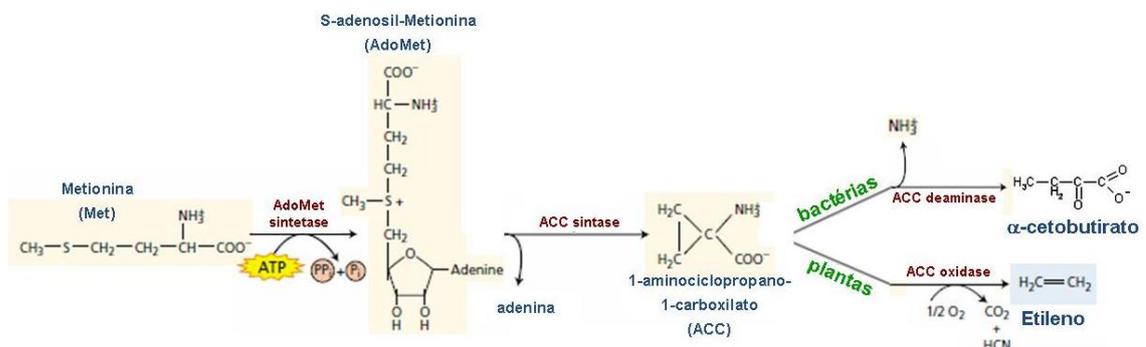


Figura 3: Provável rota biossintética do etileno em plantas e a ação da enzima ACC deaminase de bactérias (adaptado de TAIZ e ZEIGER, 2009).

Foi proposto um modelo através do qual as BPCVs poderiam diminuir os níveis de etileno nas plantas (GLICK et al. 1998). Neste modelo, em resposta ao triptofano ou outras

moléculas exsudadas pelas raízes, as bactérias sintetizariam AIA que seria incorporado pela planta. Este AIA, em conjunto com aquele produzido pelo vegetal, estimularia a proliferação celular ou induziria a transcrição de ACC sintase, aumentando a produção de ACC. Algumas dessas moléculas de ACC seriam absorvidas pelas bactérias (PENROSE et al. 2001; GRICHKO e GLICK 2001) e clivadas pela ação da enzima ACC deaminase (Figura 3).

Esta enzima, descoberta em 1978 (HONMA e SHIMOMURA, 1978), compete com a ACC oxidase e catalisa a clivagem do ACC a α -cetobutirato e amônia, que é utilizada como fonte de nitrogênio por essas bactérias (GLICK et al. 1998). Consequentemente, essa degradação diminui os níveis de etileno produzidos pelas plantas. Esta redução, em combinação com a ação de auxinas - que podem ser produzidas pelo mesmo microrganismo - causa um efeito considerável no crescimento e desenvolvimento de raízes. Logo, a utilização de BPCVs capazes de reduzir os níveis de etileno na planta pode ser um método interessante para aprimorar determinados processos fisiológicos vegetais.

A atividade da ACC deaminase já foi detectada em diversos fungos e bactérias (KLEE et al. 1991; SHEEHY et al. 1991; HONMA 1993; JACOBSON et al. 1994; GLICK et al. 1995; CAMPBELL e THOMSON 1996; BURD et al. 1998; MINAMI et al. 1998; JIA et al. 1999; BELIMOV et al. 2001; MAYAK et al. 2004; BABALOLA et al. 2003; GHOSH et al. 2003; MA et al. 2003; DEY et al. 2004; BELIMOV et al. 2005; HONTZEAS et al. 2005; BLAHA et al. 2006; MADHAIYAN et al. 2006).

Em um estudo realizado por Duan et al, (2006) 27 de 233 novos isolados de *Rhizobium spp* de vários locais de Saskatchewan, Canadá, apresentaram essa atividade. Em outro estudo, a atividade da ACC deaminase foi encontrada em diversos isolados bacterianos, incluindo *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* (BLAHA et al. 2006). Além disso, 62 de 88 estirpes de *Pseudomonas* isoladas em todo o mundo continham ACC deaminase (WANG et al. 2001).

A produção de etileno também já foi identificada em alguns microrganismos patogênicos, como *Pseudomonas syringae*. Altos níveis de etileno encontrados nos tecidos de algumas plantas podem ser relacionados à produção de etileno por bactérias inoculadas (WEINGART e VOLKSCH, 1997; WEINGART et al., 2001). A biossíntese do etileno nas bactérias difere daquela das plantas. Duas vias distintas já foram descritas (WEINGART et al., 2001).

O etileno também ativa diversas respostas de defesa em plantas e é um componente sinalizador necessário para a indução da resistência sistêmica a doenças adquirida através de bactérias. Esta dupla função torna difícil definir o papel exato do etileno produzido por diferentes espécies de BPCVs (VAN LOON et al., 2006).

- **Ácido Abscísico**

O ácido abscísico (ABA) também está envolvido na resposta vegetal a estresses bióticos e abióticos. Como hormônio, ele induz o fechamento estomático, inibe a germinação de sementes e amadurecimento de frutos, e está envolvido na dormência de embriões. Além disso, ele media respostas de proteção contra condições ambientais adversas, tais como seca, estresse salino e toxicidade de metais. (ADDICOTT e LYON, 1969). O ABA pode ser sintetizado em todas as partes da planta e pode ser translocado rapidamente através dela (TAYLOR et al., 2005).

A produção de ABA por bactérias em meio de cultura já foi demonstrada por *Azospirillum brasilense* e algumas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, entretanto a via biossintética ainda não foi determinada (BOIERO et al., 2007; COHEN et al., 2008).

Já foi suposto que as bactérias que produzem ABA podem aumentar o crescimento vegetal interferindo na concentração de citocinina vegetal, uma vez que ABA inibe a síntese

deste fitormônio (MIERNYK, 1979). Além disso, sob condições de estresse, o ABA produzido por bactérias pode atenuar o estresse vegetal, como sugerido por Boiero et al. (2007).

- **Auxinas**

As auxinas (do grego, *auxein* significa “crescer”) são fitormônios, moléculas sinalizadoras móveis, transportadas ativamente ao longo de gradientes locais e através da planta para coordenarem o crescimento e conduzirem respostas a sinais ambientais (PERROT-RECHENMANN e NAPIER, 2005). Em meados de 1930 foi determinado que a auxina seria o ácido-3-indolacético (AIA). Mais tarde, outras auxinas naturais foram descobertas nos vegetais superiores (Ácido Fenil-Acético e Ácido 4-Cl-Indol-3-Acético), mas o AIA continuou a ser a auxina mais abundante e de maior relevância fisiológica (Figura 4).

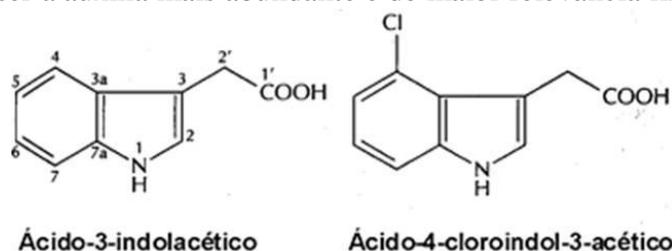


Figura 4: Estrutura química de duas auxinas naturais (adaptado de Taiz e Zeiger, 2009).

Com base na estrutura relativamente simples do AIA, rapidamente os laboratórios foram capazes de sintetizar uma grande variedade de moléculas com atividades auxínicas as quais são conhecidas como auxinas sintéticas - Ácido Indol-3-Propílico (AIP ou IPA), Ácido Naftaleno Acético (ANA ou NAA), Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), dentre outros. (Figura 5). Algumas dessas moléculas são utilizadas como herbicidas na horticultura e na agricultura.

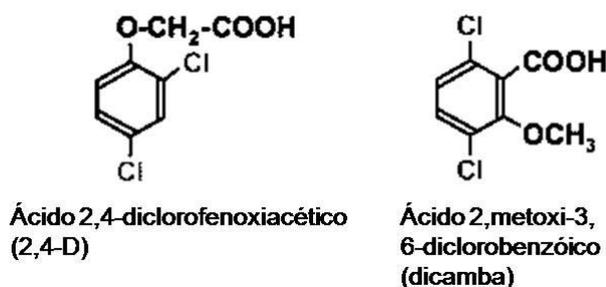


Figura 5: Estrutura química de duas auxinas sintéticas (adaptado de Taiz e Zeiger, 2009).

Uma definição inicial de auxina incluía todas as substâncias químicas, naturais e sintéticas, que estimulavam o alongamento de coleótilos e segmentos de caules. Entretanto, as auxinas afetam muitos outros processos do desenvolvimento, além do alongamento celular (TAIZ e ZEIGER, 2009). Assim, as auxinas podem ser definidas como compostos que, a nível vegetal, modulam diversos processos como as respostas trópicas à luz e à gravidade, a arquitetura geral de raízes e parte aérea, a padronização de órgãos, o desenvolvimento vascular e o crescimento em cultura de tecido (DAVIES, 1995). A nível celular, as auxinas promovem a hiperpolarização da membrana plasmática e, provavelmente devido ao estímulo das H⁺-ATPase, levam à acidificação da parede celular, acarretando o seu afrouxamento. O turgor, o alongamento, a divisão e a diferenciação celular são outros fatores influenciados pelas auxinas a nível celular (BERLETH e SACHS, 2001).

1.4 Síntese do aminoácido triptofano – precursor da biossíntese de AIA

O triptofano (trp) é o principal precursor das vias de biossíntese de AIA e é sintetizado através de uma rota, inicialmente, comum a três aminoácidos: triptofano, fenilalanina e tirosina (Figura 6). As vias de biossíntese dos aminoácidos aromáticos têm em comum a via do shiquimato (PITTARD, 1996). Em *E.coli* essas vias envolvem 23 enzimas codificadas pelos genes *aroF*, *aroG*, *aroH*, *aroB*, *aroD*, *aroE*, *aroK*, *aroL*, *aroA*, *aroC*, *tyrA*, *tyrB*, *aspC*, *pheA*, *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpA*, e *trpB*. Muitos desses genes, bem como as atividades de suas enzimas correspondentes são controlados pelos próprios produtos finais: o triptofano, a fenilalanina e a tirosina.

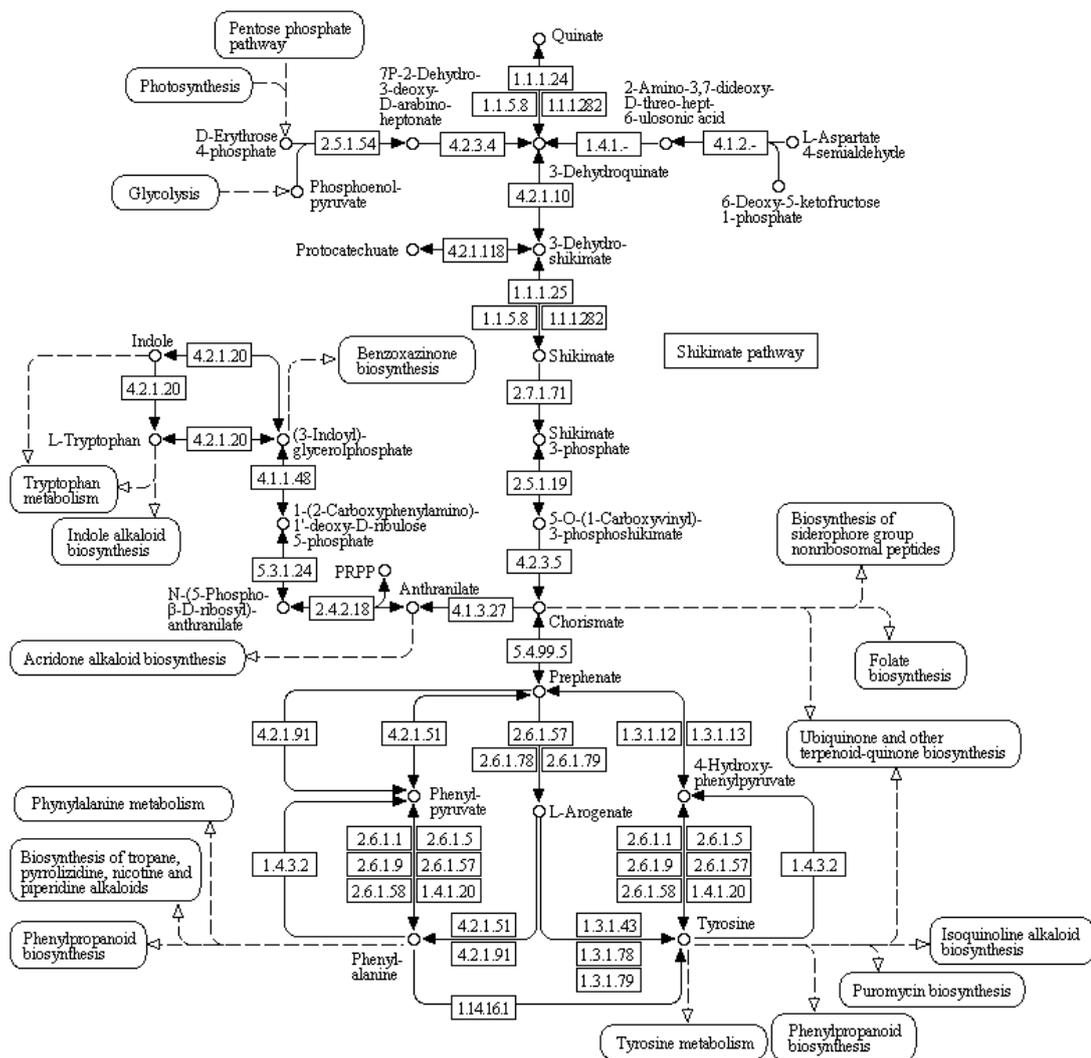


Figura 6: Via de biossíntese dos aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina. (Fonte: <http://www.genome.jp/kegg>)

Sete enzimas estão envolvidas na rota, que começa com a condensação do fosfoenolpiruvato com eritrose-4-fosfato e leva ao precursor biossintético comum, o corismato (SAIER, 1987). Os sete passos desta via foram originalmente descobertos através de estudos em bactérias, principalmente *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (HERRMANN e WEAVER, 1995).

Após a obtenção do corismato, ele é convertido a triptofano em uma sequência de reações de cinco etapas, envolvendo quatro enzimas em *Escherichia coli*, enquanto que, em outros organismos o número de enzimas envolvidas varia de dois a sete. Esta via desperta interesse, principalmente devido à natureza das reações catalisadas, o caráter multifuncional das enzimas envolvidas e a disponibilidade de dados comparativos que permitem propostas relacionadas à evolução do aparato genético que codifica as enzimas desta rota em diferentes organismos (SAIER, 1987).

Um considerável número de aspectos desta via, tais como mecanismos de reação detalhados, enzimologia e estrutura de operons, recebeu destaque ao longo dos anos (CRAWFORD, 1980; CRAWFORD, 1986; HÜTTER et al., 1986; YANOFSKY e CRAWFORD, 1987; ZALKIN, 1980), entretanto, praticamente nunca foi estudada em bactérias endofíticas ou em dizotróficas, deixando uma lacuna sobre o conhecimento dessa via nesse organismo.

Além disso, existem poucos estudos disponíveis sobre as enzimas desta via, muito pelo fato de que a maioria das enzimas só é ativa quando faz parte de complexos com outras proteínas. Quase todos os trabalhos realizados até a data sobre estas enzimas são estruturais, já que, para realizá-los, não é necessário ter as enzimas em sua forma cataliticamente ativa, pois uma grande dificuldade para o estudo desta via é a indisponibilidade comercial dos substratos das reações. O único composto disponível no mercado é o antranilato, de modo que todos os outros intermediários da via necessitam ser sintetizados quimicamente ou enzimaticamente.

1.5 Genes *trp*

Sete regiões abertas de leitura (ORFs) estão envolvidas na via de biossíntese de triptofano. O produto codificado por cada gene envolvido nesta rota está organizado na Tabela 2.

Tabela 2: Enzimas envolvidas na via de biossíntese de triptofano e os seus respectivos genes.

ORF	PRODUTO
<i>trpE</i>	antranilato sintase α (ASI)
<i>trpG</i>	antranilato sintase β (ASII)
<i>trpD</i>	Fosforibosil antranilato isomerase (PRAI)
<i>trpF</i>	Fosforibosil transferase (PRT)
<i>trpC</i>	Indol-glicerolfosfato sintase (IGPS)
<i>trpA</i>	Triptofano sintase α (TSI)
<i>trpB</i>	Triptofano sintase β (TSII)

Entre parêntesis pode-se observar a sigla de cada produto codificado.

Um dado curioso nos estudos dos genes *trp* é o número de exemplos de fusões de genes que codificam para dois polipeptídios na mesma via (CRAWFORD, 1975). Durante o curso da evolução dos microrganismos, a fusão de genes produziu proteínas multifuncionais. Diferentes padrões de fusões têm produzido complexos multifuncionais com diferentes combinações de atividade (HÜTTER et al., 1986). Se não conferirem uma vantagem decisiva, durante o curso da evolução, algumas dessas fusões não substituem os genes isolados em todos os organismos subsequentes. Talvez também exista uma vantagem na flexibilidade conferida por genes isolados visto que eles devem interagir mais facilmente com outras rotas metabólicas na célula e podem ser controlados independentemente (CRAWFORD, 1975).

Alguns genes *trp* foram fusionados e outros modificados com relação a sua posição no genoma de alguns organismos (Tabela 3), contudo, amplas partes das seqüências se mantiveram conservadas durante a evolução tanto de microrganismos procarióticos quanto eucarióticos.

Tabela 3: Disposição dos sete genes estruturais da via do triptofano no cromossomo de algumas bactérias

ORGANISMO	ORGANIZAÇÃO DOS GENES
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<u>E</u> <u>G•D•C</u> <u>F•B•A</u>
<i>Bacillus subtilis</i>	<u>G</u> <u>E•D•C•F•B•A</u>
<i>Caulobacter crescentus</i>	<u>EG</u> <u>D•C</u> <u>F•B•A</u>
<i>Escherichia coli</i>	<u>E•(G)D•C(F)•B•A</u>
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	<u>E</u> <u>G•D•C</u> <u>F•B•A</u>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>E•G•D•C(F)•B•A</u>
<i>Rhizobium meliloti</i>	<u>E•(G)</u> <u>D•C</u> <u>F•B•A</u>

Genes em um mesmo operon são representados por letras separadas por um ponto e posicionados na ordem de sua transcrição

É possível que estes resíduos amplamente conservados sejam críticos para as funções enzimáticas e suas interações (HÜTTER et al., 1986). Essas fusões devem ter ocorrido duas vezes na linhagem de bactérias entéricas para formar um único peptídeo bifuncional: uma delas combinando os genes *trpC* e *trpF* e outra entre *trpG* e *trpD*. A primeira fusão deve ter ocorrido em uma estirpe ancestral a todo o grupo, enquanto que a segunda em outra comum apenas ao grupo *Escherichia-Salmonella-Enterobacter* (CRAWFORD, 1975). A única vantagem dos organismos com os genes *trp(G)D* fusionados é a proximidade física das enzimas codificadas por eles. Contudo, não há canalização entre os dois sítios-ativos e não foi demonstrada nenhuma vantagem cinética em ter as duas atividades em um complexo (CRAWFORD, 1989).

Em *G. diazotrophicus* não existem trabalhos esclarecendo a disposição dos genes *trp* no genoma desta bactéria. Após análises de bioinformática é possível observar que todos os sete genes estão presentes no genoma e se encontram em três regiões distintas. Conforme pode ser observado na Figura 7, entre os nucleotídeos 1.248.560 e 1.250.616 do genoma de *G. diazotrophicus* PAL5 depositado no NCBI estão localizados os genes *trpA* e *trpB*. O gene *trpF* encontra-se isolado dos outros entre os nucleotídeos 1.326.653 e 1.327.327 ao passo que os genes *trpC*, *trpD*, *trpE* e *trpG* estão situados bem próximos uns aos outros, entre os nucleotídeos 1.972.911 e 1.968.628. Experimentos de RT-PCR poderiam auxiliar a definir o padrão de transcrição desses genes em *G. diazotrophicus*, definindo o número de operons que esses genes possam estar agrupados.

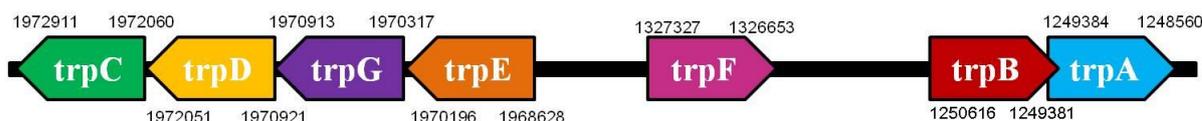


Figura 7: Contexto genômico dos genes *trp* em *G. diazotrophicus* PAL5 (Representação esquemática de Patrícia Galvão).

1.6 As enzimas envolvidas na via de biossíntese do triptofano

– Antranilato sintase

A antranilato sintase (AS – EC 4.1.3.27) é a primeira enzima específica para a via de biossíntese do triptofano. Esta enzima catalisa o ataque nucleofílico por um par de elétrons livres do nitrogênio da glutamina na posição do anel entre os grupos enol-pirúvicos e carboxílicos (SAIER, 1987). Seu sítio ativo é dividido em duas subunidades: uma subunidade maior chamada α , também conhecida por componente I (ASI) (codificada pelo gene *trpE*) e uma subunidade menor chamada β , ou componente II (ASII) (codificada por *trpG*). Como pode ser observado na Figura 8, a subunidade α sintetiza antranilato diretamente a partir do corismato e altas concentrações de amônia sob condições de pH alto, além de conter o sítio de ligação do triptofano para respostas inibitórias (CRAWFORD, 1975). A subunidade β possui atividade glutaminase, transferindo o grupamento amina da glutamina para o sítio de ligação de NH_3 neste componente, permitindo que a glutamina em concentrações moderadas substitua a amônia, evitando a questão do pH alto para a célula (YANOFISKY e CRAWFORD, 1987; ZALKIN, 1980).

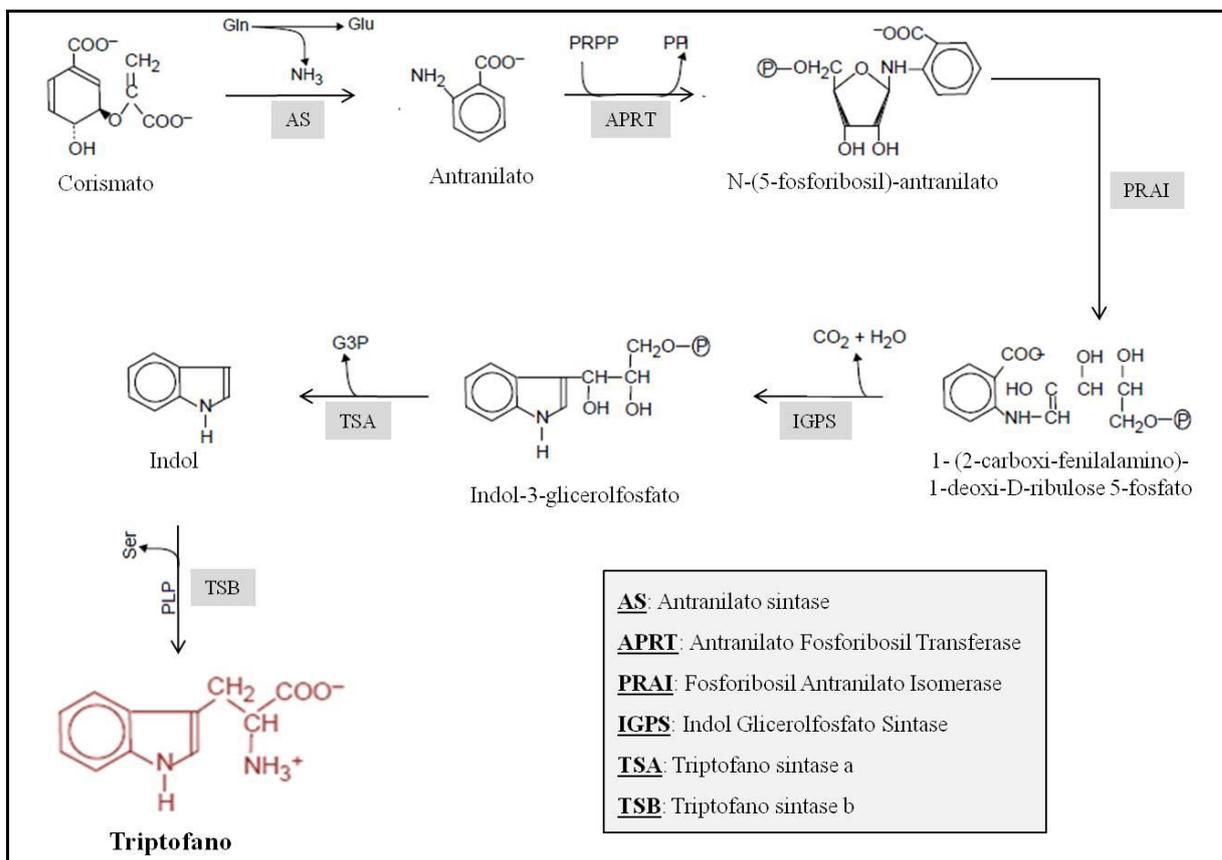


Figura 8: Via de biossíntese do triptofano (Representação esquemática de Patrícia Galvão, adaptado de Pittard, 1996).

Como essa enzima catalisa a primeira reação da via de biossíntese do triptofano, não é surpresa que AS esteja sujeita a controle alostérico pelo produto final desta rota, o triptofano. O sítio de ligação alostérico está associado com a subunidade α . A ligação do triptofano ao sítio alostérico reduz a afinidade do sítio catalítico para o corismato. A antranilato sintase e a primeira enzima na biossíntese do corismato são sensíveis à resposta regulatória pelo triptofano e, portanto, servem como sítios de regulação secundários (SAIER, 1987).

– Antranilato Fosforibosil transferase

A enzima antranilato fosforibosil transferase (APRT - EC 2.4.2.18) catalisa a segunda reação mostrada na Figura 8. Nesta reação, o grupamento amina do antranilato desloca o grupamento pirofosfato do 5'-fosforibosil pirofosfato (PRPP), dando lugar ao N-(5-fosforibosil)-antranilato. Em algumas bactérias como *E. coli*, APRT e AS estão associadas em um único complexo enzimático com duas subunidades: antranilato sintase II é fusionada a antranilato fosforibosil transferase em uma única cadeia polipeptídica, e duas dessas cadeias associam-se com duas ASI. É provável que o antranilato seja passado diretamente de um sítio ativo da sintase para o sítio ativo da fosforibosil transferase, aumentando a eficiência catalítica. Devido ao forte acoplamento das duas subunidades, todas as três subunidades catalíticas do complexo estão sujeitas a controle alostérico pelo triptofano. Em outras bactérias, essas duas funções são codificadas por genes separados. É possível que as enzimas que catalisam as cinco etapas da via mostrada na Figura 8, estejam presentes nas células como um complexo único, fracamente associado (SAIER, 1987).

– Fosforibosil antranilato isomerase

Na terceira etapa da síntese, a enzima fosforibosil antranilato isomerase (PRAI - EC 5.3.2.24) catalisa um rearranjo do fosforibosil antranilato no qual a fração fosforibosil se torna uma fração fosforibulosil (Figura 8).

Segundo Crawford (1989), o gene para esta enzima (*trpF*) é encontrado em uma variedade de associações. Encontra-se fusionado ao *trpC*, ou a jusante aos genes *trpA* e *trpB*, mas não fusionado em algumas eubactérias; fusionado ao *trpG* e *trpC* em muitos fungos, e sozinho em *Pseudomonas fluorescens* e leveduras. É coordenadamente regulado com outros genes *trp* em bactérias entéricas, *Bacillus subtilis* e *Brevibacterium lactofermentum*, entretanto é essencialmente desregulado em *Pseudomonas putida* (CRAWFORD e GUNSALUS, 1966), *Rhizobium leguminosarum* (HOLMGREN e CRAWFORD, 1982) e *Caulobacter crescentus* (ROSS e WINKLER, 1988).

– Indol Glicerolfosfato Sintase

A quarta reação da via de biossíntese do triptofano é catalisada pela enzima indol glicerolfosfato sintase (IGPS - EC 4.1.1.4) (Figura 8). Esta reação consiste de uma condensação intramolecular, liberando água e gás carbônico, originando a porção pirrólica do triptofano. Em *M. tuberculosis*, esta proteína é codificada pelo gene *trpC*, com 819 pb, no operon do triptofano, que codifica apenas a cadeia polipeptídica da IGPS, com 272 aminoácidos por subunidade, diferentemente do que ocorre em outros organismos como por exemplo, em *E. coli*, que o gene *trpC* codifica as cadeias polipeptídicas das enzimas PRAI e IGPS (CREIGHTON e YANOFSKY, 1966, CZEKSTER, 2008).

– Triptofano sintase a e b (TSA e TSB)

A triptofano sintase (TS - EC 4.2.1.20) é responsável pela catálise das duas últimas reações da biossíntese de L-triptofano (Figura 8). Dentre as enzimas da via, ela é uma das mais bem estudadas, sendo muito bem conhecidos os detalhes de sua purificação, bioquímica, inibição e modificações estruturais de sua atividade (DUNN, 1997). É uma enzima com estrutura em subunidades do tipo $\alpha_2\beta_2$ que pode ser dissociada em duas unidades α e uma unidade β .

A subunidade α (TSA) catalisa uma reação retroaldol em que o indol-3-glicerol fosfato (IGP) é clivado em indol e D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P). A segunda parte da reação requer um piridoxal fosfato como co-fator (LEHNINGER, 2006). O indol formado na primeira parte não é liberado pela enzima, mas move-se através de um canal do sítio ativo da subunidade α para o sítio ativo da subunidade β (TSB), onde ele se condensa com uma base de *Schiff* intermediária derivada da serina e do piridoxal 5-fosfato (PLP). Esse tipo de canalização de intermediários pode ser uma característica da via inteira, que vai do corismato até triptofano (LEHNINGER, 2006).

1.7 Regulação da expressão gênica

A repressão e a atenuação transcricional são maneiras comuns de regulação da expressão gênica em procariotos (HUANG et al., 1999). Tais mecanismos permitem às bactérias responderem rapidamente a mudanças nas condições ambientais e tornam possível a conservação de energia quando os metabólitos estão em fornecimento abundante. O triptofano possui a via de biossíntese mais bioquimicamente dispendiosa dentre os aminoácidos, necessitando a entrada de eritrose-4-fosfato, ATP, fosforibosil pirofosfato, L-glutamina, L-serina e duas moléculas de fosfoenolpiruvato.

É possível que ocorra em algumas situações em que algum triptofano esteja disponível, mas não o suficiente para permitir o crescimento normal caso a síntese deste aminoácido esteja totalmente bloqueada. A inanição de triptofano, quando o suprimento deste aminoácido for inadequado é prevenida por um sistema de modulação em que o volume de transcrição é determinado pela concentração de triptofano. A regulação da via de biossíntese do triptofano ocorre de tal modo que quando o triptofano está presente no meio de cultivo, os genes envolvidos não estão ativos. Ou seja, quando concentrações adequadas de triptofano estão presentes, a transcrição da via é inibida; entretanto, quando o suprimento é insuficiente, a transcrição ocorre (FREIFELDER, 1997).

A regulação desta via de biossíntese em *E. coli* é muito sofisticada, estando sujeita a múltiplos níveis de controle (XIE et al., 2003):

- controle da repressão através do repressor *trpR*
- mecanismo de atenuação mediado pelo peptídeo líder (codificado pelo gene *trpL*)
- inibição por *feedback* da enzima antranilato sintase pelo triptofano.

Em *E. coli*, os genes que compõem o operon *trp* e codificam para as enzimas envolvidas na biossíntese do triptofano são traduzidos a partir de uma única molécula de mRNA policistrônico. O gene *trpE* é o primeiro a ser traduzido e, entre o promotor e o operador, existe a região líder e o atenuador. A proteína regulatória do sistema de repressão do operon *trp* é o produto codificado pelo gene *trpR*. O gene estrutural para o repressor *trpR* não é conectado ao operon *trp* estando localizado distante deste cluster gênico. Mutações tanto neste gene quanto no operador causam uma iniciação constitutiva da transcrição do mRNA *trp*. Esta proteína, chamada aporepressor, não se liga ao operador a não ser que o triptofano esteja presente. O aporepressor e a molécula de triptofano se ligam para formar o repressor ativo, que se une ao operador. Quando o suprimento externo de triptofano é eliminado (ou reduzido substancialmente), o operador permanece desocupado e a transcrição começa. Assim, somente quando o triptofano está presente, a molécula ativa do repressor inibe a transcrição do operon *trp* bem como de um número de genes adicionais incluindo o *aroH* e *aroL* (envolvidos na biossíntese do corismato), *mtr* (um transportador de triptofano), bem como, o próprio *trpR* (PITTARD, 1996). Este é o mecanismo regulatório básico de liga-desliga (FREIFELDER, 1997).

Existe uma carência de trabalhos envolvendo o triptofano em bactérias diazotróficas e até mesmo em endofíticas. Não existem trabalhos com *G. diazotrophicus* que esclareçam como o processo de regulação da expressão dos genes da via de biossíntese deste aminoácido ocorre. Estudos de genômica funcional avaliando diferentes concentrações de triptofano adicionados ao meio de cultivo de *G. diazotrophicus* poderiam auxiliar a esclarecer como essa regulação ocorre neste microorganismo.

– Biossíntese de auxina

A maioria das rotas biossintéticas de AIA se iniciam a partir do precursor principal triptofano, entretanto, a possível presença de uma via independente desse hormônio não deve ser descartada. As rotas são nomeadas em função das moléculas intermediárias produzidas. É importante ressaltar que nem todas as vias são caracterizadas na mesma medida e que podem existir múltiplas vias em um mesmo organismo.

Em plantas, a síntese *de novo* se inicia alguns dias após a germinação e a partir daí as principais fontes de AIA são as folhas jovens próximas ao ápice (LJUNG et al., 2002). Além das folhas jovens, AIA também ocorre em órgãos que estão crescendo ativamente, tais como meristemas apicais da parte aérea, e frutos em desenvolvimento, embora também possa ser produzido em folhas maduras e nos ápices radiculares, onde o nível de produção é usualmente baixo (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Hoje em dia está completamente provado que além das plantas, alguns microrganismos também são capazes de sintetizar AIA (KEVIN, 2003; SPAEPEN et al., 2007). O nosso entendimento sobre a biossíntese de auxina ainda é fragmentado, no entanto, com base nos possíveis intermediários já identificados, nos estudos genéticos e ensaios *in vitro*, pode-se fazer um esboço das vias biossintéticas da auxina em plantas e bactérias (Figura 9).

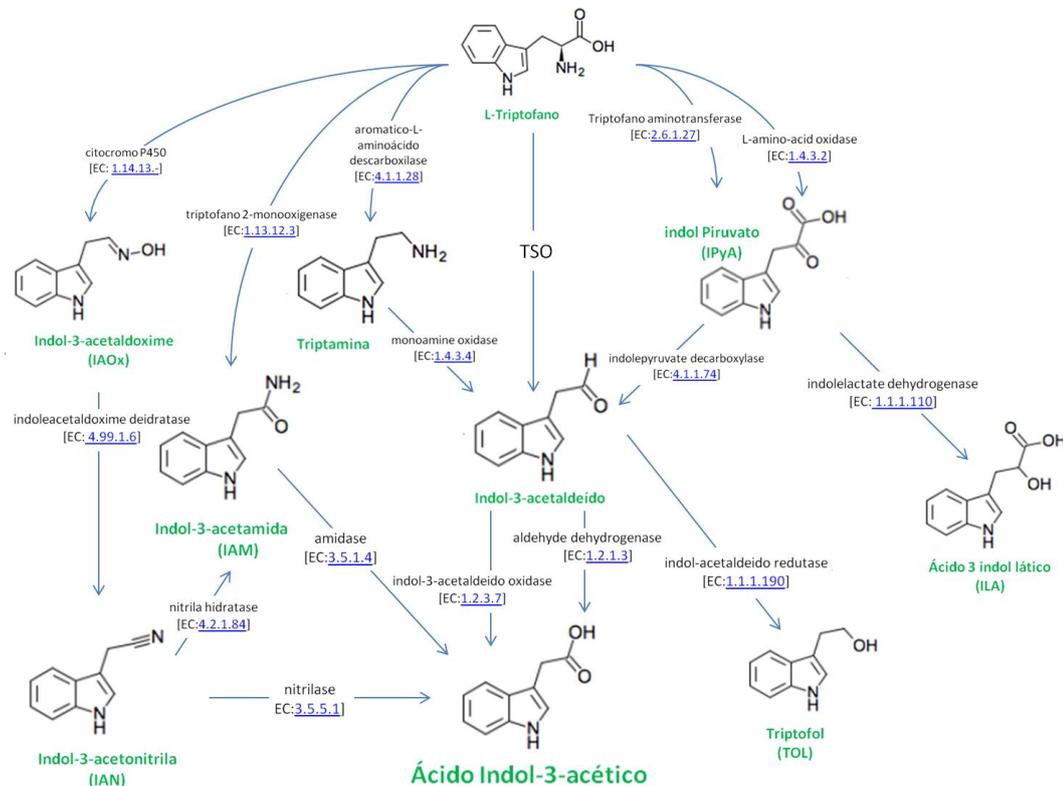


Figura 9: Prováveis rotas biossintéticas de AIA em bactérias (Representação esquemática de Patrícia Galvão adaptada de FU e WANG, 2011).

As rotas da indol-3-acetamida (IAM) e indol-3-piruvato (IPyA) são as mais predominantes em bactérias e, por esta razão, mais conhecidas. A primeira consiste de duas etapas: primeiro o triptofano é metabolizado a IAM através de uma trp-monooxigenase que posteriormente é convertida a AIA por uma IAM hidrolase (amidase) (Figura 10). Esta via já foi caracterizada em diversos patógenos vegetais e algumas estirpes de rizóbios (SEKINE et al., 1989; CLARKE et al., 1993; MORRIS, 1995; GLICKMANN et al., 1998; MANULIS et al., 1998); entretanto, apesar de IAM ter sido detectada em *Arabidopsis*, não há evidências sobre a presença desta via nas plantas (POLLMANN et al., 2002).

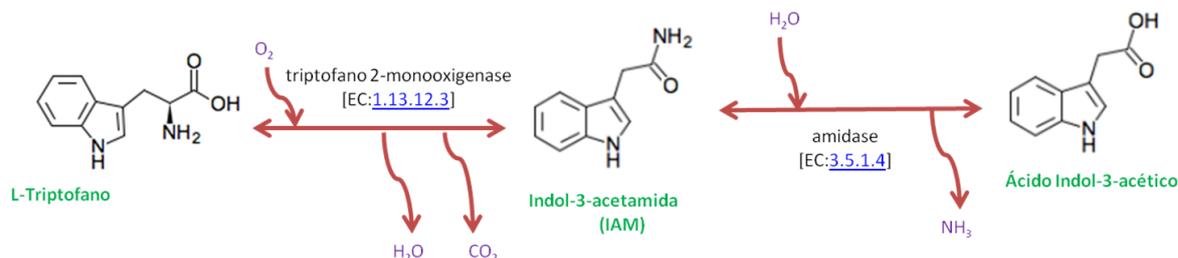


Figura 10: Representação esquemática da via da Indol-3-acetamida (Representação esquemática de Patrícia Galvão baseada no KEGG).

Na via IPyA, o triptofano é primeiramente convertido a IPyA através de uma transaminação por uma trp aminotransferase ou de uma oxidação por uma L-aminoácido oxidase. Em seguida, o IPyA é descarboxilado através da indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC) a indol-3-acetaldeído (IAAld) o qual é oxidado a AIA pela IAAld oxidase ou pela aldeído-desidrogenase (COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995; PATTEN e GLICK, 1996) (Figura 11). Esta via já foi identificada em diversas bactérias, tais como *Pantoea agglomerans*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae*, e *Pseudomonas* (KOGA et al., 1991; BRANDL e LINDOW, 1996; PATTEN e GLICK, 2002a; 2002b).

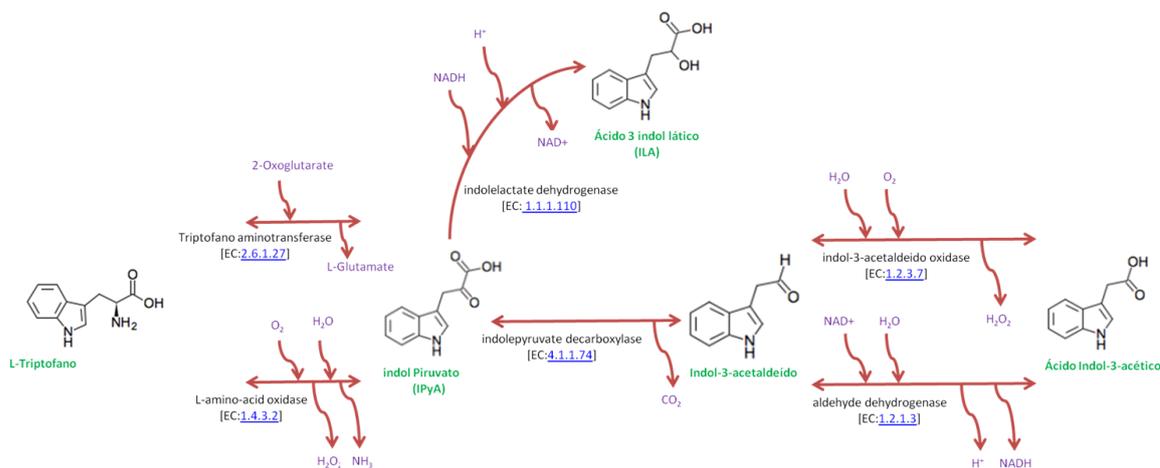


Figura 11: Representação esquemática da via da Indol-3-piruvato (Representação esquemática de Patrícia Galvão baseada no KEGG).

Além dessas duas rotas principais, outras duas – via triptamina (TAM) e indol-3-acetonitrila (IAN) – foram descritas. Na primeira, o triptofano é descarboxilado a TAM e subseqüentemente convertido a IAAld por uma amino-oxidase (HARTMANN et al., 1983) (Figura 12) enquanto que na segunda, algumas nitrilases catalisam a conversão de IAN a AIA (NAGASAWA et al., 1990; KOBAYASHI et al., 1993, 1995;) (Figura 13).

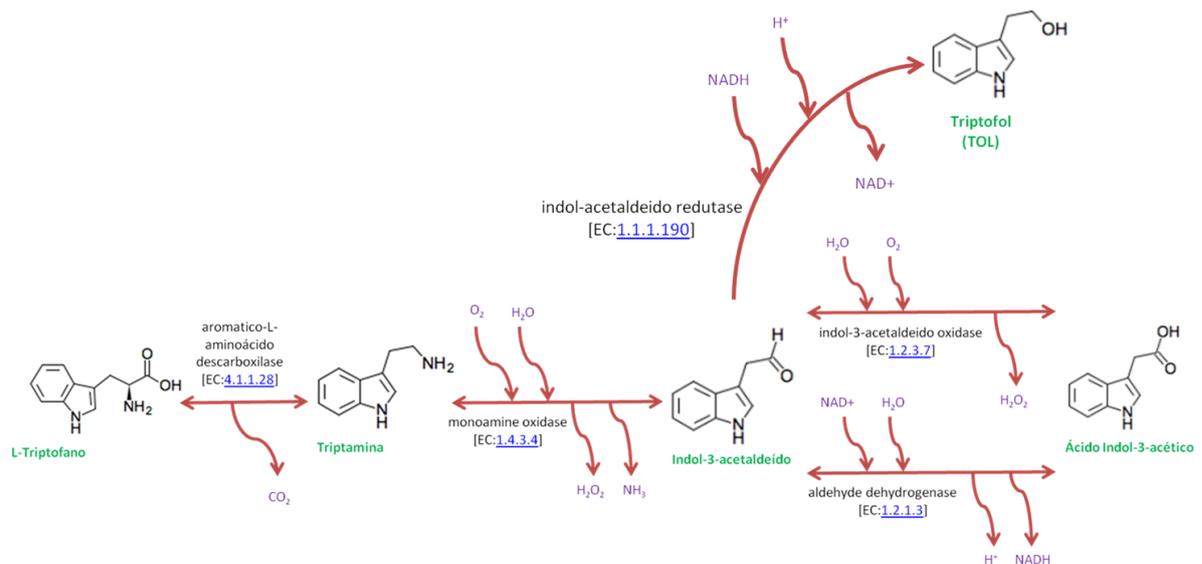


Figura 12: Representação esquemática da via da Triptamina (Representação esquemática de Patrícia Galvão baseada no KEGG).

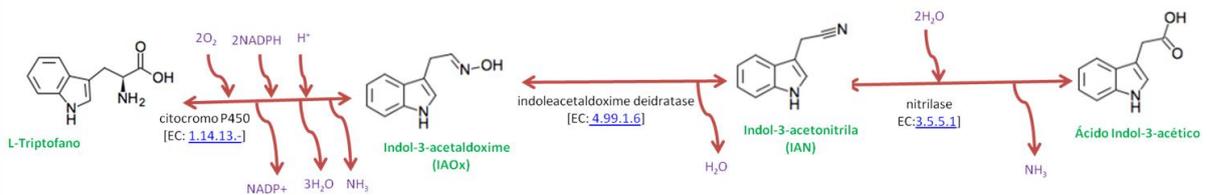


Figura 13: Representação esquemática da via da Indol-3-acetaldoxina (Representação esquemática de Patrícia Galvão baseada no KEGG).

Cerca de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir AIA, indicando que a produção de auxina seja um fator importante na capacidade de promoção do crescimento pelas BPCVs (PATTEN e GLICK, 1996; KHALID et al., 2003). A contribuição deste fitormônio para a promoção do crescimento vegetal já foi demonstrada para as bactérias *Azospirillum brasilense*, *Aeromonas veronii*, *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes piechaudii*, *Bradyrhizobium* spp., *Comamonas acidovorans*, *Enterobacter* spp., *Rhizobium leguminosarum* (VESSEY, 2003) dentre outras, e se dá por meio do aumento do crescimento de raízes e da proliferação e alongamento de pêlos radiculares, o que amplia a absorção de nutrientes pela planta (KEVIN, 2003).

A importância dessa produção por essas bactérias no estímulo vegetal tem sido demonstrada através de estudos de inoculação com mutantes (geralmente mutantes em genes da biossíntese de AIA) (BARBIERI et al., 1986; HARARI et al., 1988; BARBIERI e GALLI, 1993). Todos os mutantes em genes específicos da biossíntese de AIA já obtidos continuam apresentando uma produção residual de AIA, embora os níveis já tenham alcançado redução de 90 a 99%. Todas as tentativas visando o isolamento de um mutante nulo falharam, indicando a redundância das vias biossintéticas de AIA em bactérias (BARBIERI et al., 1986; HARTMANN et al., 1983; PRINSEN et al., 1993; CARRENO-LOPEZ et al., 2000; SPAEPEN et al., 2007). A presença de múltiplas vias em um mesmo organismo sugere que a contribuição de cada uma para a concentração de AIA seja diferente (SPAEPEN et al., 2009).

Uma ligação direta entre a produção de AIA por *Azospirillum* e alterações na morfologia de raízes de trigo foi demonstrada por Dobbelaere et al. (1999). Esses resultados

foram corroborados por outro estudo realizado por Spaepen et al (2008), no qual inoculações com a estirpe selvagem de *Azospirillum brasilense* resultaram em um encurtamento da raiz e aumento na formação de pêlos radiculares, enquanto que a estirpe mutante, e com produção de AIA reduzida devido à interrupção do gene *ipdC* não induziu mais essas mudanças. Ao colonizar as plantas, *A. brasilense* usa os exsudados das raízes para sua proliferação. Conforme esses exsudados se tornam limitados, devido ao crescimento bacteriano, *A. brasilense* aumenta a produção de AIA, levando à formação de raízes laterais e pêlos radiculares, que resultam em mais exsudação. Desta forma, cria-se uma regulação que conecta a proliferação bacteriana e o crescimento das raízes (SPAEPEN et al., 2009).

Em um trabalho com *Brassica* spp, foi observada uma correlação positiva entre a produção de auxina por diferentes estirpes de BPCV e sua capacidade de aumentar a produção de grãos e o número de ramos e vagens por planta (ASGHAR et al. 2002). Dois anos depois, esses resultados foram ratificados, quando Asghar e colaboradores (2004) determinaram nova relação positiva entre a produção de auxina por BPCVs e o aumento no número de ramos e concentração de óleos em *Brassica napus*. De modo similar, a promoção do crescimento de plântulas de *Pinus contorta* inoculadas com o produtor de auxina *Paenibacillus polymyxa* L6 foi justificada pelos níveis aumentados de auxina nas suas raízes (BENT et al., 2001), no entanto, em outro estudo, uma estirpe mutante de *Pseudomonas putida* (com sua produção de AIA aumentada em quatro vezes) perdeu sua habilidade de induzir o alongamento de raízes em plântulas de canola (XIE et al., 1996).

Gluconacetobacter diazotrophicus também produz AIA (BASTIÁN et al., 1998; FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BERTALAN et al., 2009). Em um estudo de inoculação, Sevilla e colaboradores (2001) especularam que a indução do crescimento de cana-de-açúcar por um mutante *nif* de *G. diazotrophicus* pode ter ocorrido devido à liberação desse fitôrmônio.

1.8 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

A bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi descrita por Cavalcante e Döbereiner em 1988 tendo sido nomeada inicialmente como *Sacharobacter nitrocaptans* e, em seguida, como *Acetobacter diazotrophicus* (GILLIS e KERSTERS., 1989). Posteriormente, esta bactéria foi reclassificada como um membro do gênero *Gluconacetobacter* sendo, então, nomeada como *G. diazotrophicus* (YAMADA et al., 1997; YAMADA et al., 1998).

A espécie *G. diazotrophicus* pertence à família *Acetobacteraceae* e subclasse Proteobacteria. Esta família inclui vários gêneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* e *Acidomonas* (YAMADA et al., 1997). O gênero *Gluconacetobacter* possui quatro espécies que apresentam a capacidade de fixar nitrogênio: *G. diazotrophicus*, *G. azotocaptans* e *G. johannae*. (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988; FUENTES-RAMÍREZ et al., 2001; DUTTA e GACHHUI, 2007). Dentre estas espécies *G. diazotrophicus* é a mais estudada principalmente devido aos benefícios que a inoculação desta bactéria tem apresentado em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

Esta espécie foi inicialmente isolada de plantas com altos teores de açúcar e com capacidade de reprodução vegetativa: batata-doce, (*Ipomoea batatas* L.), capim-elefante (*Pennisetum purpureum* S.) além da cana-de-açúcar (DÖBEREINER et al., 1995a; BALDANI et al., 1997). O seu isolamento também foi descrito em plantas de café (*Coffea arabica* L.) e de abacaxi (*Ananas comosus* L.) (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997; TAPIA-HERNANDEZ et al., 2000). Nestas plantas, foi observado que *G. diazotrophicus* é capaz de colonizar o interior dos tecidos distribuindo-se nos espaços intercelulares e vasos do xilema de folhas, colmos e raízes (JAMES et al., 2001). Além disso, *G. diazotrophicus* também foi

isolada de esporos de fungos micorrízicos arbusculares, de insetos que infestam a cana-de-açúcar, como a cochonilha (*Saccharococcus sacchari*) e de outras espécies de plantas (SARAVANAN et al., 2004). A infecção e colonização da cana-de-açúcar pela *G. diazotrophicus* foi demonstrada por meio de microscopia eletrônica e ótica (JAMES et al., 1994; OLIVARES et al., 1996). Na superfície da raiz, a bactéria se concentra nas regiões de junção de raízes laterais (JAMES et al., 1994). Dentro da raiz, pode ser vista, no interior, de células da epiderme e nos espaços intercelulares do parênquima, bem como dentro de vasos do xilema, através dos quais a bactéria parece migrar para a parte aérea da cana-de-açúcar (DONG et al., 1994).

Esta bactéria parece ser bem adaptada à vida dentro da cana-de-açúcar, uma vez que o seu melhor crescimento ocorre em pH 5,5 e na presença de 10% de sacarose, as mesmas condições encontradas dentro desta planta (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; GILLIS e KERSTERS, 1989). Ao ser cultivada em meios de cultura ricos em sacarose, esta bactéria produz ácido glucônico que faz com que o pH caia abaixo de 3 e, apesar disso, ainda continua a ocorrer a FBN (STEPHAN et al., 1991). São bactérias Gram-negativas, com capacidade de fixar nitrogênio em condições microaerófilas (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1998), isoladas em meio semi-sólido LGI-P (REIS, 1994) que, após o período de sete a dez dias, apresentam uma película alaranjada, e o meio localizado abaixo da película torna-se incolor devido à assimilação do azul de bromotimol (DÖBEREINER et al., 1995b). *G. diazotrophicus* é considerada um diazotrófico aero-tolerante no qual o oxigênio é fundamental para a geração de grandes quantidades de ATP requerida para a fixação de nitrogênio. A sacarose a 10% é a fonte de carbono que melhor promove o seu crescimento, mas outros compostos também servem de fonte de carbono para esta bactéria, como: gluconato, glicose, frutose, manitol, arabinose, meso-inositol, i-inositol, sorbitol, glicerol, galactose e gluconate de sódio (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999). Esta bactéria é muito sensível a condições secas, mas tem alta tolerância a tratamentos de calor e concentrações de sais no meio de cultura (TEJERA et al., 2003) não sendo eliminada quando submetida a tratamento térmico (50°C por 2 a 3 horas), usualmente usado para controle de patógenos causadores de doenças na cana-de-açúcar (ORTEGA et al., 2001).

Diversos experimentos de inoculação com *G. diazotrophicus* reportaram melhorias na nutrição nitrogenada, incrementos na produtividade de colmos e na sobrevivência de plantas de cana-de-açúcar inoculadas, além de acréscimos no comprimento das raízes e do volume radicular (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; MUÑOZ-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003). Além disso, têm sido observados efeitos benéficos desta interação na germinação, no perfilhamento, na altura da planta, bem como na absorção de nutrientes (SUMAN et al., 2005).

Apesar de estabelecida a contribuição da FBN para a cultura da cana-de-açúcar, resultados obtidos utilizando mutantes de *G. diazotrophicus* incapazes de fixar o nitrogênio atmosférico mostraram que a promoção do crescimento observado em cana-de-açúcar pode ser atribuída a outros mecanismos (SEVILLA et al., 2001). Neste estudo foi reportado, pela comparação entre plantas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com estirpes selvagens (PAL5) e mutantes nif (MAd3A), que apesar de ambas as estirpes colonizarem as plantas igualmente, foram observadas diferenças no crescimento das plantas. Em condições deficientes de N, as plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a PAL5 cresceram melhor e tiveram superior conteúdo de N que as plantas inoculadas com a MAd3A ou não inoculadas, indicando que a FBN é um mecanismo significativo na promoção do crescimento nesta interação. Por outro lado, quando o N não foi limitante, foram observados aumentos no crescimento das plantas inoculadas tanto com a estirpe selvagem quanto o mutante MAd3A, sugerindo a existência de outros mecanismos envolvidos na promoção do crescimento além da FBN (SEVILLA et al., 2001). De acordo com estes autores, este

mecanismo adicional na promoção do crescimento da cana-de-açúcar por *G. diazotrophicus* pode estar relacionado à produção de fitormônios, em especial as auxinas.

Em *G. diazotrophicus*, a biossíntese de AIA é pouco estudada e, conseqüentemente, todas as enzimas e genes que estão envolvidos na biossíntese deste fitormônio não foram até o momento determinados. De modo semelhante, a função deste fitormônio na interação entre *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar, e a sua importância como mecanismo de promoção do crescimento vegetal ainda não são totalmente conhecidos.

Um trabalho realizado pelo grupo do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia (RODRIGUES, 2008) estudou as vias de biossíntese e os genes envolvidos na produção de auxinas em *G. diazotrophicus*, através de análises de similaridade, utilizando ferramentas como bioinformática. Neste trabalho também foram gerados mutantes aleatórios pela inserção do Tn5 no DNA da estirpe selvagem PAL5^T que foram avaliados quanto à produção de auxinas. Diante de todas as possibilidades existentes de biossíntese de AIA descritas acima, fica evidente a necessidade de se aprofundar os estudos com os mutantes de *G. diazotrophicus* defectivos na produção de auxina, e desta forma esclarecer quais enzimas e genes estão envolvidos na biossíntese deste fitormônio, a sua função na interação entre *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar, e a sua importância como mecanismo de promoção do crescimento vegetal. A partir desse ponto de vista, cerca de 6.0000 mutantes de uma biblioteca de mutantes aleatórios de *G. diazotrophicus* PAL5 obtida a partir da inserção de uma versão do elemento de transposição Tn5, presente no kit de mutagênese randômica *EZ-Tn5TM <KAN-2>Tnp TransposomeTM* (Epicentre[®]) foi avaliada quanto à produção de auxinas (RODRIGUES, 2008), utilizando o método colorimétrico de *Salkowisk* para quantificação de compostos indólicos no sobrenadante (SARWAR e KREMER, 1995). Destes, alguns mutantes exibiram significativa alteração na quantidade de auxinas, sendo que Gdiaa01 e Gdiaa34 apresentaram o Tn5 inserido em sítios diferentes de uma mesma ORF (GDI2456). No mutante Gdiaa01 a inserção ocorreu entre os nucleotídeos 322 e 323, e no Gdiaa34 entre os nucleotídeos 522 e 523. A ORF GDI2456 codifica para uma L-aminoácido oxidase, presente na via IPyA de biossíntese de auxina. Este mutante, nomeado neste trabalho como lao⁻, apresentou redução de 95% da produção de compostos indólicos, mostrando-se uma excelente estirpe AIA⁻ promissora para o estudo de promoção de crescimento por bactérias. Portanto, esse mutante foi selecionado e empregado em estudos de genômica funcional e inoculação em cana-de-açúcar visando compreender melhor a importância da auxina na promoção de crescimento desta cultura e na interação planta-microorganismo. Nas avaliações realizadas neste mesmo estudo de Rodrigues (2008), foi observado que a produção de AIA por *G. diazotrophicus* foi dependente da adição do triptofano ao meio de cultura sugerindo que nesta bactéria este aminoácido é o precursor do AIA, contudo, a possibilidade de existir uma rota independente do triptofano deve ser também considerada. Uma vez confirmada a necessidade da presença do triptofano para a detecção da produção de compostos indólicos em PAL5, realizar estudos cultivando estirpe em diferentes concentrações deste aminoácido poderiam auxiliar a entender melhor sua real importância na biossíntese deste fitormônio nesta bactéria.

Esta tese encontra-se estruturada em dois capítulos. O primeiro capítulo busca responder diversas questões sobre a influência do triptofano na biossíntese de AIA de *G. diazotrophicus* e, conseqüentemente esclarecer ainda mais as relações de interação destes microorganismos com plantas. Para tanto, apresenta análises dos perfis de proteínas obtidos ao cultivar PAL5 e o mutante lao⁻ na presença e ausência de triptofano.

Já no segundo capítulo, fez-se uso dos mutantes lao⁻ e *nif* de *G. diazotrophicus* na inoculação de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas com o objetivo de definir a influência das auxinas produzidas por este microorganismo na promoção de crescimento dessa cultura e na interação planta-microorganismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Analisar a expressão diferencial de proteínas da estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus* e da mutante defectiva na produção de auxina (lao⁻) em diferentes condições de cultivo e, avaliar a promoção de crescimento por estas estirpes durante a interação com cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos Específicos:

2.2.1 Realizar análise proteômica diferencial das estirpes selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus* e mutante lao⁻ na ausência e presença de triptofano no meio de cultivo.

2.2.2 Avaliar o mutante de *G. diazotrophicus* defectivo na produção de auxina (lao⁻) quanto a sua capacidade de colonização e promoção de crescimento vegetal de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas.

3 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O triptofano exerce papel relevante na biossíntese de AIA em *G. diazotrophicus* PAL5 no mutante lao⁻ e a síntese de fitormônio AIA por essa bactéria auxilia na promoção do crescimento da cana-de-açúcar.

CAPÍTULO I

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DAS ESTIRPES SELVAGEM PAL5 E MUTANTE LAO⁻ DE *G. diazotrophicus* CULTIVADAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE TRIPTOFANO

RESUMO

Estudos *in vitro* têm mostrado que o aminoácido triptofano está envolvido na biossíntese de compostos indólicos em diversas bactérias incluindo a *G. diazotrophicus*. Entretanto, não se conhece em detalhes o papel desempenhado pelo aminoácido durante o crescimento da bactéria. Neste sentido, o presente estudo avaliou o efeito da adição do triptofano (100 μ M) no perfil de expressão de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 e seu mutante defectivo na produção de compostos indólicos (*lao*⁻) através da técnica de 2DE-PAGE. A análise computacional das amostras de proteínas oriundas das bactérias cultivadas na ausência e na presença de triptofano em meio LGI-P resultou na detecção de “spots” com massa molecular entre 10 e 250 kDa, e pontos isoelétrico compreendendo a faixa 4 a 7 e que apresentaram expressão diferencial relativa. A análise por espectrometria de massa permitiu a identificação de 24 proteínas diferentes. A maioria das proteínas com a expressão diminuída em PAL5 quando cultivada em meio com triptofano em relação ao meio de cultivo sem o aminoácido pertenceu à categoria modificação pós-traducional, turnover de proteínas e chaperonas enquanto que no mutante *lao*⁻ cultivado nas mesmas condições, a maioria das proteínas que apresentaram expressão diferencial pertencia à categoria produção e conversão de energia. Em adição, a maioria das proteínas que foram diferencialmente expressas no mutante *lao*⁻ em comparação com a estirpe selvagem PAL5 pertenciam à categoria metabolismo e transporte de carboidratos. Por outro lado, não foram observadas proteínas relacionadas com a biossíntese de triptofano para nenhuma das condições analisadas possivelmente devido ao baixo rendimento das identificações das proteínas diferencialmente expressas durante a espectrometria. O presente estudo é pioneiro nas análises proteômicas com mutantes de *G. diazotrophicus* PAL5 em especial com mutantes defectivos na produção de AIA. Além disso, é o primeiro trabalho de genômica funcional com *G. diazotrophicus* PAL5 envolvendo o aminoácido triptofano e sua participação no metabolismo desta bactéria. Embora a quantidade de proteínas diferencialmente expressas tenha sido pequena, possivelmente pela rigidez estatística aplicada na seleção dos spots e a baixa eficiência de proteínas identificadas pela espectrometria, a análise ajudou a responder algumas questões sobre a influência deste aminoácido na biossíntese de AIA e, conseqüentemente deverá contribuir para o maior entendimento da interação desta bactéria com plantas de cana-de-açúcar.

Palavras - chave: proteômica diferencial, triptofano, mutante AIA⁻

ABSTRACT

In vitro studies have shown that the amino acid tryptophan is involved in indole compounds biosynthesis in various bacteria including *G. diazotrophicus*. However, it is unknown in detail the role played by tryptophan during the growth of bacteria. In this study, we evaluated the effect of tryptophan addition in the protein expression profile of *G. diazotrophicus* PAL5 and its defective mutant in the production of indole compounds (IAA⁻) through the 2DE-PAGE technique. The computer analysis of protein samples derived from bacteria grown in LGI medium with and without tryptophan resulted in the detection of "spots" with molecular weight between 10 and 250 kDa and isoelectric points comprising the pH range 4-7 and that showed differential relative expression. The mass spectrometric analysis allowed the identification of 24 different proteins. The majority of proteins with reduced expression in PAL5 grown in medium containing tryptophan compared to the culture medium without the amino acid belonged to post-translational modification, protein turnover and chaperones category while the proteins from the mutant IAA⁻ cultured in the same conditions that showed differential expression belonged to the production and energy conversion category. In addition, most of the proteins that were differentially expressed in IAA⁻ mutant as compared to wild type strain PAL5 belonged to transport and metabolism of carbohydrates category. Furthermore, it was not observed proteins related to the tryptophan biosynthesis to all the studied conditions possibly due to the low yield of the differentially expressed proteins identification during spectrometry. This study is pioneer in proteomic analyzes with *G. diazotrophicus* PAL5 mutants in particular defective mutants in the IAA production. Moreover, it is the first study on functional genomics with *G. diazotrophicus* PAL5 involving the amino acid tryptophan and its involvement in the metabolism of this bacterium. Although the number of differentially expressed proteins was small, possibly due to the applied statistics in the spots selection and the low efficiency of proteins identified by spectroscopy, the analysis helped to answer some questions about this amino acid influence in IAA biosynthesis in these bacteria and therefore should contribute to a better understanding of the microorganism interaction with sugarcane plants.

Keywords: differential proteomics, tryptophan, IAA⁻ mutant

1 INTRODUÇÃO

1.1 O proteoma

O sequenciamento de genomas provê um grande número de informações que sugerem possíveis modos de expressão dos genes e prevê rotas funcionais. Essas informações são necessárias para o entendimento dos sistemas biológicos, porém o genoma em si é estático porque representa o modelo para todas as propriedades celulares que uma célula é capaz de desenvolver (SPEICHER, 2004). Inúmeros projetos genoma vêm sequenciando genes de organismos inteiros e gerando uma grande quantidade de informações que, independentemente, não traduzem o funcionamento real das complexas redes reguladoras e o metabolismo da célula (SANTOS et al., 2004). As diversas funções das proteínas não podem ser apenas baseadas nas sequências de nucleotídeos dos genes que codificam, pois elas podem sofrer modificações pós-traducionais como clivagem proteolítica, fosforilação, acetilação, alquilação, metilação, sulfatação, isoprenilação, glicosilação, ubiquitilação e formação de pontes dissulfeto (CAHIL et al., 2001). As vantagens de se ter sequências genômicas completas são limitadas, especialmente quanto à anotação da função, que não ultrapassa um terço dos genes; quanto a prever a existência ou não de uma via metabólica; fornecer dados sobre eventuais modificações pós traducionais nem do controle da atividade em resposta a condições particulares e, ainda, quanto a estimular descobertas e sugerir uso prático para as sequências genômicas (GALPERIN e KOLKER, 2006). O estudo da expressão gênica através dos níveis protéicos pode ajudar a suprir essa carência de informação (DUNN, 2005). A informação do proteoma complementa a do genoma, contribuindo para o entendimento da função do gene (PANDEY e MANN, 2000). O termo proteoma, em analogia ao termo genoma, foi utilizado pela primeira vez em meados da década de 90 por Mark Wilkins para descrever o conjunto completo de proteínas que um organismo produz sob condições pré-definidas (WILKINS e PASQUALI, 1996). É fundamental para a sobrevivência, que a composição de proteínas de uma célula seja constantemente ajustada para enfrentar os desafios das mudanças nas condições ambientais (PARK, 2004).

O proteoma está constantemente mudando em resposta a estímulos externos e, ainda, durante o seu desenvolvimento, sendo muito mais complexo e mais dinâmico do que o genoma (SPEICHER, 2004). A estrutura tridimensional da proteína também vai influenciar no papel funcional que será desempenhado por ela (KAZMI e KRULL, 2001) uma vez que o modo como a cadeia de aminoácidos se dobra e redobra para produzir as configurações tridimensionais características é, na verdade, a chave da sua função. Portanto, a forma estrutural mais estável pode variar de acordo com as condições do meio (KASTRITIS e BONVIN, 2010). Como o proteoma reflete o estado atual da célula ou organismo em qualquer dado conjunto de condições, é uma ponte essencial entre o transcriptoma e o metaboloma (VITAMVAS et al., 2007). Um mesmo genoma pode potencialmente originar um número infinito de proteomas (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

O surgimento da proteômica está diretamente relacionado à necessidade de se investigar o controle da expressão gênica e o impacto dos produtos protéicos no metabolismo de células, tecidos ou órgãos (WILKINS e SANCHEZ, 1996). Neste contexto, a proteômica é a ciência que estuda sistematicamente um proteoma, avaliando quantitativa e qualitativamente as proteínas que atuam no metabolismo celular (CHEN e HARMON, 2006). A proteômica é uma ciência dirigida pela descoberta e, portanto, não possui dados prévios, promovendo intrigantes e novas oportunidades para o avanço do conhecimento. O estudo da proteômica tem implicações diretas em vários campos da biologia, da biotecnologia e da bioquímica, gerando conhecimento sem precedentes que permite a descoberta de vias metabólicas nas

diversas etapas celulares, a identificação de novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais levando ao desenvolvimento de novos medicamentos, novos diagnósticos e novas técnicas terapêuticas, além de permitir também a identificação e caracterização de moléculas exógenas ou endógenas específicas de um determinado estado fisiológico (ROCHA et al., 2005, KUHNER et al., 2009; SANTOS et al., 2004). Portanto, a identificação de proteínas diferencialmente expressas permite associar a estes polipeptídeos diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, possibilitando uma nova visão dos sistemas biológicos (KORKUMAT et al., 2006).

As proteínas são atualmente estudadas através da combinação de diferentes tecnologias, incluindo a eletroforese de gel de poliacrilamida uni e bidimensional, espectrometria de massa, cromatografia líquida multidimensional e técnicas de bioinformática (PARDANANI et al., 2002). A proteômica têm como objetivo isolar e identificar proteínas, estudar suas propriedades, seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações protéicas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK et al., 1999).

Um experimento proteômico típico pode ser dividido em partes: a separação e o isolamento das proteínas, a obtenção de informação estrutural da proteína a fim de identificá-la e caracterizá-la, e a utilização de bancos de dados (GRAVES e HAYSTEAD, 2002). Usualmente, a primeira etapa consiste em gerar géis bidimensionais com o maior número possível de proteínas identificadas. A partir destes géis de referência, são realizadas análises comparativas visando estudar a resposta celular a diferentes estímulos. Estes estudos fornecem dados importantes no que diz respeito à expressão diferencial de proteínas e suas modificações pós-traducionais (KAZEMI-POUR et al., 2004).

– O 2DE-PAGE

A eletroforese é uma técnica de separação que se baseia na migração de moléculas carregadas em função da aplicação de um campo elétrico (ROCHA et al., 2005). Os primeiros estudos proteômicos empregaram a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (2DE PAGE). Esta técnica foi pioneiramente descrita por O'FARREL (1975) e KLOSE (1975), visando a separação de misturas complexas de proteínas. Devido à sua resolução e sensibilidade, esta técnica é uma ferramenta poderosa para a análise e detecção de proteínas a partir de fontes biológicas complexas porque permite separar simultaneamente centenas de proteínas diferentes e suas isoformas (HAYNES et al., 2000). Além disso, o 2DE PAGE, não só fornece informações sobre modificações de proteínas e/ou alterações em seus níveis de expressão, como também permite o isolamento de proteínas para posterior análises estruturais por espectrometria de massa (GÖRG et al., 2007). Uma característica adicional da técnica de 2DE PAGE é a sua capacidade de estudar proteínas que sofreram algum tipo de modificação pós-traducionais, tais como: glicosilação fosforilação, ou proteólise limitada e que podem, em muitos casos, ser facilmente localizadas em géis 2DE.

A 2DE PAGE consiste em duas corridas eletroforéticas sequenciais. Na primeira dimensão (IEF, IsoEletoFocalização) a tira contendo o gel deve conter uma mistura de anfólitos, que são capazes de tamponar de modo uniforme a faixa de pH desejável, formando um gradiente, além de uréia, detergentes e dithiothreitol (DTT). As proteínas são, então, separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica. Elas migram em direção à sua carga, impulsionadas pela força de um campo elétrico, até que encontre o pH onde sua carga seja nula, atingindo uma posição neutra, denominada repouso (Figura 14).

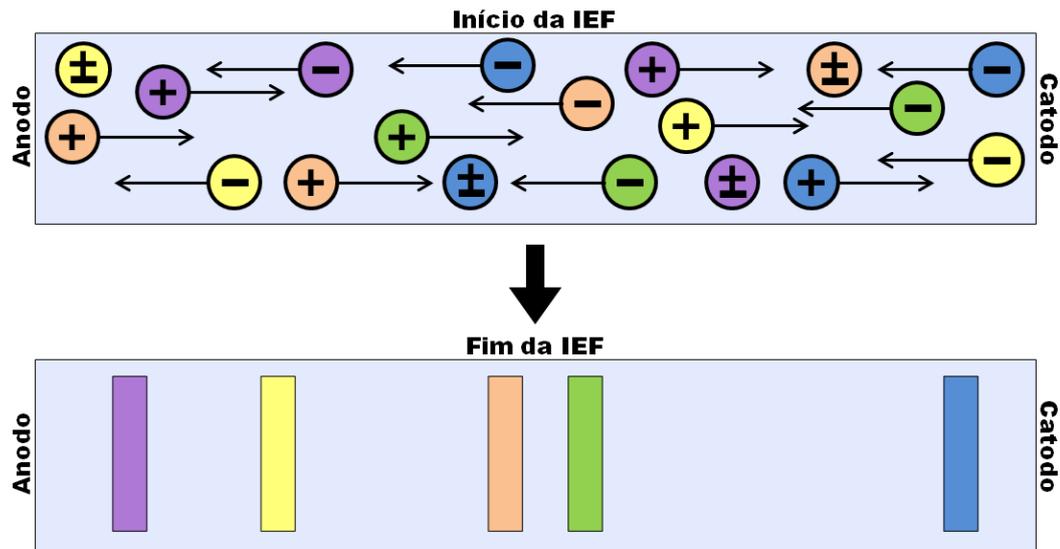


Figura 14: Representação esquemática da primeira dimensão da eletroforese bidimensional. Neste esquema vê-se a focalização isoelétrica de uma mistura de proteínas que se distribuem em cinco grupos de ponto isoelétrico diferentes, representados pelas cores: roxa, amarela, laranja, verde e azul; No início da focalização, ocorre a migração das proteínas para o pólo negativo (catodo) e para o pólo positivo (anodo) segundo suas cargas até que as proteínas encontrem o pH no qual as suas cargas se tornam nulas - o pI (Representação esquemática de Patrícia Galvão, adaptada de Dos Santos, 2008).

Após esta primeira etapa, tem-se a segunda dimensão, onde é feita a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, no qual as proteínas distribuídas de acordo com seu pI são separadas conforme suas massas moleculares por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês, *E*letroforese em *G*el de *P*oli*A*crilamida) (O'FARRELL, 1975). Essa eletroforese apresenta uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de bis-acrilamida (N,N'-Metileno-bis-acrilamida), cuja porosidade depende da concentração destes reagentes no gel. Nesta etapa, todas as proteínas são tratadas com SDS visando apresentarem a mesma carga e separarem-se no gel, sem influência de suas cargas nativas, uma vez que o SDS confere a todas as proteínas a mesma carga (Figura 15) (RABILLOUD, 2000; WITTMANN-LIEBOLD, 2006). Ao final do processo é obtido um mapa bidimensional da amostra, onde as proteínas são separadas com base no seu ponto isoelétrico na horizontal, e massa molecular na vertical (WESTERMEIER, 2004), podendo ser visualizadas no gel através de métodos de coloração com azul brilhante de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue* - CBB), prata, compostos fluorescentes, autoradiografia ou detecção com imunológicos, contendo múltiplas cópias de uma proteína em cada banda ou *spot* (GÖRG *et al.*, 2004). Entre os métodos com CBB, o coloidal com CBB G-250 é o mais sensível, revelando nanogramas de proteínas (NEUHOFF, 1988). Recentemente este método foi modificado, visando aproximar-se da sensibilidade obtida com a coloração por prata, por esta razão, chamado de *Blue Silver* (CANDIANO *et al.*, 2004).

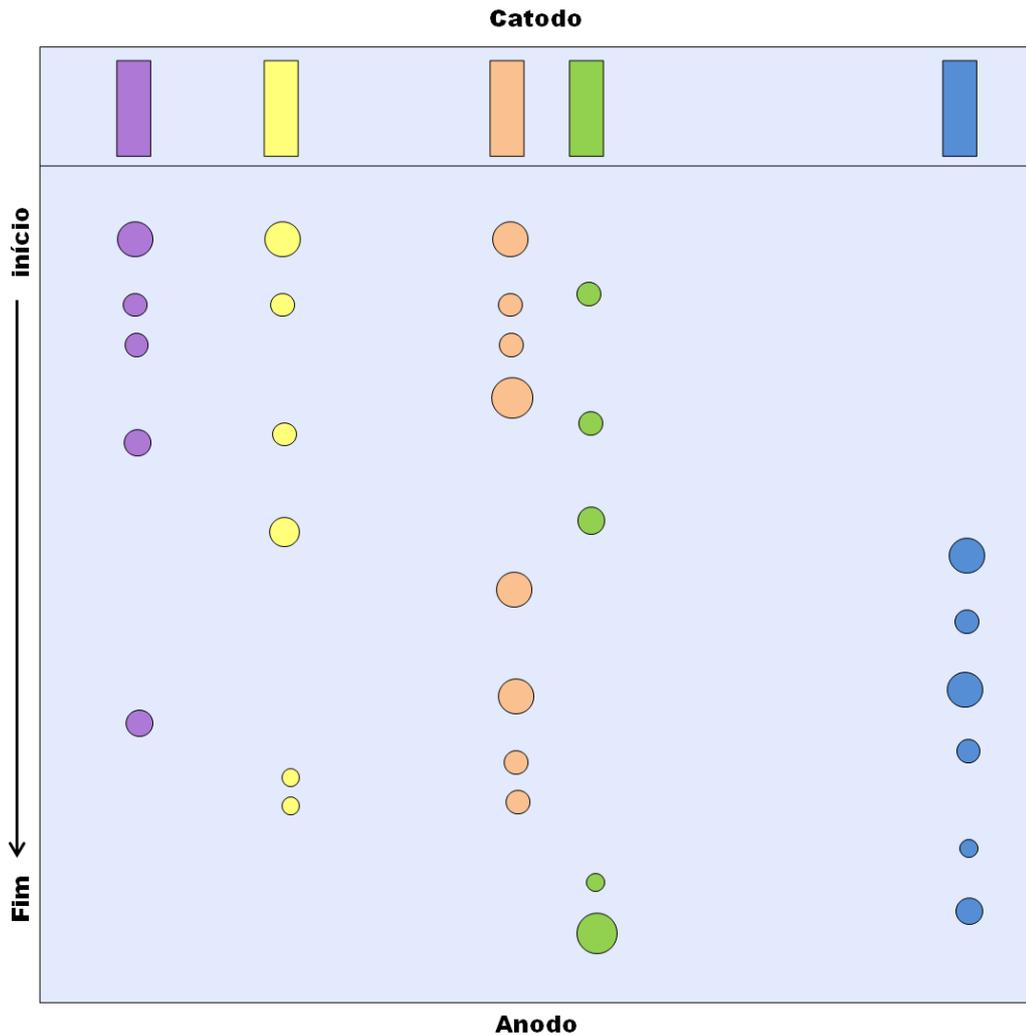


Figura 15: Representação esquemática da segunda dimensão da eletroforese bidimensional. Após a primeira dimensão, a tira de IPG é disposta sobre o gel de SDS – PAGE onde ocorre a separação por volume molecular das proteínas (Representação esquemática de Patrícia Galvão, adaptada de Dos Santos, 2008).

Esses mapas bidimensionais são usados com duas finalidades gerais: a separação do conjunto das proteínas para identificação em larga escala, quando se estuda o proteoma preditivo do sistema e, para estudo de expressão diferencial, comparando-se duas ou mais amostras para verificar diferenças de expressão de suas proteínas (ASHCROFT, 2003). Para isto é necessária a preparação das réplicas biológicas e de técnicas confiáveis para obtenção de resultados (HUNT, 2005; THOMAS et al., 2005).

Essa metodologia sofreu algumas melhorias, especialmente na primeira dimensão, que tornaram o método mais reprodutivo. Em 1982 (BJELLQVIST et al., 1982), o gradiente de pH imobilizado (IPG - **g**radiente de **pH I**mmobilizado) foi introduzido na primeira dimensão da 2DE-PAGE. Esse gradiente é estabelecido através do acoplamento químico entre a matriz de poliacrilamida e moléculas orgânicas anfóteras de baixa massa molecular, sob ação de um campo elétrico, o que ameniza o problema de reprodutibilidade. Na segunda dimensão, géis preparados em maiores dimensões permitiram a separação de proteínas presentes em misturas complexas em maior área e em quantidades preparativas. Dependendo do tamanho do gel e gradiente de pH usado, o 2DE PAGE pode resolver mais de 5.000 proteínas simultaneamente na faixa de 3-10 de pH e de 10 a 300 kDa, (GÖRG, 2000; OBERMAIER et al., 2000; GÖRG, 2004; WEISS et al., 2004; WITTMANN-LIEBOLD, 2006; GÖRG et al., 2007), assim como também é capaz de distinguir entre proteínas com modificações pós-traducionais e não

modificadas (ASHCROFT, 2003). No entanto, esta metodologia ainda apresenta algumas limitações como a resolução de proteínas pouco abundantes e de alta massa molecular. Por ser sensível apenas para proteínas entre 10-100 kDa de massa molecular torna impossível a análise de todas as proteínas de uma amostra. Além disso, proteínas de membrana apresentam baixa solubilidade devido à sua alta hidrofobicidade, e tendem a agregarem-se. Dessa forma, o processo de solubilização de proteínas é um passo muito importante em estudos proteômicos, tornando-se um desafio (BRAUN et al., 2007). Em adição, proteínas muito ácidas ou básicas, bem como proteínas pouco comuns (menos de 10.000 cópias por célula) também tendem a não serem identificadas (WEHR, 2001).

1.2 Estudos de proteômica em *G. diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 foi completamente sequenciada em 2009 por Bertalan e colaboradores (2009). Seu genoma é composto de um cromossoma de aproximadamente 3,9 Mb e dois plasmídeos de 16,6 e 38,8 kb cada um e possui o conteúdo de G+C de 66.19%. Os autores anotaram 3.938 ORFs, estando alguns de seus genes envolvidos com fixação biológica de nitrogênio, metabolismo de açúcar, sistemas de transporte, biosíntese de polissacarídeos, *quorum sensing* e biosíntese de auxina. Após o sequenciamento completo dessa estirpe, muita informação foi gerada, sendo necessária uma ampla investigação a fim de caracterizar e contextualizar as ORFs anotadas. Contudo, poucos estudos de genômica funcional, em especial análises de proteômica, foram publicados envolvendo *G. diazotrophicus*.

O primeiro trabalho descrevendo o perfil de proteínas dessa bactéria foi publicado em 2008 por Lery e colaboradores (2008a). Neste trabalho os autores obtiveram a cobertura proteômica através de duas abordagens diferentes: 2DE seguido de MALDI-TOF ou TOF-TOF MS e 1-DE seguido de cromatografia em uma coluna C18 acoplada a um espectrômetro de massa ESI-Q-TOF ou ESI-IT. Eles obtiveram 583 proteínas identificadas distribuídas em diferentes categorias funcionais como: vias metabólicas de nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos e lipídeos, além de cofatores e produção de energia.

No mesmo ano, Lery et al (2008b) realizaram um estudo de proteômica com *G. diazotrophicus* PAL5 em fase exponencial e estacionária na presença de altos ou baixos níveis de nitrogênio. A abordagem adotada foi 2DE e 131 proteínas diferencialmente expressas puderam ser observadas. Após a espectrometria de massa e as análises de bioinformática, dessas 131 proteínas, 46 foram identificadas. Os autores observaram proteínas relacionadas com metabolismo de DNA e de energia, cofator, homeostase citoplasmática, transportadores, etc e, quando cultivadas sob baixas concentrações de N, proteínas-acessório da fixação de nitrogênio, com papel na biosíntese e estabilização da nitrogenase foram mais expressas.

Para melhor entender as interações planta-bactéria, foi conduzido um estudo avaliando o perfil de proteínas produzido por *G. diazotrophicus* quando em associação com plantas de cana-de-açúcar (DOS SANTOS et al., 2010). Os autores avaliaram a expressão diferencial das proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 após inoculação *in vitro* em plântulas de cana-de-açúcar SP70-1143 micropropagadas através da técnica de 2DE. O trabalho informa que 42 *spots* apresentaram níveis de expressão alterados quando comparados os perfis de proteínas obtidas das bactérias que haviam sido co-cultivadas com as plântulas e aquelas apenas cultivadas em meio de cultivo. Trinta e oito proteínas foram identificadas e associadas ao metabolismo de carboidratos e energia, e processos de envelopamento e degradação. Quando co-cultivadas com as plântulas de cana-de-açúcar, um fator transcricional de alongamento, uma chaperonina e uma lipoproteína de membrana, dentre outras apresentaram expressão diferencial. Os resultados obtidos permitiram a avaliação da significância fisiológica de determinadas

proteínas para o metabolismo de *G. diazotrophicus* e para as vias envolvidas na interação planta-bactéria.

Mais recentemente, Lery e colaboradores (2011) realizaram um estudo com o intuito de investigar alguns aspectos moleculares da interação de *G. diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar. Para tal, esses autores marcaram as plântulas de cana-de-açúcar das variedades SP70-1143 (altamente responsiva a FBN) e Chunne (baixa resposta a FBN) e as células de *G. diazotrophicus* PAL5 através da substituição de NH_4NO_3 e KNO_3 por $^{15}\text{NO}_3$ e K^{15}NO_3 nos meio de cultivos. Após o cultivo, as plântulas foram inoculadas com 10^5 UFC.ml⁻¹ de células bacterianas e, um dia após a inoculação, as raízes e o meio de cultivo foram coletados e suas proteínas extraídas e utilizadas em análises de proteômica baseadas em espectrometria de massa quantitativa através da marcação metabólica com ^{15}N das bactérias, amostras de raiz, e co-culturas. De maneira geral, esses autores analisaram mais de 400 proteínas e 78 delas foram diferencialmente expressas entre a bactéria controle e o co-cultivo com as plântulas de cana. Uma análise comparativa de PAL5 em interação com os dois genótipos de cana-de-açúcar revelaram proteínas com papel fundamental no reconhecimento celular. A bactéria apresentou proteínas envolvidas na adaptação a condições atípicas e sistemas de sinalização durante a interação com ambos os genótipos, entretanto, SP70-1143 e Chunne mostraram respostas divergentes em contato com a bactéria. O genótipo altamente responsivo a FBN (SP70-1143) superexpressou proteínas de cascata de sinalização, enquanto que o genótipo de baixa resposta a FBN (Chunne) sintetizou diferencialmente proteínas envolvendo a remodelagem da cromatina e vias de degradação de proteínas. As células bacterianas oriundas de ambos os sistemas de co-cultivo apresentaram expressão aumentadas de proteínas envolvidas em vias de sinalização e metabolismo, o que deve ter auxiliado às bactérias a sobreviverem a adaptarem-se ao novo ambiente. Os resultados obtidos sugerem que *G. diazotrophicus* PAL5 percebe e responde as duas variedades de cana através de mecanismos gerais similares.

Todos esses resultados obtidos até agora mostram o grande potencial da proteômica para descrever eventos em células de *G. diazotrophicus* através da observação e estudo das proteínas expressas sob condições distintas de cultivo.

Até o momento não existem trabalhos de genômica funcional com *G. diazotrophicus* PAL5 envolvendo o aminoácido triptofano. Como já foi esclarecido anteriormente por Rodrigues (2008), sabe-se que a produção de AIA por *G. diazotrophicus* é dependente da adição do triptofano ao meio de cultura sugerindo que nesta bactéria este aminoácido seja o precursor do AIA; contudo, não existem maiores esclarecimentos sobre a real importância deste aminoácido para a biossíntese deste fitormônio em PAL5, existindo, inclusive, a possibilidade de haver uma rota independente do triptofano.

Devido à necessidade da presença do triptofano para a detecção da produção de compostos indólicos em PAL5 por métodos colorimétricos, estudos cultivando a estirpe PAL5 em diferentes concentrações deste aminoácido poderiam auxiliar a entender melhor sua real importância na biossíntese de tais compostos nesta bactéria. Além disso, não existem estudos de análise de proteômica com mutantes de PAL5 em especial com mutantes defectivos na produção de compostos indólicos. Portanto, o presente capítulo engloba estudos de genômica funcional, incluindo a análise dos perfis de proteínas obtidos ao cultivar PAL5 e o mutante *lao*⁻ na presença e ausência do triptofano. Esses estudos são inéditos e, possivelmente ajudarão a responder diversas questões sobre a influência deste aminoácido na biossíntese de AIA nesta bactéria e, conseqüentemente esclarecer ainda mais as relações de interação destes microorganismos com plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo e bactérias utilizadas

Células de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e mutante lao^- foram cultivadas em triplicatas em *erlenmeyers* com capacidade para 250 ml contendo 100 ml de meio composto pelos sais do meio LGI-P líquido sem o corante e empregando 5 g.l⁻¹ de glicose como fonte de carbono e suplementado com duas concentrações do aminoácido triptofano (zero e 100 ug.ml⁻¹), sob incubação a 30°C e agitação de 200 rpm. Após atingir a fase exponencial ($DO_{600nm}=0,7$) os sedimentos bacterianos originados dos diferentes tratamentos (com e sem triptofano) foram coletados por centrifugação e lavados com solução salina duas vezes. Para tal, foram adicionados 10 ml de solução salina a cada amostra precipitada que foi homogeneizada vigorosamente e, submetida à centrifugação a 1.800 xg por 10 minutos a 4°C. Os sedimentos foram mantidos a -70°C até o momento do uso.

2.2 Lise celular

Para a obtenção do lisado celular, os sedimentos bacterianos de células de PAL5 cultivados na presença e ausência de triptofano foram descongelados e ressuspensos em 1 ml de solução de lise (7 M de Uréia, 2 M de Tiuréia, 4% de CHAPS, 0,5% de IPGBuffer e 20 mM de DTT, estes dois últimos adicionados apenas no momento do uso) e mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos. As soluções contendo uréia foram manuseadas a temperaturas abaixo de 37°C para evitar a carbamilação das proteínas. Durante todo o processo, as amostras e soluções foram manuseadas com luvas.

Após este período de incubação, as amostras foram submetidas à sonicação sob as seguintes condições: 6 ciclos a 30% de amplitude compostos por 10 segundos de pulso e 1 minuto de repouso. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 45 minutos a 21.9000 xg e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Realizou-se uma nova centrifugação a 4°C por 15 minutos a 21.900 xg e o sobrenadante foi, novamente, transferido para novos tubos previamente rotulados.

Para verificar a qualidade, bem como, estimar a quantidade de proteínas obtida foi realizada a comparação da dosagem de proteínas feita em placas de poliestireno de 96 poços utilizando o reagente de Bradford (1976) e o perfil de proteínas obtido em gel de SDS-PAGE (o gel de corrida foi preparado com 10% de solução acrilamida/bisacrilamida enquanto que no gel concentrador foram utilizados 4%. Em ambos os géis foram utilizados tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS, água e os catalizadores da reação de polimerização, TEMED e APS). Para tal, a uma alíquota de 50 ug de cada uma das amostras foram acrescidos de mesmo volume de tampão de carregamento Laemmli 2X (125 mM de Tris-HCl; 20% de glicerol; 4% de SDS; 100 mM de DTT- adicionado na hora do uso; 0,004% de Azul de Bromofenol, pH 6,8) (LAEMMLI, 1970) que foram aplicadas no gel de poliacrilamida 10%, previamente preparado, e então submetidas a voltagem constante de 200 V por cerca de 4 horas.

2.3 Isoeletrofocalização

Para cada tratamento foi adicionado o volume equivalente a 50 ug de proteínas, 20 mM de DTT, 0,5% de IPGBuffer pH 3-10 (Cat. No. 17-6000-87) e o volume necessário de tampão de reidratação (Uréia 8,5 M, Tween 20 2%, CHAPS 2%, Bromofenol 0,002%) para avolumar para 250 ml. Para os géis preparativos foram utilizados 400 ug de proteínas de cada tratamento. Essa mistura foi homogeneizada vigorosamente com auxílio de vórtex e

centrifugada por 60 minutos a 11.200 xg visando precipitar quaisquer materiais não solubilizados.

Para uma análise exploratória foram utilizadas tiras de 13 cm na faixa de pH entre 3 e 10, enquanto que para as análises definitivas utilizou-se tiras de 13 cm na faixa de pH entre 4 e 7, ambas com capacidade para 250 ul de amostra (*Immobiline™ Dry Strip* pH 3-1, 13 cm, Cat. No. 17-6001-14 e *Immobiline™ Dry Strip* pH 4-7, 13 cm, Cat. No. 17-6001-13) Os 250 ul da mistura de cada tratamento foram adicionados em cada suporte (*Ettan IPGphor Manifold*, Cat. No. 80-6498-38) com muito cuidado para não formar bolhas. As tiras foram retiradas do congelador e tiveram sua cobertura plástica protetora removida vagarosamente com ajuda de uma pinça. Tais tiras foram posicionadas no suporte com o lado do gel virado para baixo de modo que este ficasse em contato com toda a solução de reidratação. Cada tira foi coberta com óleo mineral (*Immobiline DryStrip Cover Fluid*, Cat. No. 17-1335-01) e o suporte foi montado no aparato *Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit* (Cat. No. 11-0033-64). As tiras foram reidratadas por 16 horas sob baixa voltagem e, após este período, a isoeletrofocalização ocorreu por aproximadamente 23 horas conforme as condições de voltagem citadas na Tabela 4. Ao término, as tiras foram transferidas para tubos de vidro, com o cuidado de manter o lado contendo o gel para o interior do tubo. Nesta etapa as tiras foram imediatamente equilibradas ou congeladas para uso posterior.

Tabela 4: Condições de voltagem empregadas da isoeletrofocalização das amostras de proteínas nas tiras de 13 cm de pH 4-7.

ETAPA	TEMPO	VOLTAGEM	VOLTS/HORA
1 STEP	16 HS	50 V	
2 STEP		500 V	500 VH
3 GRAD		1000 V	800 VH
4 GRAD		8000 V	11300 VH
5 STEP		8000 V	13000 VH

2.4 Equilíbrio das tiras

Após a IEF, a cada um dos tubos contendo as tiras foram adicionados 5 ml de solução de equilíbrio I (50 mM de tris-HCl pH 8, 6 M de Ureia, 30% v/v de glicerol, 2% de SDS, 0,0002% de azul de bromofenol, 100 mM de DTT), sendo mantidos a temperatura ambiente sob agitação leve por 30 minutos. Após este período, a solução de equilíbrio I foi cuidadosamente removida e 5 ml de solução de equilíbrio II (50 mM de tris-HCl pH8, 6 M de Ureia, 30% v/v de glicerol, 2% de SDS, 0,0002% de azul de bromofenol, 250 mM de iodoacetamida) foram adicionados aos tubos que, novamente, foram mantidos a temperatura ambiente sob agitação leve por 30 minutos. Passado este período de incubação, a solução de equilíbrio II foi removida dos tubos e as tiras foram enxaguadas com tampão de corrida 1X (25 mM de Tris base, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS).

2.4 Eletroforese bidimensional

Após o equilíbrio das tiras, estas foram submetidas à migração da segunda dimensão em gel de SDS-PAGE (10 % de Acrilamida, 0,05% de persulfato de amônio - APS, 1% de SDS, TEMED e 0,4 M de Tris-HCl pH 8,8) montados em placas de vidro (*Glass plates*, 18 × 16 cm, Cat No, 80-6178-99) com espaçadores de 1 mm (SPAC 1 cm X 16 cm, 1,0 mm, Cat No. 80-6179-94).

Os géis foram submetidos a 45 mA por gel em um aparato de eletroforese vertical Hoefer™ SE600 Ruby™ (Amersham Biosciences, Cat No. 80-6479-57) acoplado a um

sistema de circulação refrigerado (MultiTemp III Thermostatic Circulator, Cat No. 18-1102-77) para manter a temperatura a 10°C. A migração foi interrompida após 3 horas. aproximadamente, quando o corante chegou ao final das placas de vidro sem, contudo, sair do gel visando evitar a perda de proteínas de baixo peso molecular.

2.5 Coloração:

Os géis analíticos, contendo 50 ug de proteínas, foram corados com o auxílio do kit comercial *PlusOne™ Silver Staining Kit* (GE Healthcare, Cat No.17-1150-01).

Para tal, cada gel foi fixado por pelo menos uma hora em 250 ml de solução aquosa contendo 75 ml de etanol e 25 ml de ácido acético glacial. A sensibilização ocorreu durante a noite em 250 ml de solução aquosa contendo 75 ml de etanol, 10 ml de tiosulfato de sódio 5% (p/v), 17 g de acetato de sódio e 1,25 ml de glutaraldeído a 25%. Após uma série de quatro lavagens em água por 15 minutos cada, cada gel foi imerso em 250 ml de solução de prata (2,5% p/v) por 60 minutos, onde permaneceram sob leve agitação. Após este período, os géis foram rinsados com água destilada algumas vezes e a revelação foi realizada com 250 ml de solução aquosa contendo 6,25 g de carbonato de sódio e 0,2 ml de formaldeído 37% por tempo suficiente para possibilitar a visualização dos *spots* - cerca de 5 a 10 minutos. Com o objetivo de parar a reação, foi utilizada 250 ml de solução aquosa contendo 3,65 g de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Os géis preparativos, contendo 400 ug de proteínas, foram corados com solução de coomassie coloidal. Para tal, cada gel foi previamente fixado por pelo menos 4 horas em solução contendo 20% de metanol e 1% de ácido orto-fosfórico. Após este período os géis foram imersos em solução de coloração onde ficaram por pelo menos 16 horas. Para o preparo desta solução, adicionou-se 400 ml de solução A (2% de ácido orto-fosfórico e 10% de sulfato de amônia em água), 20 ml de solução B (2,5% de coomassie G-250 em água) e 100 ml de metanol. A descoloração dos géis foi realizada através de sucessivas lavagens com água destilada.

2.6 Captura e escaneamento dos géis e análise das imagens:

As imagens dos géis foram adquiridas com auxílio do escaner ImageScanner III (GE Healthcare – Cat. No 28-9076-07). Após obtenção das imagens, os tratamentos para as análises estatísticas foram selecionados de acordo com o questionamento realizado. Portanto, para avaliar o efeito do triptofano no perfil de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5, foram contrastadas as imagens dos géis contendo as amostras oriundas de PAL5 cultivada na ausência e na presença de triptofano. O mesmo foi feito com as amostras derivadas do mutante *lao*⁻ de *G. diazotrophicus* cultivadas nas mesmas condições para avaliar o efeito do aminoácido também nas proteínas expressas pelo mutante.

Para avaliar as consequências causadas no perfil de proteínas pela mutação causada no gene *lao* de *G. diazotrophicus* PAL5, foram utilizadas nas análises, as imagens dos géis contendo as amostras provenientes de PAL5 e *lao*⁻ cultivadas em meio LGI-P sem triptofano. E para avaliar os efeitos da mutação na expressão protéica das bactérias que estariam produzindo compostos indólicos, as imagens analisadas foram aquelas contendo o mapa protéico de *G. diazotrophicus* PAL5 e do mutante *lao*⁻ cultivadas em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml⁻¹ de triptofano.

Para a análise desses géis, visando, dentre outras coisas, a detecção de proteínas, a combinação dos géis e análises estatísticas, foi utilizado o programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare – Cat. No 28-9380-91). O primeiro passo na análise dos géis foi detectar automaticamente os *spots* neste programa e, em seguida, realizar uma análise manual

mais apurada, identificando *spots* não detectados pelo programa. *Spots* duplos considerados como único e/ou falsos *spots* foram identificados e corrigidos. A seguir foram utilizadas as ferramentas de remoção de *background* e normalização e, posteriormente, os géis foram calibrados, utilizando uma escala linear de pH e padrões de peso molecular (GE Healthcare). Os nove géis membros foram sobrepostos e um “gel master” foi obtido para cada condição, contendo apenas os *spots* reprodutíveis, ou seja, apenas *spots* comuns aos géis membros. A posição e densidade ótica dos *spots* nos géis “master” é uma média desses valores para o *spot* nos géis membros. *Spots* não presentes nos nove géis membro ou, cujo volume relativo diferiu mais de 20% entre eles, não foram considerados para as análises posteriores. *Spots* comuns a dois géis “master” foram considerados diferencialmente expressos quando seu volume relativo variou em mais de três vezes. Foram realizadas análises de variância a 5% de probabilidade.

2.7 Preparo das amostras de proteínas para análise por espectrometria de massa:

Para a descoloração dos *spots*, as proteínas foram retiradas do gel manualmente com auxílio de uma ponteira de plástico nova do tipo P1000 (com a ponta cortada) e imersas em microtubos previamente preparados com 200 μ l de solução de bicarbonato de amônio a 25 mM em 50% de acetonitrila com pH 8,0, onde ficaram em repouso por 30 minutos. Este processo foi repetido por duas vezes ou até o total desaparecimento da coloração azulada do gel. Após este período, os fragmentos de gel foram desidratados através de dois tratamentos sucessivos com 200 μ l de acetonitrila (100%) por 5 minutos, e em seguida, foram completamente secos por aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente.

Para a digestão, foi preparada no gelo uma solução estoque de tripsina (Promega - Cat. No V5280) a 1 μ g. μ l⁻¹ de ácido acético a 50 mM que, para o uso, foi diluída 50 vezes com bicarbonato de amônio 40 mM e 5% de acetonitrila.

Os fragmentos dos géis completamente desidratados com auxílio da acetonitrila foram adicionados 10 μ l da solução de tripsina 15 ng. μ l⁻¹ de forma a cobri-los totalmente. Para que a tripsina penetrasse no gel sem que a digestão ocorresse, foram mantidos no gel por 30 minutos antes de ficarem incubados a 37°C por aproximadamente 16 horas para a completa digestão protéica.

Os peptídeos foram extraídos pela adição de 20 μ l de solução contendo 50% de acetonitrila e 5% de ácido trifluoroacético (TFA) e posterior agitação vigorosa durante 30 min. Após este período, os microtubos foram centrifugados por um minuto a 11.200 xg e os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos microtubos previamente rotulados. Esse processo foi repetido por mais duas vezes e todo o conteúdo extraído foi concentrado a vácuo até aproximadamente 5 μ l.

Para reconstituição da matriz, foram dissolvidas 10 mg.ml⁻¹ da matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) em 50% de acetonitrila e 0,1% de TFA que foram agitadas vigorosamente com auxílio de vórtex e centrifugadas por 5 minutos a 13000 rpm. Após este preparo, foram misturados 1 μ l do sobrenadante da matriz e 1 μ l da solução de peptídeos, e 1 μ l desta mistura foi espotada em placa para análise por Maldi-ToF modelo MTP384 (Bruker Daltonics).

2.8 Obtenção e análise dos espectros de massa:

As análises de espectrometria de massa foram realizadas no laboratório de Proteômica da Universidade Federal do Paraná. Para tal, a placa contendo as amostras foi colocada no compartimento de análise do espectrômetro de massas MALDI-TOF/MS modelo Autoflex

(Bruker Daltonics), onde a matriz absorveu a energia do laser aplicado, induzindo a vaporização de parte da amostra. Assim que a vaporização e ionização das moléculas ocorreram, as mesmas foram transferidas eletrostaticamente para o espectrômetro de massas, onde foram individualmente determinadas a relação massa/carga (m/z) dos íons pelo tempo que os mesmos levaram para percorrer o tubo de vôo sob vácuo.

Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 19,8 kV e faixa de aquisição entre 800 – 3200 Da com auxílio do *software* FlexControl 2.0 do mesmo fabricante. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, ACTH e somatostatina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da) quando presentes. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics), onde foram excluídos os picos de tripsina e queratina, quando encontrado.

2.9 Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi realizada através da pontuação atribuída à similaridade entre os dados observados e teóricos (*mowse score*) (PAPPIN et al., 1993) com auxílio do programa Mascot v2.2, sob as seguintes configurações: protease tripsina com no máximo um sítio de clivagem perdido, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa, oxidação de metionina como modificação variável e tolerância máxima permitida de 200 ppm.

As massas moleculares dos peptídeos trípticos obtidos foram comparadas com àquelas dos peptídeos geradas *in silico* a partir do genoma de *G. diazotrophicus* e os parâmetros utilizados para confirmar ou excluir as proteínas candidatas foram: algoritmo mowse score (Mascot) acima do valor de corte (48), cobertura de no mínimo 15% e a comparação entre os valores experimentais e teóricos de pI e massa molecular.

3 RESULTADOS

A análise do conteúdo protéico de cada uma das três triplicatas biológicas das culturas de *G. diazotrophicus* Pal5 e da mutante *lao*⁻ cultivadas na ausência e presença de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano podem ser observadas em gel de SDS-PAGE (Figura 16). Foi obtida uma média de 2 mg de proteínas para cada uma das triplicatas técnicas. Conforme pode ser observado na Figura 16, já na primeira dimensão do gel foi possível observar uma expressiva diminuição na intensidade de uma banda de massa molecular aproximadamente 15 kDA no perfil de proteínas de Pal5 cultivada com triptofano quando comparado ao perfil de PAL5 cultivada na ausência do aminoácido.

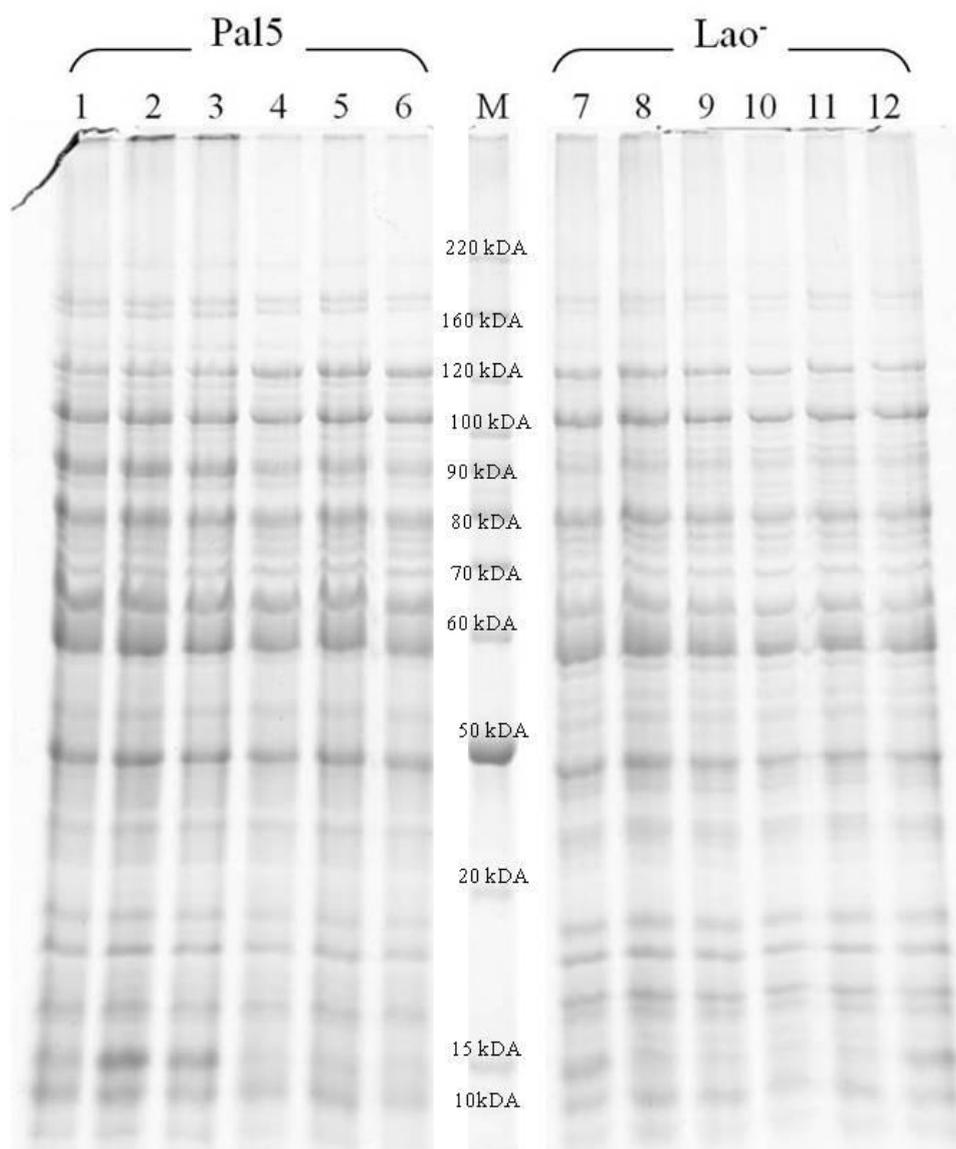


Figura 16: Gel de SDS-PAGE contendo o perfil protéico de uma réplica biológica de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e uma da mutante *lao*⁻, cultivadas na ausência de triptofano (colunas 1 - 3 e 7 - 9) e na presença de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (colunas 4 - 6 e 10 - 12). As colunas consecutivas de cada tratamento três réplicas técnicas contendo 50 μg de proteínas. M: Marcador de Peso Molecular - BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, Cat. No. 10747-012; Lot. 845065)

3.1 Análise exploratória do perfil protéico

A análise exploratória visando definir a melhor distribuição das proteínas na faixa de pH foi realizada utilizando-se tiras de gel de 13 cm na faixa de pH entre 3 e 10. Desta forma, foi possível avaliar a distribuição das proteínas conforme seu caráter ácido ou básico e determinar a melhor faixa de pH para estudar o perfil das proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 e do mutante nas condições de estudo. Conforme podemos observar na Figura 17, as proteínas focalizadas nas tiras com faixa de pH 3-10 ficaram mais concentradas na região ácida do gel. Assim sendo, optou-se por realizar o estudo utilizando-se tiras com faixa de pH 4-7 visando resolver a região que continha a maior porção das proteínas de *G. diazotrophicus* nas condições de cultivo adotadas. Os resultados apresentados na Figura 18 mostram que as proteínas ficaram bem distribuídas por todo o gel quando tiras de pH 4-7 foram utilizadas.

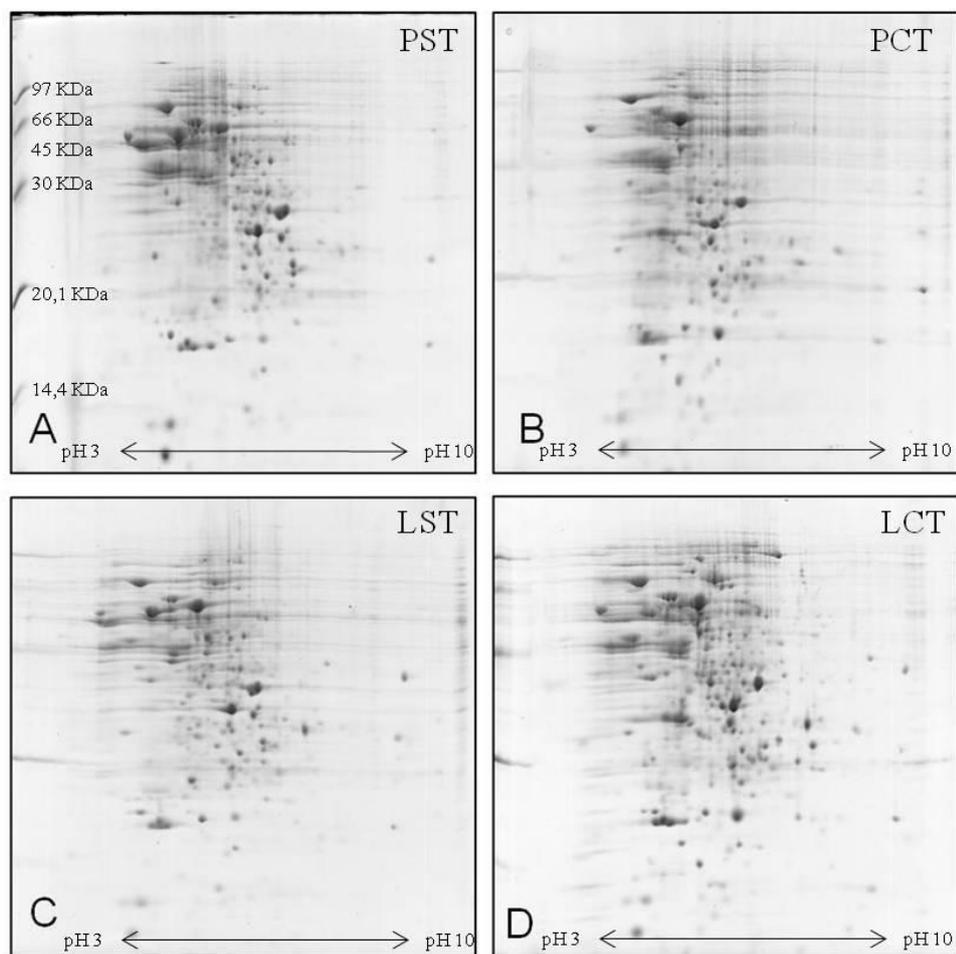


Figura 17: Gel de 2DE-PAGE com tiras na faixa de pH de 3 a 10 revelando o perfil protéico de *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P na ausência de triptofano (A) e na presença de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (B), e de *G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em meio LGI-P na ausência de triptofano (C) e na presença de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (D).

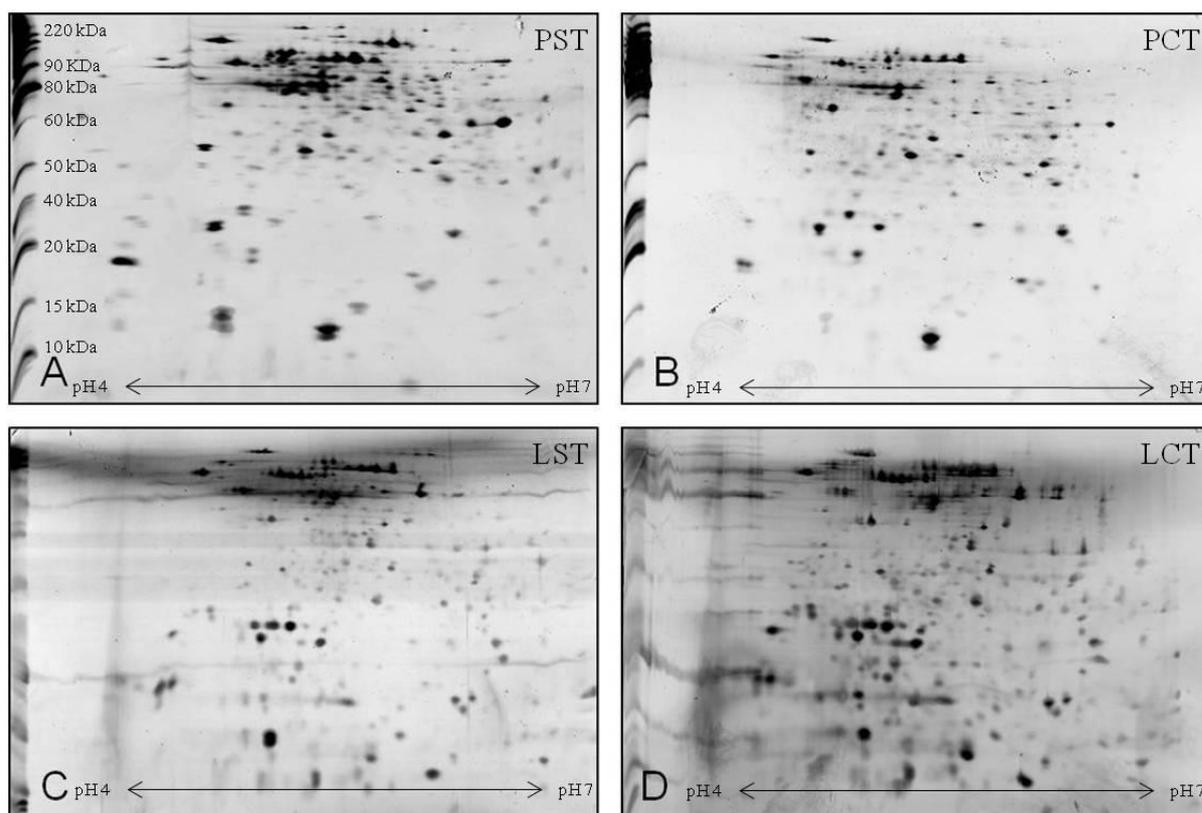


Figura 18: Gel de 2DE-PAGE com tiras na faixa de pH de 4 a 7 revelando o perfil protéico de *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P na ausência de triptofano (A) e na presença de 100 ug.ml^{-1} de triptofano (B), e de *G. diazotrophicus* lao cultivada em meio LGI-P na ausência de triptofano (C) e na presença de 100 ug.ml^{-1} de triptofano (D).

3.2 Efeito do triptofano no perfil de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5

Para avaliar o efeito do triptofano no perfil de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 as imagens dos géis bidimensionais contendo as amostras oriundas de PAL5 cultivada na ausência e na presença de triptofano foram contrastadas e, a análise computacional resultou na detecção de 40 *spots* com massa molecular (MM) entre 10 e 250 kDa, e pontos isoelétricos compreendendo a faixa 4 a 7 apresentando expressão diferencial relativa. Desses *spots* diferencialmente expressos, dois apresentaram expressão aumentada em PAL5 cultivada na presença de triptofano, 15 apresentaram expressão diminuída, e 15 foram detectados apenas nessa condição de cultivo, enquanto que oito *spots* foram detectados exclusivamente no perfil de bactérias PAL5 cultivadas na ausência de triptofano. A análise por espectrometria de massa permitiu a identificação das proteínas oriundas de 15 *spots*, tendo sido obtidas 12 proteínas com sequências diferentes, sendo 3 isoformas (Figura 19). As bactérias PAL5 cultivadas na presença de triptofano (PCT) apresentaram 13 *spots* (10 proteínas) com expressão diminuída e 2 *spots* (2 proteínas) com a expressão aumentada quando comparadas com as proteínas de bactérias PAL5 cultivadas na ausência do aminoácido (PST) (Tabela 5).

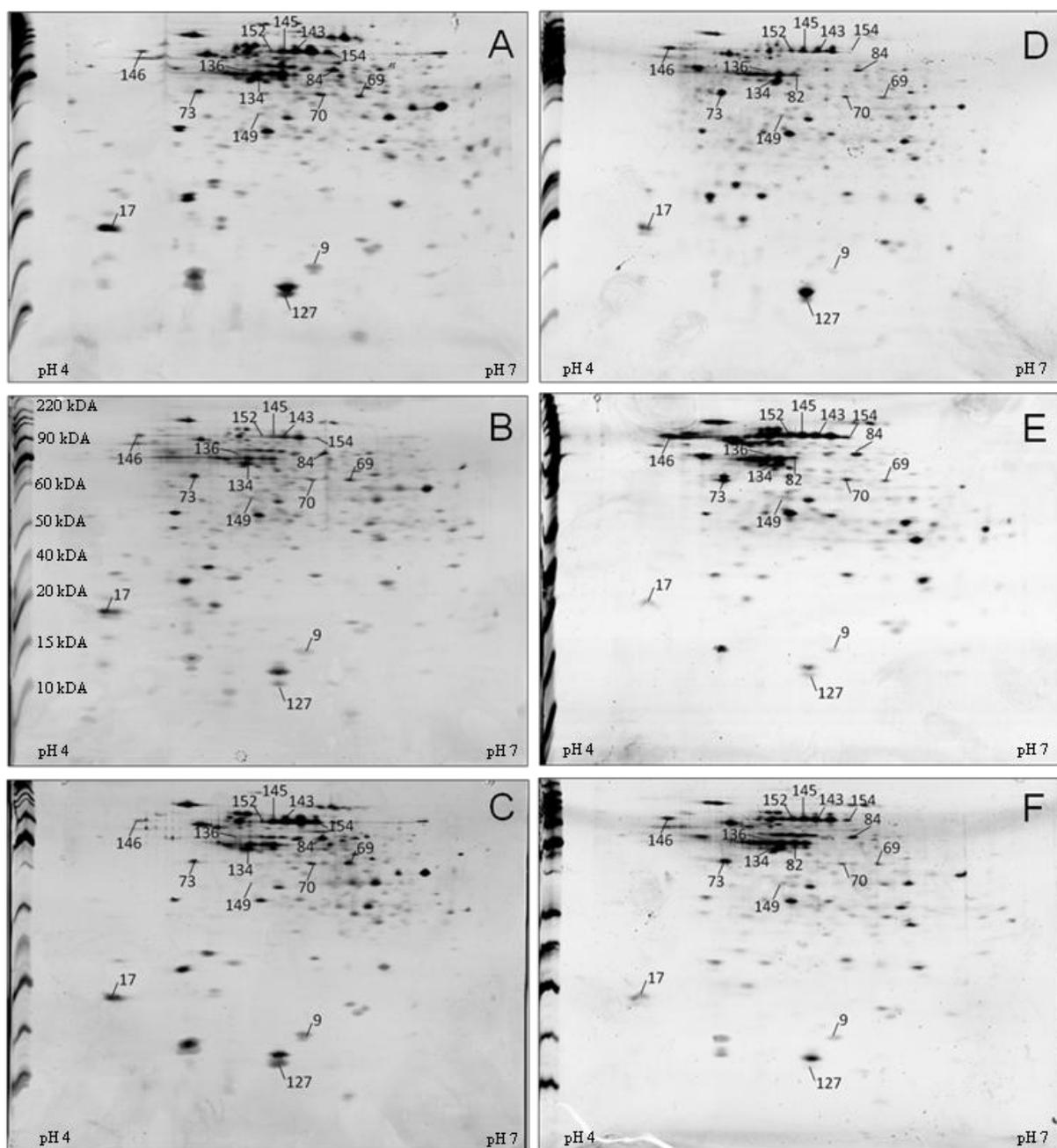


Figura 19: Mapa 2DE contendo proteínas extraídas de 3 replicatas biológicas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano (imagens A a C) e cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (D a F). Os *spots* das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos estão numerados: superóxido dismutase (n° 9), pré-proteína translocase subunidade SecB (n° 17), Catalase (n° 69), proteína do tipo álcool desidrogenase *Zinc-type* (n° 70), fosfopiruvato hidratase (n° 73), Protease de Serina (n° 84), co-chaperonina GroES (n° 127), proteína G de biossíntese de glucano (n° 134), F0F1 ATP synthase subunit beta (n° 136), *trigger factor* (n° 146), HlyD family secretion protein (n° 149), chaperonina GroEL (n° 143, 145, 152 e 154).

Tabela 5: Expressão diferencial e categorias funcionais das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano-PST) e no tratamento (*G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml⁻¹ de triptofano-PCT).

N° do spot	pI/MM(DA)		score	Expressão relativa	N° de acesso	ORF	Gene que codifica	Descrição da proteína	Função da proteína
	Experimental	Teórico							
modificação pós-traducional, turnover de proteínas e chaperonas									
84	5,8/53100	5,91/53273	62	Diminuída em PCT	YP_001601559.1	GDI_1303	-	Protease de Serina	Enzimas que cortam ligações peptídicas em proteínas, nas quais um dos aminoácidos no sítio ativo é a serina. Participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, e na liberação de hormônios peptídeos a partir de proteínas precursoras.
127	5,45/11200	5,4/10352	88	Diminuída em PCT	YP_001602295.1	GDI_2050	<i>groES</i>	co-chaperonina GroES	Proteína do grupo I das chaperoninas, também conhecida por chaperonina 10. Colabora com a chaperonina 60 (GroEL) auxiliando no envelopamento e montagem de proteínas encontradas no citosol.
146	4,53/48900	4,58/49098	44	Aumentada em PCT	YP_001603277	GDI_3045	<i>tig</i>	<i>trigger factor</i> (fator indutor)	Está envolvido com o envelopamento e exportação de proteínas recém-sintetizadas. Está associada ao ribossomo e age como uma chaperona molecular mantendo as proteínas recém-sintetizadas em uma conformação aberta.
143	5,44/57100	5,43/57938	94						
145	5,35/56700	5,43/57938	52	Diminuídas em PCT	YP_001602294.1	GDI_2049	<i>groEL</i>	chaperonin GroEL (60kDa)	Também conhecida como chaperonina 60, é uma proteína constitutivas do grupo I das chaperoninas que aumentam em quantidade após diversos tipos de estresse. Com a ajuda da co-chaperonina GroES, GroEL encapsula proteínas no interior da cavidade do complexo GroEL-ES e promove seu dobramento usando energia derivada da hidrólise de ATP, especialmente sob condições de estresse.
152	5,28/58100	5,43/57938	76						
154	5,64/56900	5,43/57938	112						
Metabolismo e transporte de íons inorgânicos									
9	5,67/ 20300	5,96/ 22213	120	Diminuída em PCT	YP_001602413.1	GDI_2168	<i>sodB</i>	Superóxido dismutase	Catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio.
69	6,00/ 56200	6,14/ 55202	51	Diminuída em PCT	YP_001600373.1	GDI_0079	<i>katA</i>	Catalase	É uma peroxidase que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. É uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao peróxido de hidrogênio.
134	5,26/58100	5,34/57263	140	Diminuída em PCT	YP_001601170.1	GDI_0889	<i>mdoG</i>	Proteína G de biossíntese de glucano	Envolvida na biossíntese de glucanos periplasmáticos osmorregulados (GPOs). Necessária para a montagem da estrutura do glucano.

Nº do spot	pI/MM(DA)		score	Expressão relativa	Nº de acesso	ORF	Gene que codifica	Descrição da proteína	Função da proteína
	Experimental	Teórico							
Produção e conversão de energia									
70	5,72/35800	5,62/36453	83	Diminuída em PCT	YP_001600476.1	GDI_0186	-	Proteína do tipo álcool desidrogenase Zinc-type	Álcool desidrogenase catalisa a oxidação de etanol a acetaldeído com concomitante redução de NAD. Um dos seus dois átomos de zinco é essencial para a atividade catalítica. Participam da geração de aldeídos, cetonas e alcoóis durante a biossíntese de vários metabólitos.
136	5,18/52100	4,97/52955	102	Diminuída em PCT	YP_001600979.1	GDI_0696	<i>atpD</i>	Subunit beta da ATP synthase	Produz ATP a partir de ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana. A subunidade beta da ATP sintase é catalítica.
Metabolismo e transporte de carboidratos									
73	4,88/43600	4,7/44895	137	Aumentada em PCT	YP_001602172.1	GDI_1927	<i>eno</i>	Fosfoenolpiruvato hidratase (enolase)	Enzima da classe das liases que catalisa a desidratação reversível de 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato, como parte da via glicolítica. A reação é facilitada pela presença de íons metálicos.
Catabolismo, biossíntese e transporte de metabólitos secundários									
149	5,29/43100	5,14/42229	57	Diminuída em PCT	YP_001604072.1	GDI_3850	-	Proteína secretora da família HlyD	Esta proteína pertence a uma grande família de polipeptídeos, as proteínas de fusão de membrana. Estão relacionadas aos transportadores do tipo ABC, envolvidos com a exportação ou importação de uma ampla variedade de substâncias, desde pequenos íons até macromoléculas. A principal função deste sistema é prover nutrientes essenciais as bactérias.
Motilidade celular e secreção									
17	4,35/20100	4,44/18494	76	Diminuída em PCT	YP_001602313.1	GDI_2068	<i>secB</i>	Pré-proteína translocase subunidade SecB	A proteína translocase SecB é a constituinte principal do sistema de secreção Sec. Este sistema está envolvido na translocação de proteínas através da membrana citoplasmática e na inserção de proteínas integrais de membrana (FEKKES e DRIESSEN, 1999). SecB funciona como uma chaperona molecular que, seletivamente se liga a pré-proteínas e as entrega a SecA, que conduz a translocação com consumo de ATP.

A Figura 20 mostra a distribuição das proteínas identificadas de acordo com as suas respectivas categorias funcionais baseadas no COG (*cluster of orthologous groups*) e enfatiza a importância da modificação pós-traducional, do *turnover* de proteínas e das chaperonas, bem como, o metabolismo e o transporte de íons inorgânicos, nesta condição de cultivo.

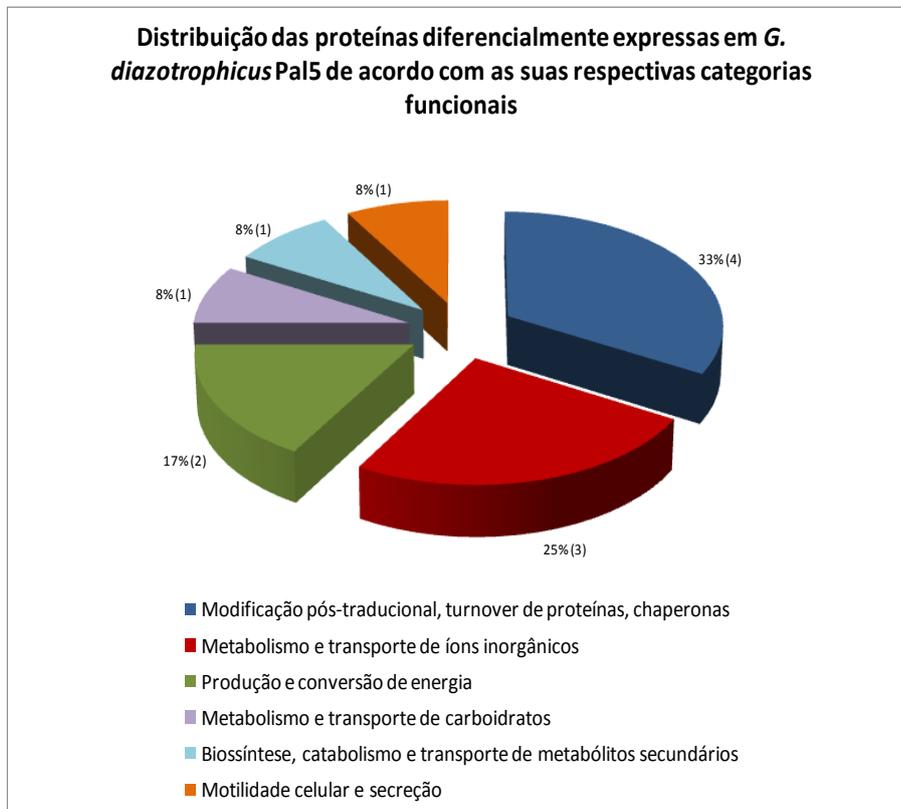


Figura 20: Distribuição das proteínas diferencialmente expressas em *G. diazotrophicus* PAL5 de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

Mais da metade das proteínas identificadas (10) teve suas expressões relativas diminuídas quando o triptofano foi adicionado ao meio de cultivo. A modificação pós-traducional, *turnover* de proteínas e chaperonas foi a categoria funcional mais representada entre as categorias de expressão diminuída: uma co-chaperonina GroES (*spot* n° 127), quatro isoformas da chaperonina GroEL (*spots* n° 143, 145, 152 e 154) e uma protease de serina (*spot* n° 84). A segunda categoria funcional mais expressiva, com três membros foi metabolismo e transporte de íons inorgânicos, onde foi identificada uma proteína G de biossíntese de glucano (*spot* n° 134), uma superóxido dismutase (*spot* n° 9) e uma catalase (*spot* n° 69). Na categoria produção e conversão de energia foi encontrada uma proteína do tipo álcool desidrogenase *Zinc-type* (*spot* n° 70) e uma proteína F0F1 ATP sintase subunidade beta (*spot* n° 136). Em biossíntese, catabolismo e transporte de metabólitos secundários foi identificada uma proteína secretora da família HlyD (*spot* n° 149), enquanto que, na categoria motilidade celular e secreção observou-se uma pré-proteína translocase subunidade SecB (*spot* n° 17) (Figura 21 e Figura 22).

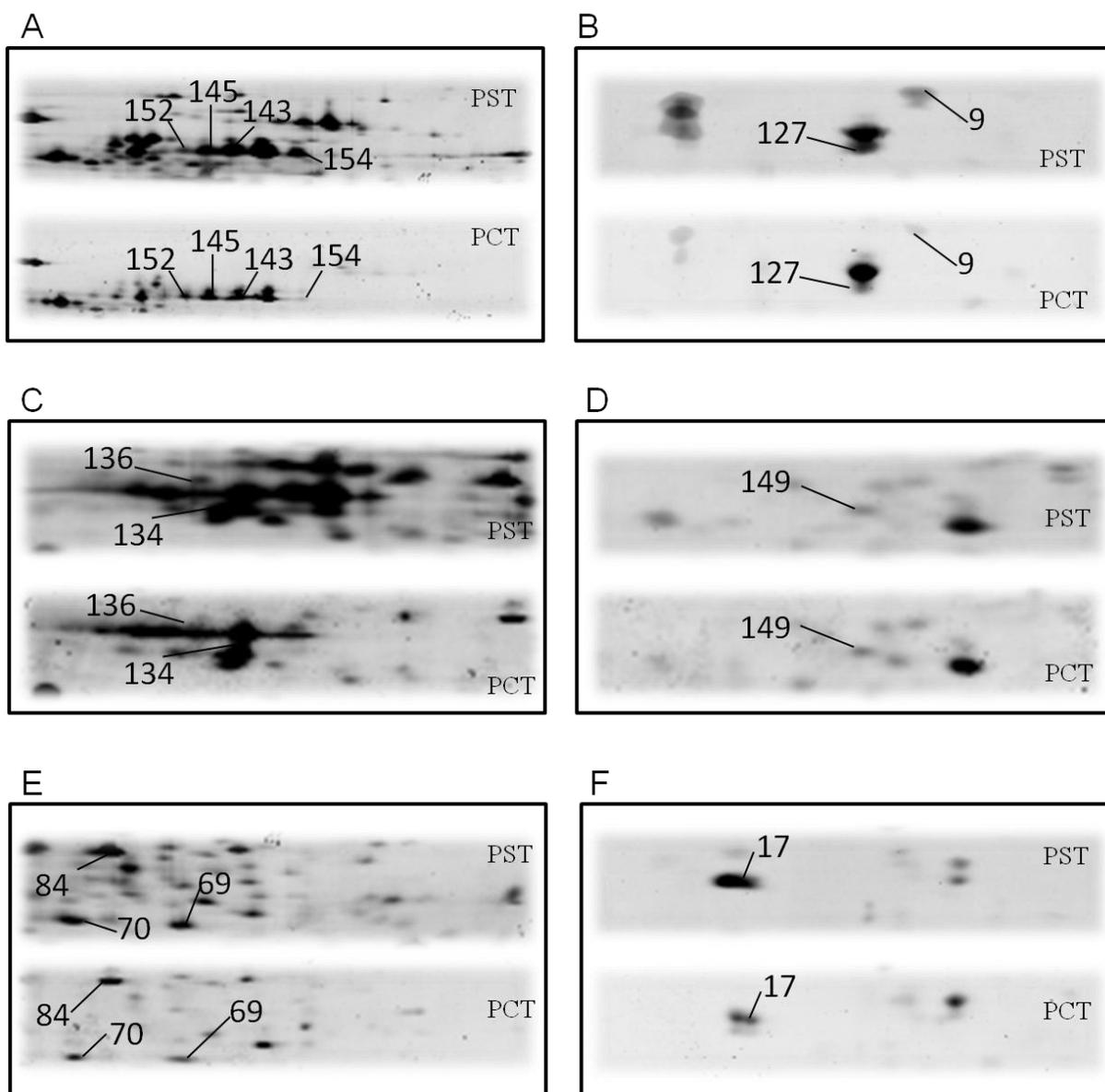


Figura 21: Ampliação de seis regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em LGI-P com 100 ug.ml^{-1} de triptofano (PCT) quando comparadas com *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em LGI-P sem acréscimo de triptofano (PST). Em (A) é possível observar as isoformas da chaperonina GroEL enquanto que em (B) observa-se co-chaperonina GroES (n° 127) e a superóxido dismutase (n° 9). Já na imagem (C) pode-se observar uma proteína G de biossíntese de glucano (n° 134) e uma proteína F0F1 ATP sintase subunidade beta (n° 136). Na figura (D) é possível observar uma proteína secretora da família HlyD (n° 149) enquanto que na figura (E) observa-se uma catalase (n° 69), uma proteína do tipo álcool desidrogenase *Zinc-type* (n° 70) uma protease de serina (n° 84). Em (F) é possível observar uma pré-proteína translocase subunidade SecB (n° 17).

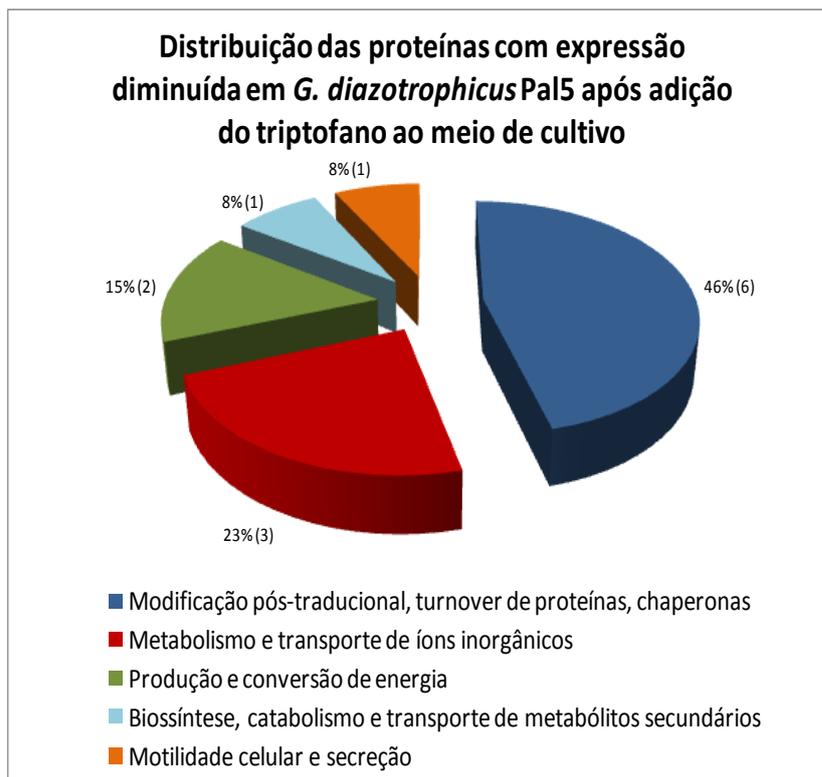


Figura 22: Distribuição das proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* PAL5 após a adição de triptofano no meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

Apenas duas das proteínas identificadas tiveram suas expressões relativas aumentadas quando o triptofano foi adicionado ao meio de cultivo, cada uma pertencente a uma categoria. Foi encontrado um fator indutor (*trigger factor*) (*spot* n° 146) que pode ser incluído na categoria de modificação pós-traducional, *turnover* de proteínas e chaperonas enquanto que na categoria metabolismo e transporte de carboidratos observou-se uma fosfoenolpiruvato hidratase (*spot* n° 73) (Figura 23 e Figura 24).

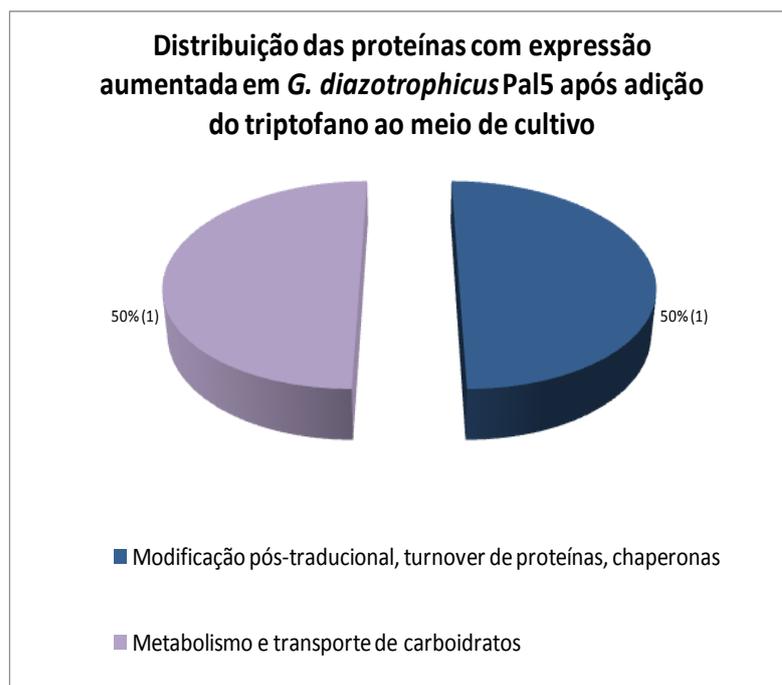


Figura 23: Distribuição das proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* PAL5 após a adição de triptofano no meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

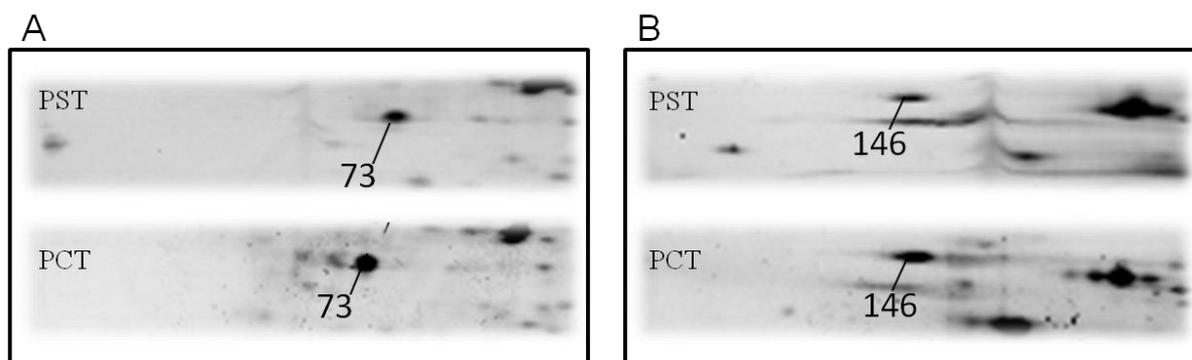


Figura 24: Ampliação de duas regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em LGI-P com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (PCT) quando comparadas com *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em LGI-P sem acréscimo de triptofano (PST). Em (A) observa-se uma fosfopiruvato hidratase (nº 73) enquanto que em (B) é possível observar um *trigger factor* (nº 146).

3.3 Efeito do triptofano no perfil de proteínas de *G. diazotrophicus* mutante *lao*⁻

As imagens dos géis bidimensionais contendo as amostras oriundas do mutante *lao*⁻ de *G. diazotrophicus* cultivado em meio LGI-P na ausência e na presença de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano foram contrastadas e, a análise computacional resultou na detecção de 96 *spots* com massa molecular (MM) entre 10 e 250 kDa, e pontos isoelétrico compreendendo a faixa 4 a 7 apresentando expressão diferencial relativa. Desses *spots* diferencialmente expressos, 11 apresentaram expressão aumentada em PAL5 cultivada na presença de triptofano, 6 apresentaram expressão diminuída, e 26 foram detectados apenas nessa condição de cultivo, enquanto que 53 *spots* foram detectados exclusivamente no perfil de bactérias PAL5 cultivadas na ausência de triptofano. A análise por espectrometria de massa permitiu a

identificação das proteínas oriundas de 14 *spots*, tendo sido obtidas 12 proteínas com seqüências diferentes e duas isoformas (Figura 25). As bactérias *lao*⁻ cultivadas na presença de triptofano (LCT) apresentaram 8 *spots* (8 proteínas) com expressão aumentada e 6 *spots* (4 proteínas) com a expressão diminuída quando comparadas com *lao*⁻ cultivada sem triptofano (LST) (Tabela 6).

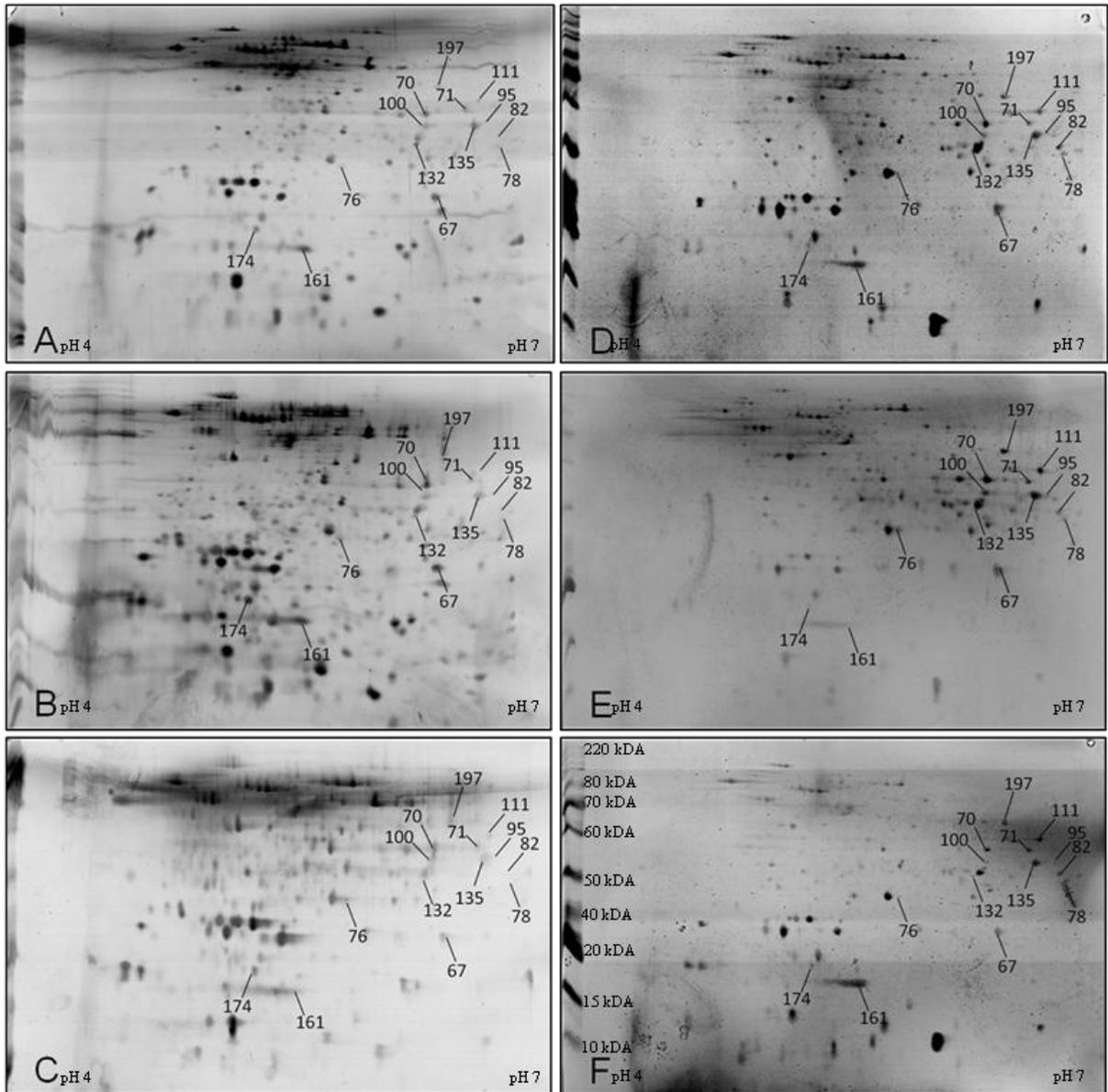


Figura 25: Mapa 2DE contendo proteínas extraídas de 3 replicatas biológicas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* *lao*⁻ cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano (imagens A a C) e cultivada em meio LBI-P acrescido de 100 µg.ml⁻¹ de triptofano (D a F). Os *spots* das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos estão numerados: superóxido dismutase (n° 67), proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (n° 70), alcanal monooxigenase (n° 71), ribose-5-fosfato isomerase A (n° 76), succinato-CoA ligase (formadora de GDP) (n° 78), 2,3,4,5-tetrahidropiridina 2,6-carboxilato N-succiniltransferase (n° 82), oxidoreductase (n° 95), proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 100, 132 e 135), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (n° 111) peroxidoxina (n° 161), pirofosfatase inorgânica (n° 174), aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (n° 197).

Tabela 6 Expressão diferencial e categorias funcionais das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano) e no tratamento (*G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml⁻¹ de triptofano).

Nº do spot	pI/MM(DA)		score	Expressão relativa	Nº de acesso	ORF	Gene que codifica	Descrição da proteína	Função da proteína
	Experimental	Teórico							
Produção e conversão de energia									
71	6,61/35800	6,61/36309	122	Aumentada em LCT	YP_001600540.1	GDI_0251	<i>luxA</i>	alcanal monooxigenase	Pertence à família das oxidoredutases, utilizando o O ₂ como oxidante e com a incorporação ou redução do oxigênio que não pode ser derivado do O ₂ .
78	6,8/29000	6,8/29821		Aumentada em LCT	YP_001603185.1	GDI_2952	<i>sucD</i>	Succinato-CoA ligase (formadora de GDP)	Catalisam o primeiro passo que leva à oxidação do ácido succínico pela formação reversível de succinil-CoA a partir do succinato e CoA, com a clivagem concomitante de GTP a GDP e ortofosfato.
95	6,7/37200	6,7/36265	127	Diminuída em LCT	YP_001603684.1	GDI_3455	-	Oxidoreductase	Catalisa a transferência de elétrons de uma molécula redutora (hidrogênio ou oxigênio doador) para uma molécula oxidante (hidrogênio ou oxigênio receptor). Normalmente utiliza NADP ou NAD como cofator.
174	5,25/19000	5,03/19131	65	Diminuída em LCT	YP_001603720.1	GDI_3491	<i>ppa</i>	Pirofosfatase inorgânica	Enzima que catalisa a hidrólise de difosfato em fosfato inorgânico. A hidrólise do pirofosfato é acoplada ao transporte de íons de hidrogênio através de uma membrana.
Metabolismo e transporte de carboidratos									
70	6,35/36100	6,35/35991	74	Aumentada em LCT	YP_001600575.1	GDI_0287	<i>gnd</i>	Proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase	Catalisa a descarboxilação oxidativa de 6-fosfogluconato para formar ribulose 5-fosfato, reduzindo nadp ⁺ a NADPH..
76	5,8/24100	5,8/24724	51	Diminuída em LCT	YP_001600580.1	GDI_0292	<i>rpiA</i>	ribose-5-fosfato isomerase A	Isomerase que converte ribulose-5-fosfato em ribose-5-fosfato em uma etapa na via das pentoses-fosfato A ribose-5-fosfato é a pentose constituinte dos nucleotídeos, que vão compor os ácidos nucleicos, e de muitas coenzimas, como o ATP, NADH, FADH2 e coenzima A.
100	6,35/37500	37291	85						
132	6,26/37000	37291	123	Diminuídas em LCT	YP_001602778.1	GDI_2534	<i>xylF</i>	Proteína periplasmática de ligação a D-xilose	Proteína relacionada ao metabolismo de carboidratos e também à sinalização celular. Apresenta um domínio de ligação de açúcar, LacI.
135	6,63/36500	37291	154						
111	6,69/35800	36095	107	Aumentada em LCT	YP_001602546.1	GDI_2302	<i>gap</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Enzima essencial na via da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato na presença de NAD ⁺ e fosfato inorgânico, sendo também capaz de catalisar a reação inversa.

Nº do spot	pI/MM(DA)		score	Expressão relativa	Nº de acesso	ORF	Gene que codifica	Descrição da proteína	Função da proteína
	Experimental	Teórico							
Metabolismo e transporte de aminoácidos									
82	6,8/29600	6,8/30055	54	Aumentada em LCT	YP_001602377.1	GDI_2132	<i>dapD</i>	2,3,4,5-tetrahidropiridina 2,6-carboxilato N-succiniltransferase	Aciltransferase envolvida na biossíntese de lisina em bactérias, algas verdes e plantas superiores. Converte succinil-CoA e (S)-2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato em CoA e N-succinil-L-2-amino-6-oxoheptanodioato.
197	6,33/40200	5,62/39497		Aumentada em LCT	YP_001602723.1	GDI_2479	<i>ilvE</i>	Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada	Enzimas transferidoras de grupo amino para aminoácidos de cadeia ramificada. Participam da via de degradação do triptofano. Utiliza o Piridoxal-P como co-fator.
Metabolismo e transporte de íons inorgânicos									
67	6,42/21600	6,42 /22213	107	Diminuída em LCT	YP_001602413.1	GDI_2168	<i>sodB</i>	Superóxido dismutase	Catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio.
modificação pós-traducional, turnover de proteínas e chaperonas									
161	5,56/19300	5,07/20327	124	Aumentada em LCT	YP_001600860.1	GDI_0576	-	Peroxiredoxina	Representam uma importante família de proteínas antioxidantes, aparentemente presentes em todos os organismos. Também apresentam papel na sinalização celular controlando os níveis de peróxido de hidrogênio.

A Figura 26 mostra a distribuição das proteínas de *lao*⁻ de acordo com as suas respectivas categorias funcionais baseadas no COG (*cluster of orthologous groups*) e enfatiza a importância do transporte e metabolismo de carboidratos bem como a produção e conversão de energia, para as condições de cultivo avaliadas.

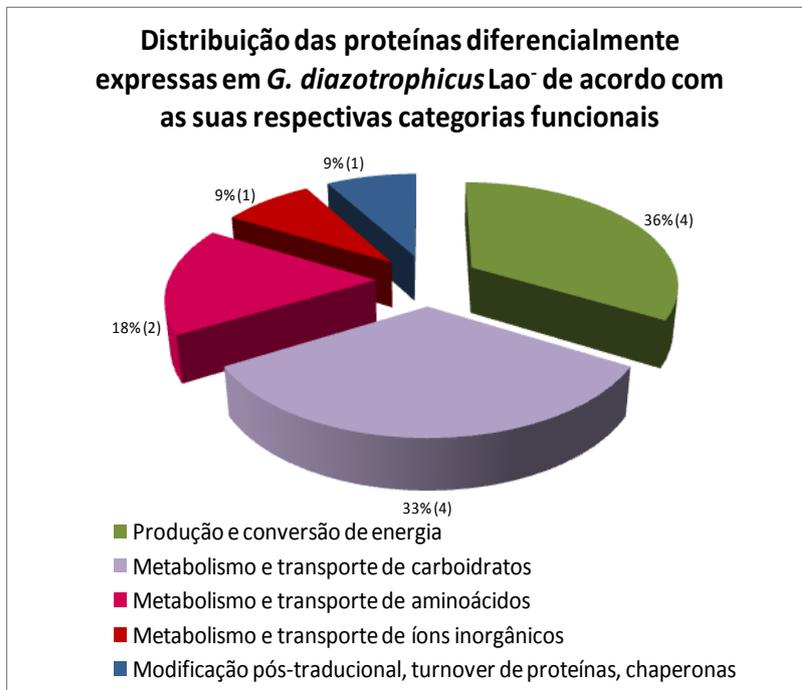


Figura 26: Distribuição das proteínas diferencialmente expressas em *G. diazotrophicus* *lao*⁻ cultivada em meio LGI-P com adição de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

Menos da metade das proteínas identificadas (5) teve suas expressões relativas diminuídas quando o triptofano foi adicionado ao meio de cultivo. Duas categorias funcionais foram as mais representativas, com 2 proteínas identificadas cada: uma oxidoreductase (*spot* n° 95) e uma pirofosfatase inorgânica (*spot* n° 174) na categoria produção e conversão de energia; e uma ribose-5-fosfato isomerase A (*spot* n° 76) e três isoformas de uma proteína periplasmática de ligação a D-xilose (*spots* n° 100, 132 e 135), na categoria metabolismo e transporte de carboidratos. A proteína superóxido dismutase (n° 67) teve sua expressão diminuída e pode ser incluído na categoria funcional metabolismo e transporte de íons inorgânicos (Figura 27 e Figura 28).

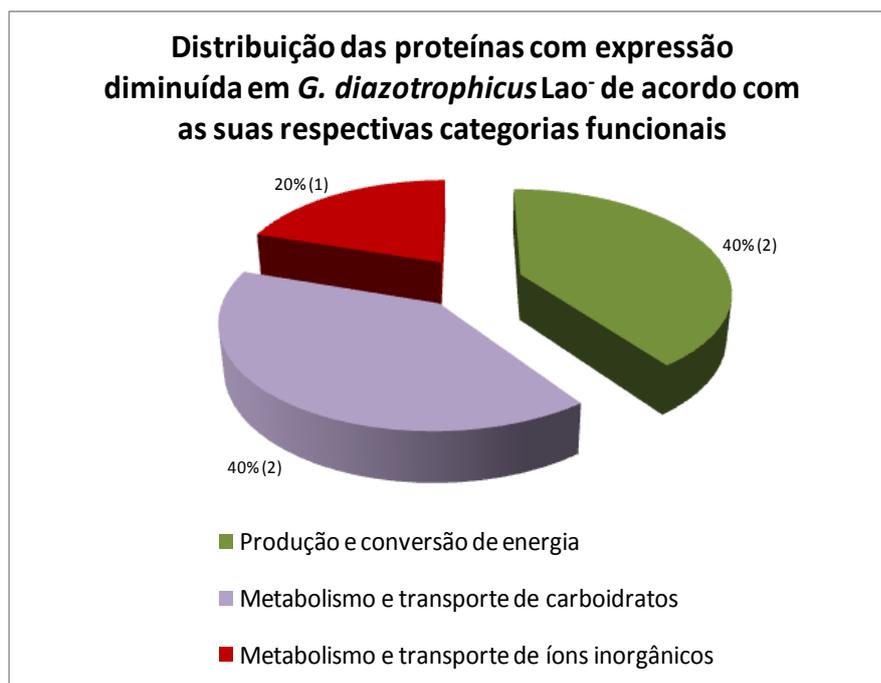


Figura 27: Distribuição das proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* lao⁻ após a adição de triptofano no meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

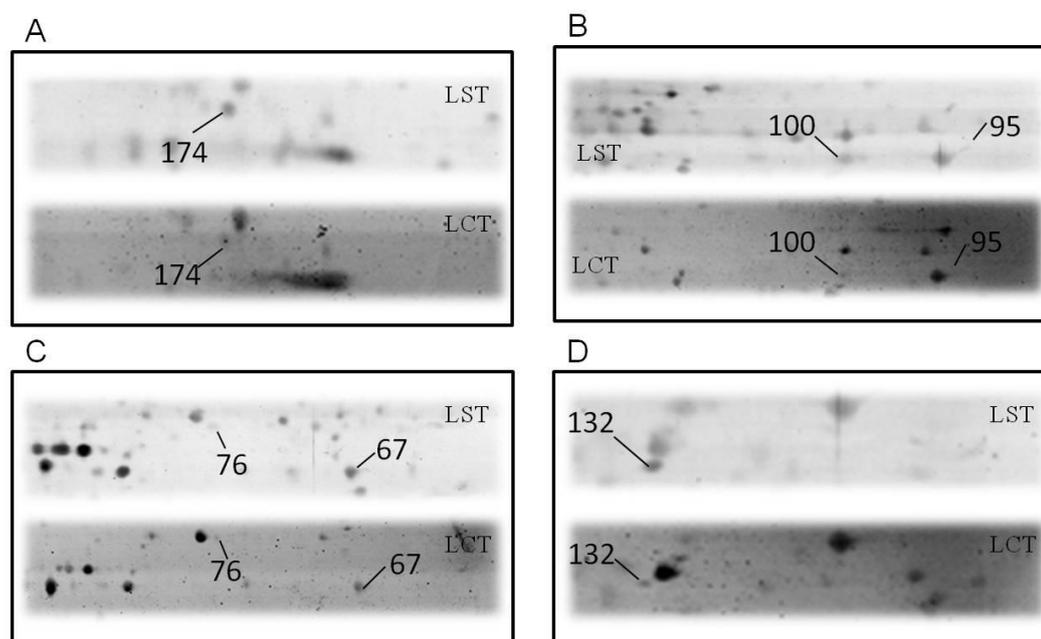


Figura 28: Ampliação de quatro regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em LGI-P com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (LCT) quando comparadas com *G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em LGI-P sem acréscimo de triptofano (LST). Em (A) é possível observar a pirofosfatase inorgânica (n° 174) enquanto que em (B) observa-se uma isoforma da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 100). Já na imagem (C) pode-se observar uma superóxido dismutase (n° 67) e uma ribose-5-fosfato isomerase A. Na figura (D) é possível observar outra isoforma da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 132).

Mais da metade das proteínas de *G. diazotrophicus* lao⁻ identificadas (7) tiveram suas expressões relativas aumentadas quando o triptofano foi adicionado ao meio de cultivo. Três categorias funcionais foram mais representadas entre as categorias de expressão aumentada,

com duas proteínas identificadas cada. Em produção e conversão de energia observou-se uma alcanal monooxigenase (*spot* n° 71) e uma succinato-CoA ligase (formadora de GDP) (*spot* n° 78), já para metabolismo e transporte de carboidratos foi possível observar uma proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (n° 70) e uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (n° 111). Para a categoria metabolismo e transporte de aminoácidos foram identificadas uma 2,3,4,5-tetrahidropiridina 2,6-carboxilato N-succiniltransferase (n° 82) e uma aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (n° 197) (Figura 29 e Figura 30).

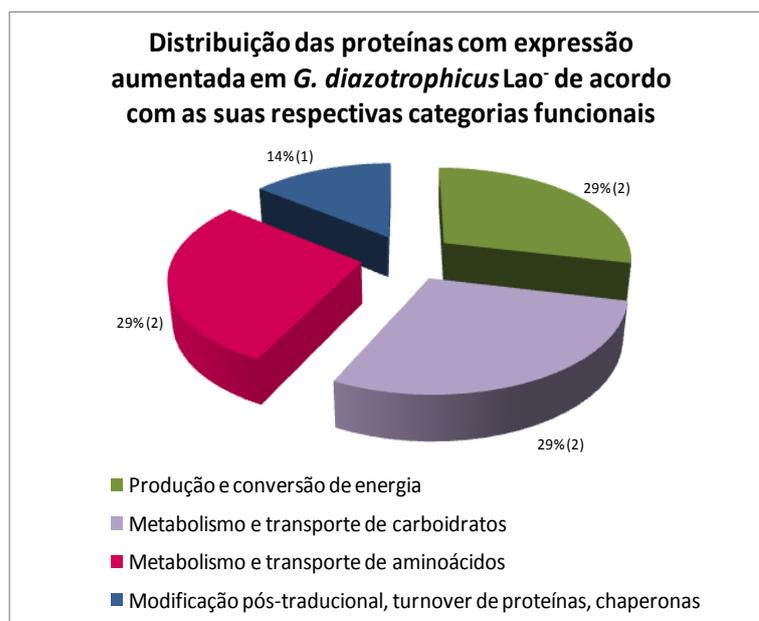


Figura 29: Distribuição das proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* lao⁻ após a adição de triptofano no meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

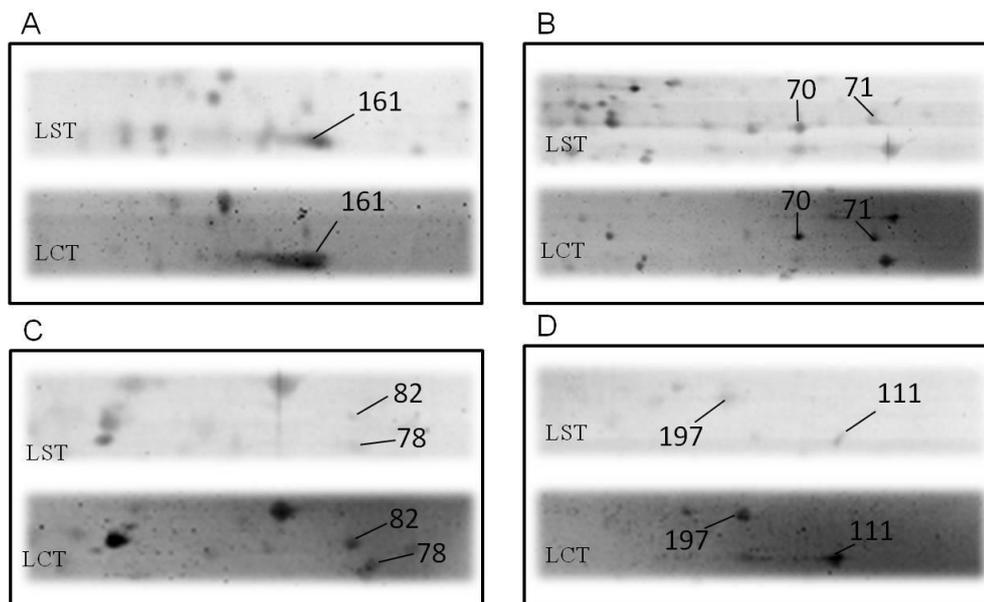


Figura 30: Ampliação de quatro regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em LGI-P com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano (LCT) quando comparadas com *G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em LGI-P sem acréscimo de triptofano (LST). Em (A) é possível observar uma peroxidase (n° 161) enquanto que em (B) observa-se uma proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (n° 70) e uma alcanal monooxigenase (n° 71). Na imagem (C) pode-se observar uma succinato-

CoA ligase (formadora de GDP) (nº 78) e 2,3,4,5-tetrahidropiridina 2,6-carboxilato N-succiniltransferase (nº 82). Já na figura (D) é possível observar gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (nº 111) e uma aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada (nº 197).

3.4 Efeito da mutação no gene *lao* no perfil de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5

Com o intuito de avaliar o efeito provocado no perfil de proteínas pela mutação realizada através da inserção do transposon Tn5 no gene *lao* de *G. diazotrophicus* PAL5, as imagens dos géis bidimensionais contendo as amostras oriundas de *G. diazotrophicus* selvagem PAL5 e do mutante *lao*⁻ cultivado em meio LGI-P na ausência de triptofano foram contrastadas e, a análise computacional resultou na detecção de 118 *spots* apresentando expressão diferencial relativa, com massa molecular (MM) entre 10 e 250 kDa, e pontos isoelétrico compreendendo a faixa 4 a 7. Desses *spots* diferencialmente expressos, 13 apresentaram expressão aumentada em PAL5 cultivada na presença de triptofano, 23 apresentaram expressão diminuída, e 30 foram detectados apenas nessa condição de cultivo, enquanto que 52 *spots* foram detectados exclusivamente no perfil de bactérias PAL5 cultivadas na ausência de triptofano. A análise por espectrometria de massa permitiu a identificação das proteínas oriundas de 17 *spots*, tendo sido obtidas 14 proteínas com sequências diferentes e 3 isoformas (Figura 31). As bactérias *lao*⁻ apresentaram 10 *spots* (8 proteínas) com expressão aumentada e 7 *spots* (6 proteínas) com a expressão diminuída quando comparada com as bactérias controles *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P (Tabela 7).

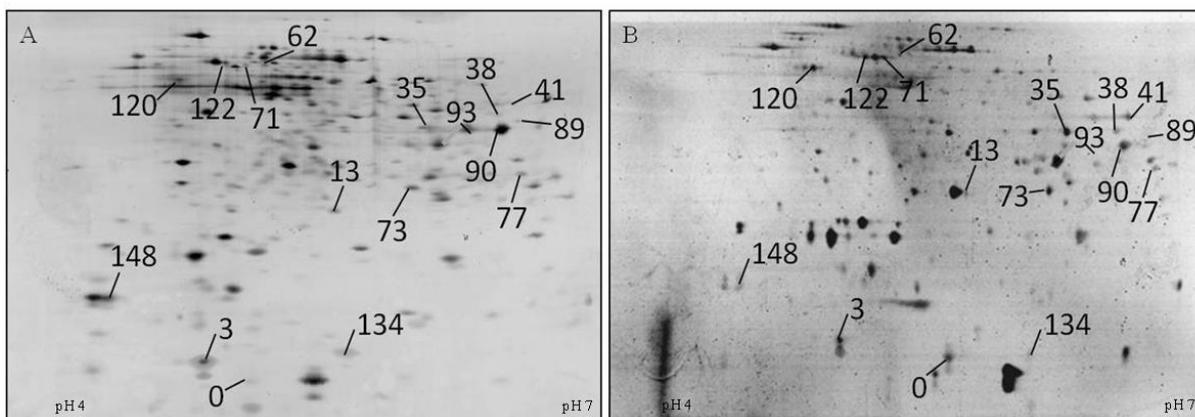


Figura 31: Mapa 2DE contendo proteínas extraídas de 1 replicata biológica de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (A) e *lao*⁻ (B) cultivada em meio LGI-P. Os *spots* das proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos estão numerados: fator de elongação da transcrição (nº 0), lipoproteína de membrana externa (nº 3), ribose-5-fosfato isomerase A (nº 13), proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (nº 35), alcalina monooxigenase (nº 38), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (nº 41), isoformas da chaperonina GroEL (nº 62, 71, 122), 6-fosfogluconolactonase (nº 73), succinato-CoA ligase (nº 77), oxidoreductase (nº 89), isoformas da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (nº 90 e 93), fosfopiruvato hidratase (nº 120), superóxido dismutase (nº 134) e uma proteína hipotética (nº 148).

Tabela 7: Expressão diferencial e categorias funcionais das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* PAL5) e no tratamento (*G. diazotrophicus* lao⁻).

Nº do spot	pI/MM(DA)		score	Expressão relativa	Nº de acesso	ORF	Gene que codifica	Descrição da proteína	Função da proteína
	Experimental	Teórico							
Metabolismo e transporte de carboidratos									
13	5,8/25800	5,44/24724	51	Diminuída em LST	YP_001600580.1	GDI_0292	<i>rpiA</i>	Ribose-5-fosfato isomerase A	Converte ribulose-5-fosfato em ribose-5-fosfato em uma etapa na via das pentoses-fosfato. A ribose-5-fosfato é constituinte dos nucleotídeos, que vão compor os ácidos nucleicos, e de muitas coenzimas, como o ATP, NADH, FADH2 e coenzima A.
35	6,35/36800	5,81/35991	74	Aumentada em LST	YP_001600575.1	GDI_0287	<i>gnd</i>	Proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase	Catalisa a descarboxilação oxidativa de 6-fosfogluconato para formar ribulose 5-fosfato, reduzindo nadp+ a NADPH. A reação é um passo na via de pentose fosfato.
41	6,69/35900	6,07/36095	107	Aumentada em LST	YP_001602546.1	GDI_2302	<i>gap</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Essencial na via da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato na presença de NAD+ e fosfato inorgânico..
73	6,23/27800	5,73/26533	74	Aumentada em LST	P_001600579.1	GDI_0291	<i>pgl</i>	6-fosfogluconolactonase	Catalisa a hidrólise da ligação éster de 6-fosfogluconolactona convertendo-a em 6-fosfogluconato, na via das pentose-fosfato.
90	6,65/37100	8,68/37291	53	Diminuída em LST	YP_001602778.1	GDI_2534	<i>xylF</i>	Proteína periplasmática de ligação a D-xilose	Relacionada ao metabolismo de carboidratos e também à sinalização celular. Apresenta domínio de ligação de açúcar, LacI.
93	6,35/36800	8,68/37291	85						
120	4,93/43200	4,70/44895	48	Aumentada em LST	YP_001602172.1	GDI_1927	<i>eno</i>	Fosfopiruvato hidratase (enolase)	Catalisa a desidratação reversível de 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato, como parte da via glicolítica. A reação é facilitada pela presença de íons metálicos.
Produção e conversão de energia									
38	6,61/37200	5,99/36309	122	Aumentada em LST	YP_001600540.1	GDI_0251	<i>luxA</i>	Alcanal monooxigenase	Utiliza o O2 como oxidante e com a incorporação ou redução do oxigênio que não pode ser derivado do O2
77	6,8/30100	6,30/29821	117	Aumentada em LST	YP_001603185.1	GDI_2952	<i>sucD</i>	Succinato-CoA ligase (formadora de GDP)	Catalisam o primeiro passo que leva à oxidação do ácido succínico pela formação reversível de succinil-CoA a partir do succinato e CoA, com a clivagem de GTP a GDP e ortofosfato.
89	6,7/35900	6,18/36265	127	Diminuída em LST	YP_001603684.1	GDI_3455	-	Oxidoreductase	Cataliza a transferência de elétrons de uma molécula redutora para uma molécula oxidante. Normalmente utiliza NADP ou NAD como cofator.

Nº do spot	pI/MM(DA)	score	Expressão relativa	Nº de acesso	ORF	Gene que codifica	Descrição da proteína	Função da proteína
Experimental	Teórico							
Modificação pós-traducional, turnover de proteínas e chaperonas								
62	5,28/58200	4,97/57938	76					
71	5,35/55800	5,43/57938	62	Aumentadas em LST	YP_001602294.1	GDI_2049	<i>groEL</i>	Chaperonina GroEL (60kDa)
122	5,25/58100	5,03/57299	94					Também conhecida como chaperonina 60, é uma proteína constitutivas do grupo I das chaperoninas que aumentam em quantidade após diversos tipos de estresse. Com a ajuda da co-chaperonina GroES, GroEL encapsula proteínas no interior da cavidade do complexo GroEL-ES e promove seu dobramento usando energia derivada da hidrólise de ATP, especialmente sob condições de estresse.
0	5,38/14800	4,85/16452	56	Aumentada em LST	YP_001603571	GDI_3340	<i>greA</i>	Fator de alongação da transcrição (GreA)
								Promovem o alongamento da transcrição estimulando a atividade de clivagem endonucleolítica da RNA polimerase.
Envoltório celular e membrana externa								
3	5,13/15800	5,49/16740	118	Diminuída em LST	YP_001601088.1	GDI_0807	<i>omp</i>	Lipoproteína de membrana externa (omp16)
								Proteínas que estão associadas de forma não-covalente com peptidoglicanos, uma rede de cadeias de glicano composta de dissacarídeos, que são reticuladas por meio de pontes de peptídeos curtos
Metabolismo e transporte de íons inorgânicos								
134	5,67/21300	5,96/22213	120	Diminuída em LST	YP_001602413.1	GDI_2168	<i>sodB</i>	Superóxido dismutase
								Catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao oxigênio.
Proteínas hipotéticas								
148	4,35/23500	4,27/24819	53	Diminuída em LST	YP_001602573.1	GDI_2329	-	Proteína hipotética GDI_2329
								-

A Figura 32 mostra a distribuição das proteínas de *lao*⁻ cultivada em meio LGI-P de acordo com as suas respectivas categorias funcionais baseadas no COG (*cluster of orthologous groups*) e enfatiza a importância do transporte e metabolismo de carboidratos bem como a produção e conversão de energia, para as condições de cultivo avaliadas.

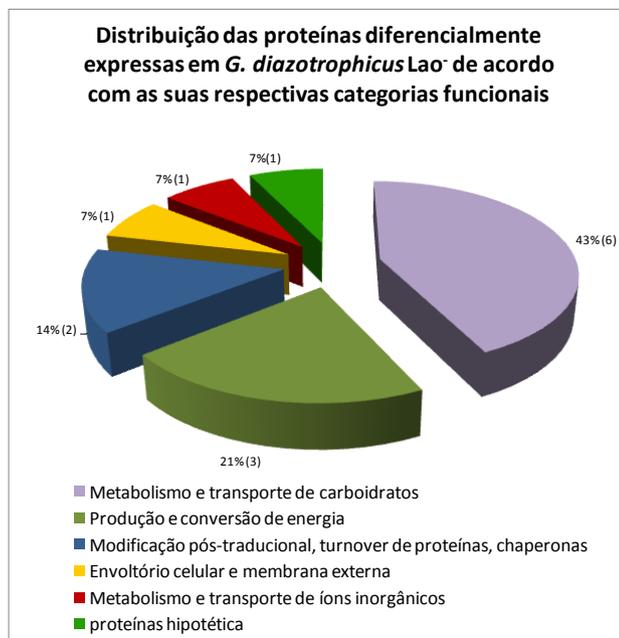


Figura 32: Distribuição das proteínas diferencialmente expressas em *G. diazotrophicus* *lao*⁻ cultivada em meio LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

Dentre as 15 proteínas identificadas como diferencialmente expressas, seis delas tiveram suas expressões relativas diminuídas quando o gene *lao* de *G. diazotrophicus* PAL5 foi interrompido através da inserção do transposon Tn5. A categoria funcional com o maior número de proteínas identificadas foi metabolismo e transporte de carboidratos, com duas integrantes: ribose-5-fosfato isomerase A (*spot* nº 13) e duas isoformas da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (*spots* nº 90 e 93). As outras quatro categorias funcionais contempladas tiveram uma proteína com expressão diminuída identificada. Para produção e conversão de energia observou-se uma alcanal monooxigenase (*spot* nº 38). Já para a categoria envoltório celular e membrana externa identificou-se uma lipoproteína de membrana externa (*spot* nº 3), enquanto que para metabolismo e transporte de íons inorgânicos foi possível observar uma superóxido dismutase (*spot* nº 134). Também foi observada uma proteína hipotética (*spot* nº 148) (Figura 33 e Figura 34).

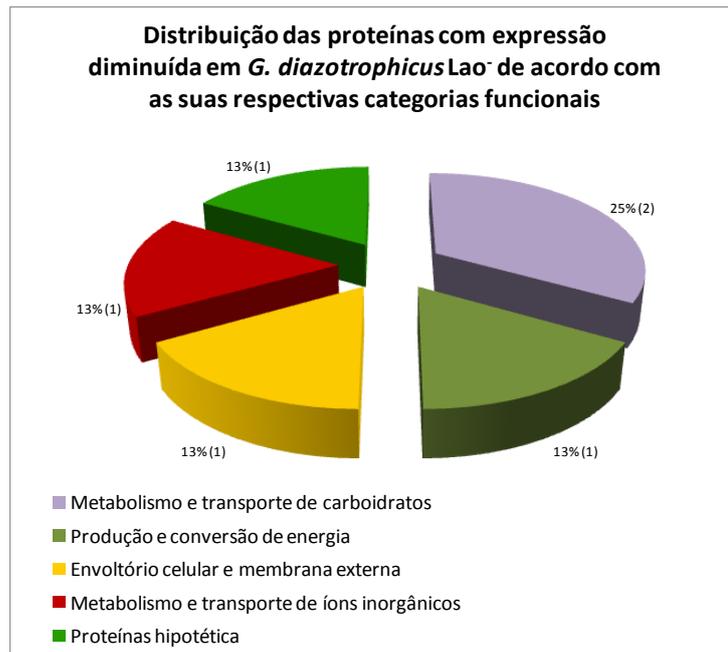


Figura 33: Distribuição das proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* lao⁻ em meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

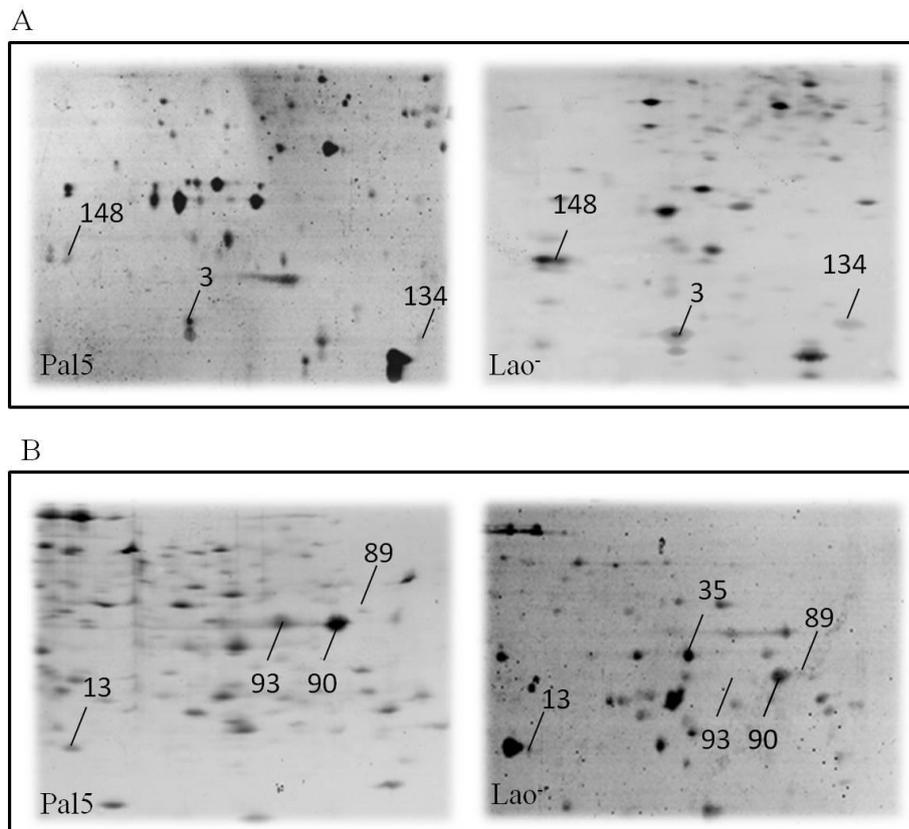


Figura 34: Ampliação de duas regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão diminuída em *G. diazotrophicus* lao⁻ quando comparadas com a estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus*. Em (A) é possível observar a lipoproteína de membrana externa (n° 3), a superóxido dismutase (n° 134) e uma proteína hipotética (n° 148) enquanto que em (B) observa-se uma ribose-5-fosfato isomerase A (n° 13), oxidoreductase (n° 89) e duas isoformas da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 90 e 93).

Mais da metade das proteínas identificadas do mutante *lao⁻* (8) tiveram suas expressões relativas aumentadas quando comparadas com a estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus*. Dentre essas oito proteínas, metade delas (4) se encaixava na categoria funcional metabolismo e transporte de carboidratos: uma proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (nº 35), uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (nº 41), uma 6-fosfogluconolactonase (nº 73) e uma fosfopiruvato hidratase (nº 120). As outras duas categorias contempladas obtiveram duas proteínas cada: em produção e conversão de energia observou-se uma alcanal monooxigenase (nº38) e uma succinato-CoA ligase (nº 77) e em modificação pós-traducional, *turnover* de proteínas e chaperonas, um fator de alongação da transcrição (nº 0) e três isoformas da chaperonina GroEL (nº 62, 71 e 122) (Figura 35 e Figura 36).

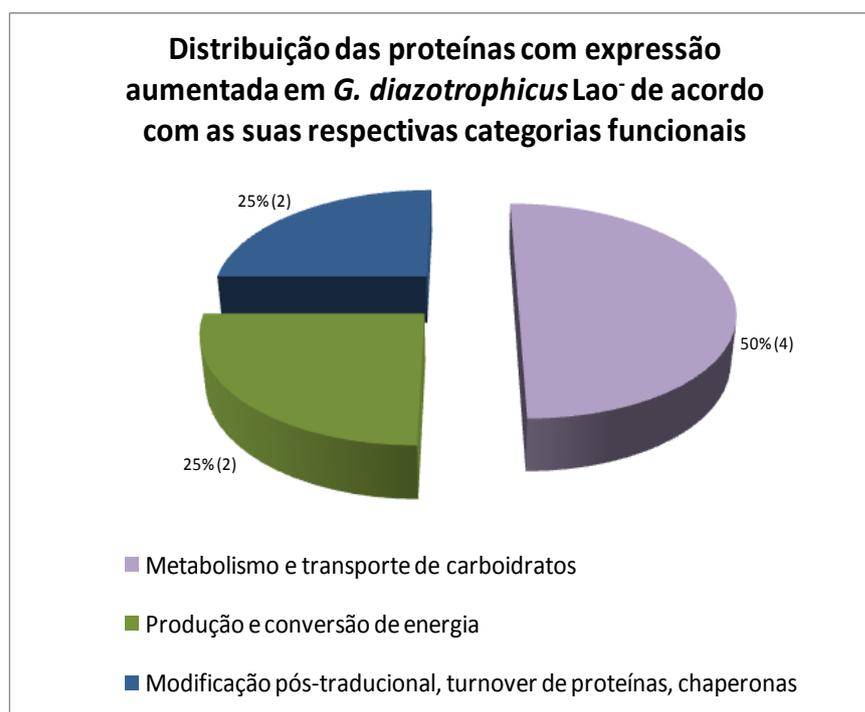


Figura 35: Distribuição das proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* *lao⁻* em meio de cultivo LGI-P de acordo com as categorias funcionais. Os números entre parêntesis representam a quantidade de proteínas em cada categoria funcional, precedidos de seu percentual.

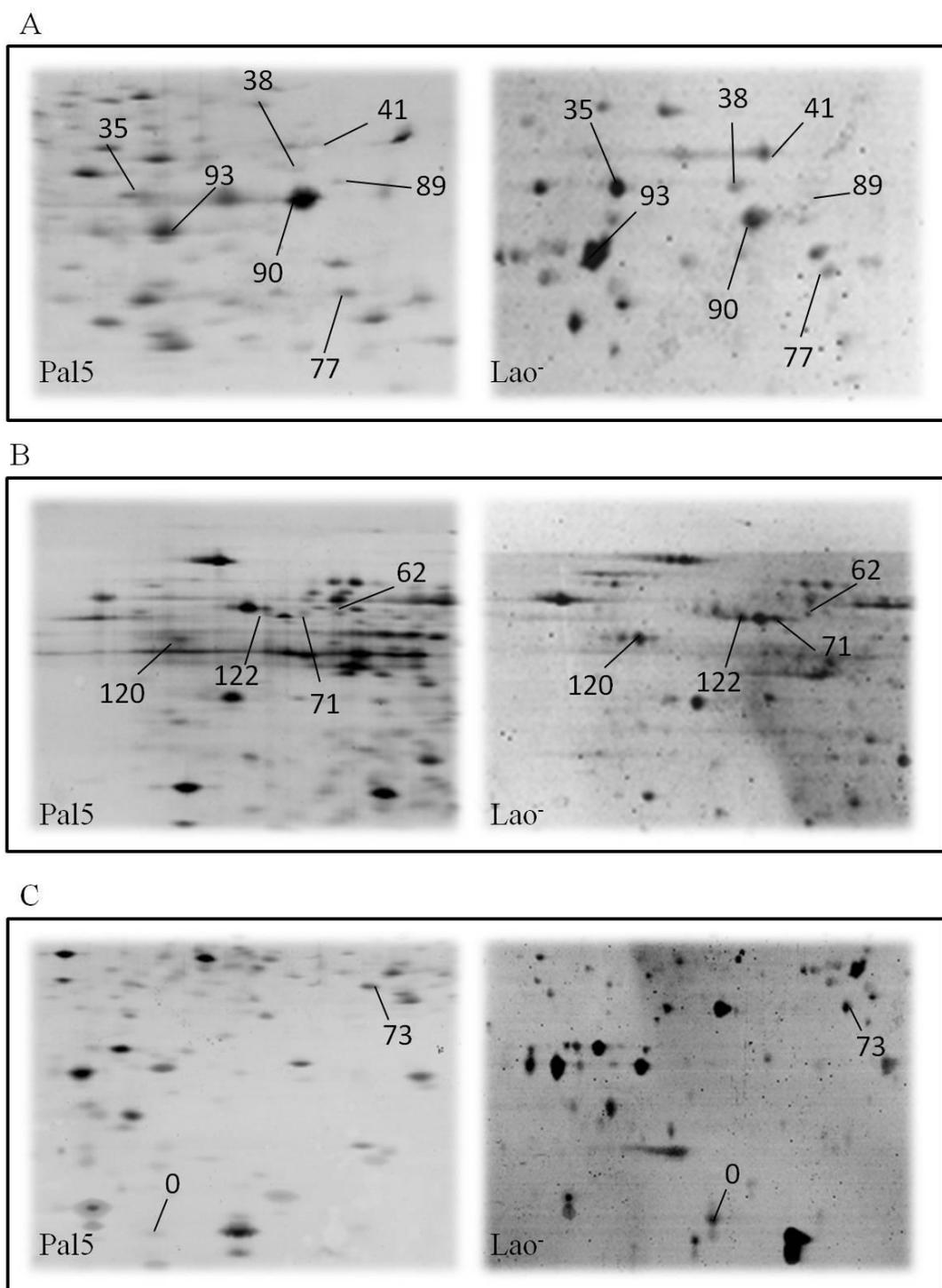


Figura 36: Ampliação de três regiões distintas dos géis bidimensionais ressaltando as proteínas com expressão aumentada em *G. diazotrophicus* lao⁻ quando comparadas com a estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus*. Em (A) é possível observar a proteína do tipo fosfogluconato desidrogenase (n° 35), a alcanal monooxigenase (n° 38), o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (n°41), o succinato-CoA ligase (n° 77) e duas isoformas da proteína periplasmática de ligação a D-xilose (n° 90 e 93). Já em (B) observa-se uma fosfopiruvato hidratase (n° 120) e três isoformas da chaperonina GroEL (n° 62, 71, 122), enquanto que em (C) é possível observar o fator de elongação da transcrição (n° 0) e o 6-fosfogluconolactonase (n° 73).

4DISCUSSÃO

Embora exista um grande número de estudos envolvendo o triptofano em diversos microorganismos (CRAWFORD, 1980; CRAWFORD, 1986; PITTARD, 1996; HERRMANN e WEAVER, 1995) o presente estudo de proteômica envolvendo este aminoácido em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 é inédito. Além disso, este trabalho também traz os primeiros resultados envolvendo a proteômica de um mutante de *G. diazotrophicus* PAL5.

A expressão de algumas proteínas de *G. diazotrophicus* foi alterada tanto na estirpe selvagem quanto no mutante *lao*⁻ em resposta às condições de triptofano utilizadas no meio de cultivo. As expressões relativas de todas as proteínas identificadas foram apoiadas por replicatas biológicas, experimentais e critérios estatísticos. Essas proteínas diferencialmente expressas foram classificadas em várias categorias funcionais (Tabelas 6, 7 e 8). Foi possível observar a expressão diferencial de enzimas presentes em várias vias metabólicas. Elas indicam que além da gliconeogênese, a via das pentoses-fosfato, o metabolismo de aminoácidos, metabólitos secundários e íons inorgânicos são alterados em *G. diazotrophicus* PAL5 e *lao*⁻ quando o triptofano é introduzido no meio de cultivo. Proteínas de outras categorias funcionais como modificação pós-traducional e *turnover* de proteínas e chaperonas, proteínas envolvidas com motilidade e secreção, transporte através da membrana e produção e conversão de energia também foram observadas, indicando que inúmeros mecanismos e sistemas metabólicos da bactéria também estão alterados dependendo da presença ou ausência do triptofano no meio.

Um resultado importante foi a resposta de estresse revelada pela maior presença de proteínas como as chaperoninas do complexo GroESL (GroES e GroEL) quando PAL5 foi cultivada na ausência de triptofano. A chaperonina GroEL, é uma proteína que aumenta em quantidade após diversos tipos de estresse. Juntamente com a co-chaperonina GroES, formam um grande complexo que previne a agregação de proteínas encapsulando-as no interior da cavidade do complexo GroEL-ES e promovendo seu dobramento usando energia derivada da hidrólise de ATP (PRASAD e STEWART, 1992; ELLIS, 2005). Normalmente, este sistema de chaperoninas é necessário nas células, para que as mesmas sejam protegidas contra danos protéicos e injúrias estruturais (PRASAD e STEWART, 1992); no entanto é geralmente estudado em condições de estresse (SHERMAN e GOLDBERG, 1994; ELLIS, 2005). Os resultados desse trabalho apontam que proteínas expressas em *G. diazotrophicus* PAL5 na ausência de triptofano poderiam ser dependentes deste sistema. Resultados similares foram encontrados por Dos Santos (2010) ao cultivar *G. diazotrophicus* PAL5 com plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas por sete dias. De modo análogo a um grupo de proteínas de *E. coli* cujo envelhecimento é dependente exclusivamente deste complexo GroESL (KERNER, 2005), as proteínas expressas em *G. diazotrophicus* quando cultivada juntamente com as plântulas poderiam ser dependentes deste tipo de sistema, bem como as proteínas expressas por esta mesma bactéria quando o triptofano estava ausente do meio de cultivo. O mesmo comportamento de expressão foi obtido por Lery et al (2011) ao cultivar PAL5 com plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas da variedade SP70-1143, onde diversas proteínas diferencialmente expressas indicaram que as células de PAL5 perceberam os sinais da planta e apresentaram uma resposta geral à interação em 24 horas, ocorrendo adaptação celular durante essa interação. Dentre essas proteínas, observou-se a GroEL. Segundo Baron e Zambryski (1995), a interação entre uma bactéria endofítica e sua planta hospedeira é uma fonte de estresse biótico para ambos os organismos. Em *E. coli* existe variação de concentração de GroEL e GroES após choque térmico (BUKAU e HORWICH, 1998), e em *Streptococcus pyogenes*, GroEL é induzida após choque térmico de 42°C por 5 minutos, e após 30 minutos a expressão retorna a níveis basais (LAPORT et al, 2001). Em *Sinorhizobium*

meliloti, duas isoformas desta chaperona também foram encontradas em resposta ao choque térmico (NATERA et al., 2000). Já Silveira (2009) observou GroES tanto nas amostras controles quanto nas amostras de *Herbaspirillum seropedicae* submetidas ao choque térmico por 30 minutos a 42°C, sugerindo que esta chaperona possui expressão constitutiva nesta bactéria, sem diferença quantitativa nas condições controle e de estresse. É importante enfatizar que também existem outras evidências de que as chaperonas são proteínas essenciais não somente em condições de estresse, mas estão igualmente envolvidas na fisiologia bacteriana sob condições normais (FAYET et al., 1989). Dados experimentais sugerem que elas se ligam a moléculas de mRNA para regular a tradução e controlar a taxa de degradação de mRNA e término da transcrição. (ERMOLENKO e MAKHATADZE, 2002). A falta deste aminoácido ativa a transcrição dos genes do operon *trp* e, conseqüentemente sua biossíntese. De alguma forma, essas proteínas poderiam estar envolvidas neste controle da transcrição, ajustando finamente a biossíntese do triptofano em PAL5.

Uma observação importante foi a presença da chaperonina GroEL em três isoformas diferentes quando PAL5 foi cultivada na ausência de triptofano. Ela esteve presente em três posições com massas muito semelhantes e valores de pI variando de 5,28 a 5,64. Chaves (2008) observou essa chaperonina em duas posições nos géis contendo as proteínas de *H. seropedicae* SmR1 cultivado em meio com excesso de amônio e Silveira (2009) também observou duas isoformas dessa chaperonina em *H. seropedicae* submetidas ao choque térmico. Dos Santos (2010) encontrou três isoformas de GroEL no perfil protéico de *G. diazotrophicus* PAL5 co-cultivada com plântulas de cana de açúcar por 7 dias. Esses resultados sugerem eventos de fosforilação e adenililação, ou seja, modificações pós-traducionais dessas proteínas. A GroEL de *E. coli* é fosforilada em resposta ao choque térmico (NATERA et al., 2000), mas em condições normais, a forma fosforilada está presente apenas em pequenas quantidades. A presença de múltiplas isoformas desta chaperonina foi relatada em diversos estudos proteômicos (NATERA et al., 2000), e evidências de modificação por fosforilação foram obtidas através da presença de peptídeos com sítios prováveis de fosforilação observados com auxílio de bioinformática (CHAVES, 2008).

A 6-fosfogluconato desidrogenase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em *G. diazotrophicus* laõ tiveram a expressão aumentada quando o triptofano foi adicionado ao meio de cultivo. Essas mesmas proteínas, além de 6-fosfogluconolactonase e fosfoenolpiruvato hidratase também foram reguladas para mais nas células de laõ quando comparadas com PAL5. A estirpe selvagem quando cultivada na presença do aminoácido também teve a fosfoenolpiruvato hidratase sendo mais expressa do que na ausência do triptofano. O aumento da expressão dessas proteínas indica a ocorrência de uma maior atividade do metabolismo de carboidratos, por consequência, o aumento da produção do fosfoenolpiruvato. Este composto é precursor da rota do ácido xiquímico, importante via metabólica cujo produto final é o corismato, precursor comum da biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 8). Quando concentrações adequadas de triptofano estão presentes no meio de cultivo, a molécula ativa do repressor *trpR* inibe a transcrição do operon *trp* bem como dos genes *aroH* e *aroL* (envolvidos na biossíntese do corismato) (PITTARD, 1996; XIE et al., 2003). Portanto, a adição do triptofano ao meio de cultivo regula para menos a expressão de genes envolvidos na via de biossíntese do corismato, diminuindo sua produção. Assim, o aumento da atividade das enzimas da via de biossíntese de carboidratos e, por conseguinte, o aumento da concentração de fosfoenolpiruvato pode ter ocorrido com o objetivo de suprir a carência do corismato e não prejudicar a síntese dos outros aminoácidos aromáticos, de extrema importância para as células. Lery et al (2011) observou que a fosfoenolpiruvato hidratase foi regulada para mais quando PAL5 foi cultivada por 24 horas na presença de plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas SP70-1143; entretanto, a expressão dessa proteína e de outras envolvidas no metabolismo de carboidratos,

como: 6-fosfogluconato desidrogenase, fosfoglicomutase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase tiveram a expressão diminuída em PAL5 co-cultivada com plântulas de cana micropropagadas por 7 dias (DOS SANTOS, 2010) indicando que esta bactéria não se utiliza da glicólise na presença da planta.

Através de pesquisas de bioinformática com auxílio do Kegg, observou-se que a enzima L-amino ácido oxidase (EC: 1.4.3.2) possui atividade em diversas vias metabólicas: no metabolismo de alanina, aspartato, glutamato, cisteína, metionina, fenilalanina e triptofano, além da degradação de valina, isoleucina e tirosina e biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano. A sua interrupção, provavelmente afetou todos os processos mencionados acima e, conseqüentemente, a produção de carboidratos. A alteração na produção de carboidratos justificaria a diminuição da expressão da proteína periplasmática de ligação de D-xilose (XylF) em *G. diazotrophicus* lao⁻. Esta proteína está relacionada ao metabolismo de carboidratos, atuando como transportador da Xilose contra o gradiente de concentração. Também atua na sinalização celular e apresenta um domínio de ligação de açúcar LacI. Este domínio inclui receptores quimiostáticos, transportador de inúmeras moléculas glicídicas, reguladores da transcrição de vias metabólicas da utilização de carbono e sistemas de gradiente contra concentração (WEICKERT e ADHYA, 1992; BLATTNER, 1997).

Diversas proteínas envolvidas com a manutenção do nível oxidativo tiveram a expressão alterada quando o triptofano foi adicionado ao meio de cultivo. Dentre elas, a catalase (*katA*), enzima pertencente ao grupo das peroxidases, que foi regulada negativamente quando PAL5 foi cultivada na presença do aminoácido aromático. As catalases são oxireductases envolvidas na degradação de peróxido de hidrogênio (ARDISSONE, 2004). Com disponibilidade de triptofano, as vias IPyA e TRP de biossíntese de AIA podem ser ativadas normalmente. Algumas reações presentes nessas vias produzem H₂O₂ como subprodutos, que poderiam justificar o aumento da expressão da catalase nessas condições. Além disso, KatA está envolvida na produção de hidroxiantranilato que irá produzir antranilato, precursor da via de biossíntese do triptofano. Portanto, na presença de triptofano no meio de cultivo a diminuição da expressão de KatA em PAL5 pode ter ajudado a reduzir os níveis de antranilato e, conseqüentemente, regular a produção de triptofano através da diminuição da concentração do seu precursor. Dos Santos (2010) observou uma diminuição dos níveis de expressão da catalase em PAL5 co-cultivadas com plântulas de cana por sete dias, o que indicaria a diminuição da defesa da bactéria durante a interação com a planta.

A superóxido dismutase foi outra enzima envolvida com o estresse oxidativo que teve a expressão reduzida em PAL5 cultivada com triptofano e no mutante lao⁻. Provavelmente, a adição do aminoácido ao meio de cultivo e a interrupção do gene *lao* levaram a uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio, provocando uma diminuição na síntese desta enzima, uma importante defesa antioxidante. A superóxido dismutase também foi encontrada dentre as proteínas identificadas no secretoma de *H. seropedicae* (CHAVES, 2008) e de diversos outros organismos (ANTELMANN et al., 2001). Esta proteína foi identificada no proteoma celular de *H. seropedicae* (CHAVES et al., 2007), entretanto, sua abundância relativa no secretoma (2,3%) foi superior à encontrada no proteoma (0,18%), indicando que sua concentração é maior no meio extracelular, podendo ser importante para proteger a bactéria do dano oxidativo com o qual muitas plantas reagem às infecções bacterianas. Já foi demonstrado que a superóxido dismutase diminui os efeitos tóxicos causados por espécies reativas de oxigênio produzidas pelas plantas (GOURION et al., 2006). Outro resultado que corrobora com Chaves (2008), foi a presença de superóxido dismutase no perfil de proteínas superexpressas por *G. diazotrophicus* PAL5 na presença de cana-de-açúcar. A presença dessa proteína possivelmente seria um mecanismo através do qual a bactéria lidaria com o estresse oxidativo nas raízes das plantas, pois já foi demonstrado que a

explosão oxidativa é uma resposta de defesa da planta em um primeiro momento durante a interação planta-bactéria (BARON e ZAMBRYSKI, 1995).

Duas proteínas envolvidas na produção e conversão de energia tiveram suas expressões reduzidas quando PAL5 foi cultivada na presença de triptofano: álcool desidrogenase *Zinc-type* e subunidade beta da ATP sintase.

Em bactérias, tanto a hidrólise quanto a síntese do ATP são catalisadas pela ATP sintase, dependendo das necessidades metabólicas da célula (SENIOR e WEBER, 2004). Em muitas espécies bacterianas tolerantes à acidez já foi observado que a atividade dessa enzima responde ao pH baixo (YOKOTA et al., 1995). A atividade mais elevada da ATP sintase sob baixo pH iria causar a hidrólise de ATP acoplado ao bombeamento de prótons para fora da membrana, a fim de manter constante o pH nestas espécies ácido-tolerantes. Com adição de triptofano ao meio de cultivo, a produção de ácido indol acético por PAL5 aumentaria, diminuindo momentaneamente o pH interno das células. No entanto, esses compostos indólicos são posteriormente excretados, diminuindo o pH do meio de cultivo. Esses dados sugeririam um aumento na expressão da ATP sintase entretanto, não foi o observado neste estudo, onde a expressão da subunidade beta da ATP sintase foi reduzida quando PAL5 foi cultivada na presença de triptofano, sugerindo que a adição deste aminoácido reduziu o consumo energético por parte da bactéria. Duas isoformas da subunidade beta da ATP sintase foram identificadas por Chaves, sugerindo a presença de modificação pós-traducional. A subunidade beta da ATP sintase de *Xanthomonas axonopodis* foi induzida quando este microrganismo foi cultivado em meio de cultura contendo extrato de folha (MEHTA e ROSATO, 2005) e, em *G. diazotrophicus* PAL5 quando co-cultivada com plântulas de cana-de-açúcar da variedade Chunne por um dia (LERY et al., 2011).

Em resposta à mutação, a enzima Succinil-CoA ligase (*sucD*) teve sua expressão diminuída. Esta enzima catalisa a conversão reversível de succinato à succinil-CoA, com formação de GDP. Conforme já foi discutido anteriormente, a enzima Lao participa de diversos processos metabólicos, incluindo o de vários aminoácidos. No metabolismo do aspartato, ela catalisa a conversão reversível de L-Aspartato a oxaloacetato, subproduto do ciclo de Krebs. A redução da produção deste composto oriundo do metabolismo do aspartato devido à inativação da enzima Lao, poderia ser a causa da diminuição da expressão da Succinil-CoA ligase observada no perfil de proteínas do mutante *lao*⁻. Pouco oxaloacetato produzido geraria pouco succinil-CoA no ciclo de Krebs e a Succinil-CoA ligase teria seu substrato reduzido através de um efeito cadeia e, conseqüentemente, reduziria sua atividade. Dos Santos (2010) apenas observou a expressão desta enzima na bactéria co-cultivada com as plântulas de cana. Essa observação indicaria que *sucD* poderia ser parte da inicialização ou processo de associação da bactéria com a planta, pois uma maior atividade dessa enzima poderia levar ao aumento da síntese de propionil-CoA, envolvido na produção de etileno ou ao aumento de succinato, relacionado com a síntese de exopolissacarídeos.

O estudo do perfil de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 envolvendo a suplementação do meio de cultivo com o triptofano é um trabalho pioneiro com esta bactéria. Com o objetivo de entender melhor como ocorre a biossíntese deste aminoácido neste microrganismo, estão sendo realizados no laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia estudos de qPCR envolvendo a expressão dos genes do operon *trp* e diferentes concentrações de triptofano adicionadas ao meio de cultivo (0, 25, 50, 100 e 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Este trabalho poderá auxiliar no entendimento de como se dá o processo de regulação destes genes em PAL5 quando ocorre a disponibilidade do triptofano em diferentes concentrações. Em adição, essas análises ajudariam a especular como esse processo se dá durante a interação com plantas de cana-de-açúcar, onde o triptofano exsudado pelas raízes certamente contribui para o controle da biossíntese de AIA que irá participar no processo inicial de interação com a planta e na promoção do crescimento radicular das mesmas.

De forma a complementar este estudo de proteômica, algumas enzimas diferencialmente expressas como a fosfoenolpiruvato hidratase, a catalase, e as chaperonas GroES e GroEL podem ser avaliadas em estudos de PCR em tempo real. Estas análises teriam a finalidade de comprovar a alteração na expressão dessas proteínas também a nível transcricional, sob influência da presença do triptofano no meio de cultivo ou, ainda, verificar se essas proteínas sofrem alguma regulação pós-traducional e, por isso, tiveram seus níveis de expressão modificados nos géis 2DE-PAGE. Esses estudos poderão ajudar a entender como o triptofano atua no metabolismo de *G. diazotrophicus* PAL5 e, se a mutação na enzima Lao influencia outras vias metabólicas da bactéria, a ponto de interferir na expressão de determinadas proteínas a nível transcricional.

5 CONCLUSÕES

Proteínas pertencentes à categoria modificação pós-traducional, turnover de proteínas e chaperonas foram menos expressas em PAL5 cultivada na presença do que na ausência de triptofano.

A proteína fosfoenolpiruvato hidratase teve a expressão aumentada quando a estirpe PAL5 foi cultivada na presença do que na ausência do triptofano.

Proteínas pertencentes à categoria produção e conversão de energia foram diferencialmente expressas no mutante *lao⁻* cultivado na presença e na ausência de triptofano.

A grande parte das proteínas que tiveram expressão diferencial no mutante *lao⁻* de *G. diazotrophicus* em comparação com a estirpe selvagem pertenciam à categoria metabolismo e transporte de carboidratos.

Em nenhuma condição analisada foram observadas proteínas relacionadas com a biossíntese de triptofano possivelmente devido ao baixo rendimento das identificações das proteínas diferencialmente expressas durante a espectrometria.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE MUTANTES DE *G. DIAZOTROPHICUS* PAL5 QUANTO A SUA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.

RESUMO

Com o objetivo de definir o papel das auxinas produzidas por *G. diazotrophicus* PAL5 durante a associação com plantas de cana-de-açúcar, foram realizados dois experimentos de inoculação com plantas micropropagadas. O primeiro, conduzido em condições de hidroponia pelo período de 10 dias, mostrou efeito significativo da inoculação da estirpe selvagem PAL5 na promoção de crescimento da parte aérea das plantas um dia após a inoculação e que se manteve até o final das coletas. Já o mutante *lao*⁻, defeutivo na produção de compostos indólicos, não diferiu estatisticamente do controle não inoculado. O outro experimento, foi conduzido em vasos com substrato areia:vermiculita (2:1) pelo período de 120 dias. As plântulas foram inoculadas *in vitro* com a estirpe selvagem PAL5 e os respectivos mutantes *lao*⁻ e *nif*⁻ (não fixadora de nitrogênio), aclimatizadas por 30 dias e transplantadas para os vasos e adubadas com N (60 e 120 kgN.ha⁻¹) na forma de sulfato de amônio enriquecido com ¹⁵N. Os resultados mostraram uma diferença visual nas raízes das plantas inoculadas com PAL5 que se apresentaram mais volumosas, aparentando um número mais elevado de raízes secundárias e pêlos radiculares. Já as plantas inoculadas com *lao*⁻ apresentaram raízes mais grossas, com um número muito reduzido de ramificações ou pêlos radiculares. A biomassa seca da parte aérea das plantas inoculadas com PAL5 foi superior àquelas inoculadas com as estirpes mutantes para as duas doses de nitrogênio. Porém essa diferença não foi significativa. As plantas cultivadas com a menor dose de N e inoculadas com os mutantes apresentaram acúmulo de massa seca na parte aérea inferior às plantas inoculadas com a estirpe selvagem. A análise do ¹⁵N incorporado nos tecidos das plantas que receberam 120 kgN.ha⁻¹ não evidenciaram a ocorrência de contribuição da FBN. Por outro lado, foram observadas diferenças, ainda que não significativas, na eficiência do uso do N aplicado. As plantas inoculadas com PAL5 apresentaram uma menor recuperação do N fertilizante do que as plantas inoculadas com *nif*⁻. É possível que o tempo de cultivo e o espaço físico dos vasos tenham sido limitantes para o desenvolvimento das plantas, subestimando assim a absorção de nutrientes e também o processo de FBN. Desta forma, novos experimentos devem ser realizados em condições mais apropriadas para confirmar a influência da produção de índoles e da FBN durante a associação da bactéria *G. diazotrophicus* com as plantas de cana-de-açúcar.

Palavras - chave: inoculação, promoção do crescimento, cana-de-açúcar

ABSTRACT

In order to define the role of auxin produced by *G. diazotrophicus* PAL5 during association with sugarcane plants, two inoculation experiments were conducted using micropropagated plants. The first experiment, carried out in hydroponic conditions for 10 days, showed a significant inoculation effect of the wild type on plant shoot one day after inoculation and the same behavior was maintained for until the end of experiment. However, the plants inoculated with *lao*⁻ mutant, defective in indole compounds production were not significantly different from uninoculated control. The other experiment, was conducted in pots containing sand:vermiculite substrate for a period of 120 days. The seedlings were inoculated *in vitro* with both wild-type and mutants *lao*⁻ and *nif*⁻, acclimatized and transplanted to pots fertilized with 60 and 120 kg N ha⁻¹ as ammonium sulphate enriched with ¹⁵N. The results showed a visual difference in the roots inoculated with the wild type PAL5 that is higher volume and suggesting a higher number of secondary roots and root hairs. On the other hand, the plants inoculated with the *lao*⁻ mutant were thicker and lower number of secondary roots and root hairs. The shoot biomass of plants inoculated with the wild type PAL5 was higher than those inoculated with the mutant strains for both N dose, however the difference was not significant at $p < 0.05$. Plants grown with 60 kg N dose and inoculated with the mutants showed lower accumulation of dry shoot mass than plants inoculated with the wild type strain. On the other hand, the ¹⁵N analysis of plant tissues that received 120 kgN.ha⁻¹ did not indicate the occurrence of the BNF contribution in pot growing conditions. However, there were a trend in the N use efficiency. Plants inoculated with Pal5 strain showed lower N fertilizer recovered than those inoculated with the *nif*⁻ mutant. However, the size of the pots may have limited the plant development, suggesting that new experiments should be carried out in more appropriated conditions to confirm the influence of the indol production and of the BNF during the association of the *G. diazotrophicus* and sugarcane plants

Key-words: inoculation, growth promotion, sugarcane

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar historicamente possui enorme relevância econômica e social no Brasil, tendo sido responsável por vários ciclos de riqueza ao longo da história desse país (SZMRECSÁNYI, 1979; RIBEIRO e TONELLA, 2010). Foi introduzida no Brasil, nas chamadas capitanias hereditárias, logo que a colonização pelos portugueses foi iniciada. Em 1550, o Brasil já era o maior produtor de açúcar do mundo e isso rendia lucros à Coroa (FURTADO, 2001).

Na primeira metade do século XX, as regiões Norte e Nordeste se mostravam a principal localidade produtora de açúcar do país. Já a partir da década de 50 a região Nordeste começa a perder a hegemonia e o Centro/Sul do Brasil aparecem como os principais produtores de açúcar do país, devido, principalmente, aos investimentos e concessões de créditos por parte do Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) para construções de usinas e destilarias nessa localidade (TEIXEIRA, 1988). Este instituto, criado pelo governo federal em 1933 se encarregava de dirigir, fomentar e controlar a produção de açúcar e de álcool em todo o país (SZMRECSÁNYI, 1979), promovendo o reerguimento da indústria açucareira, que durante a crise de 1929 sofreu com a superprodução do açúcar além de incentivar a produção do álcool combustível através da construção de destilarias (RIBEIRO e TONELLA, 2010).

Em 1975, instituiu-se o Programa Nacional do Alcool (Proálcool) com o objetivo de expandir a produção de álcool e viabilizar seu uso como combustível auxiliar da gasolina (SZMRECSÁNYI, 1979). O programa também objetivava reduzir a importação de petróleo e equilibrar a balança comercial brasileira, em resposta à primeira crise mundial do petróleo, incentivar a produção em praticamente todas as regiões brasileiras e expandir a produção de bens de capital através da fabricação de equipamentos para as destilarias.

Atualmente o Brasil mantém a hegemonia como o principal produtor mundial da cana-de-açúcar (*Saccharum sp. L.*) e como líder na produção e exportação de açúcar. A atual área plantada desta cultura neste país é de aproximadamente dez milhões de hectares e a produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2010/2011 foi de 624 milhões de toneladas (CONAB, 2011; FAO, 2010).

A existência de diversas espécies de bactérias que vivem em associação com plantas de cana-de-açúcar e, que podem levar a aumentos de produtividade devido à sua ação promotora do crescimento vegetal, eleva o valor estratégico desta cultura. Estudos realizados por pesquisadores da EMBRAPA Agrobiologia com auxílio da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N estimaram que mais de 60% do nitrogênio acumulado em determinadas variedades de cana-de-açúcar foram oriundos da FBN (URQUIAGA et al., 1992). Resultados obtidos por Oliveira e colaboradores (2002) demonstraram a incorporação de até 30% de N, quando plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foram inoculadas com uma mistura de bactérias diazotróficas.

A Dra. Johanna Döbereiner, através do isolamento e identificação de espécies de bactérias diazotróficas endofíticas de ocorrência natural em plantas do gênero *Poaceae* foi uma das principais estudiosas no assunto. Desde a descoberta da presença desses organismos em plantas não-leguminosas, pesquisadores do mundo inteiro contribuíram para o entendimento dos mecanismos e das interações entre essas plantas e bactérias promotoras do crescimento. Porém, ainda não é totalmente claro o entendimento da associação entre microrganismos diazotróficos endofíticos e a cultura da cana-de-açúcar.

1.2 A associação entre bactérias promotoras do crescimento e plantas de cana-de-açúcar

Estudos iniciados por Döbereiner, na década de 50 identificaram a presença de microrganismos fixadores de nitrogênio associados ao cultivo de cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1959). Nos anos 70, diversos experimentos foram realizados utilizando-se N₂ marcado com o isótopo ¹⁵N, no qual foram detectadas contribuições significativas da fixação de N₂ às plantas de cana-de-açúcar (RUSCHEL et al., 1978). Na mesma época introduziu-se o cultivo em meios semi-sólidos, o que aumentou a possibilidade de descoberta de novos gêneros de bactérias diazotróficas (DÖBEREINER, 1992), permitiu comprovar que um grande número de bactérias diazotróficas colonizava o interior dos tecidos das plantas. No fim da década de 80, foi comprovado que várias cultivares de cana-de-açúcar são capazes de obter N através do processo de FBN quando as bactérias estavam associadas à cultura. Essa comprovação foi possível através de trabalhos realizados com auxílio de técnicas de balanço de N total e diluição isotópica de ¹⁵N (LIMA e BODDEY, 1987).

Resultados obtidos por Boddey (2001) através da análise de inúmeras variedades de cana-de-açúcar pela técnica de abundância natural de ¹⁵N observam uma contribuição da FBN em torno de 30%, variando de 0 a 60% dependendo da variedade testada. Contudo, alguns trabalhos realizados com cana-de-açúcar mostraram que a promoção do crescimento das plantas pode não estar obrigatoriamente, atribuída exclusivamente à FBN, mas, principalmente à ação de fitormônios produzidos pelas bactérias e outros efeitos promotores do crescimento, como a solubilização de fosfato, produção de sideróforos.

Dentre as bactérias isoladas de tecidos da cana-de-açúcar, as principais pertencem às espécies dos gêneros *Azospirillum* e *Burkholderia* (REIS et al., 2004), e as espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* (OLIVARES et al., 1996).

A busca por maior ganho na promoção do crescimento vegetal direcionou os estudos para a inoculação de um coquetel de estirpes de bactérias com comprovado efeito de promotor de crescimento. Estes estudos foram inicialmente desenvolvidos por Oliveira et al. (2002), no qual a mistura das espécies diazotróficas endofíticas *G. diazotrophicus* PAL5^T, *Azospirillum amazonense* CBAmC, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 e *Burkholderia tropica* PPe8^T foi inoculada em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. Essas plantas se desenvolveram em vasos com solo e após doze meses os resultados mostraram que estas bactérias foram responsáveis pela contribuição de cerca de 30% do N acumulado nos tecidos, dependendo de combinação de bactérias usadas.

A mesma mistura bactéria foi inoculada por Oliveira et al. (2006) em duas variedades de cana-de-açúcar (SP70-1143 e SP81-3250) crescidas em três solos contrastantes quanto à fertilidade natural (Planossolo, Latossolo e Nitossolo) e verificaram que o efeito da inoculação sobre a FBN e a produção dos colmos foi maior na variedade SP70-1143 crescidas num Planossolo sem fertilização nitrogenada.

Em um estudo de inoculação realizado por Sevilla e colaboradores (2001) plantas de cana-de-açúcar micropropagadas foram inoculadas com a estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus* e um mutante defectivo na FBN (MAd3A). Após a colonização por ambas as bactérias, as plantas de cana-de-açúcar foram coletadas 60 dias após terem sido inoculadas com a estirpe selvagem cresceram melhor e tiveram conteúdo de N superior às plantas controle ou às inoculadas com o mutante *nif*, em condições limitantes de N. Esses resultados indicaram que a FBN é um mecanismo significativo na promoção do crescimento nesta interação. Já quando o N não foi um fator limitante, foi possível observar a promoção de crescimento tanto das plantas inoculadas com a estirpe selvagem quanto as inoculadas com o

mutante MAd3A, sugerindo a existência de outros mecanismos envolvidos na promoção do crescimento além da FBN.

Portanto, experimentos comparando a promoção de crescimento promovida por mutantes *nif* e por mutantes defectivos na produção de AIA poderiam ajudar a esclarecer qual a influência de cada um desses efeitos. Para tal, este segundo capítulo desta tese, fez uso de um mutante AIA⁻ de *G. diazotrophicus*, que produz 95% menos compostos indólicos do que a estirpe selvagem PAL5 (RODRIGUES, 2008) para a inoculação de plantas de cana-de-açúcar com o objetivo de definir a influência das auxinas produzidas por este microorganismo na promoção de crescimento dessa cultura.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Definição da concentração de bactérias capaz de promover o crescimento vegetal em experimentos de inoculação:

Com o objetivo de definir a melhor concentração de UFC.ml⁻¹ a ser utilizada nos experimentos de inoculação, foi realizado um experimento piloto com diferentes concentrações de bactérias para avaliar a promoção de crescimento de plântulas de arroz. Esta cultura foi escolhida devido ao estabelecimento da metodologia em trabalhos anteriores do grupo (ROUWS et al., 2010; MENEZES, 2011) e ao curto tempo de desenvolvimento das plântulas.

Para tal, sementes de arroz da variedade IAC-4440 foram descascadas e suas superfícies foram desinfestadas conforme Hurek et al. (1994). Após desinfestação, as sementes foram transferidas assepticamente para placas contendo meio LB 10X diluído com 1% de Agar (50 mg.l⁻¹ de extrato de levedura, 100 mg.l⁻¹ de triptona e 100 mg.l⁻¹ de NaCl), que foram incubadas por 1 dia a 25°C com fotoperíodo de 12 h, para a germinação. Após um dia de germinação as plântulas livres de contaminação por microrganismos foram imersas em solução salina contendo células de *G. diazotrophicus* PAL5 nas diluições 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ e 10⁸ UFC.ml⁻¹ por 30 minutos. As plântulas controle foram imersas apenas em solução salina.

Depois deste período, as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio de 125 ml contendo 60 ml de solução de Hoagland's sem nitrogênio e cerca de 10 g de polipropileno granulado, onde foram mantidas por dez dias (Figura 37).

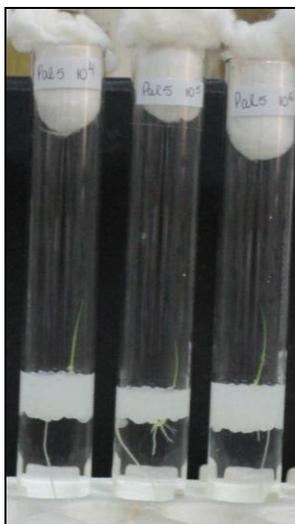


Figura 37: Plântulas de arroz crescidas em tubos de vidro com solução de Hoagland (Foto: Patrícia Galvão).

Dez dias após a inoculação, as plântulas foram retiradas do tubo de vidro e tiveram suas raízes seccionadas com auxílio de um bisturi a 20 cm abaixo da semente a fim de terem a mesma região observada em todos os tratamentos. Foi retirada uma região de 5 cm que foi colocada em uma lâmina, coberta com lamínula e observada ao microscópio óptico. Além disso, foi realizada a pesagem do massa fresca de dez repetições de cada tratamento.

2.2 Avaliação dos efeitos da inoculação de *G. diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas:

Para os experimentos de inoculação, plântulas da variedade SP70-1143 (responsiva a FBN) foram micropropagadas em laboratório de cultura de tecido. O material vegetal utilizado para a realização desse trabalho foi proveniente do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) em Piracicaba, SP.

Frascos contendo plântulas de cana-de-açúcar foram levados para uma câmara de fluxo laminar onde foi realizada a repicagem do material vegetal. Inicialmente, cada recipiente foi borrifado com uma solução de álcool etílico a 70% (v/v) para a desinfestação externa dos frascos e para não contaminar o ambiente interno da câmara asséptica. De cada planta, foram retiradas todas as partes escurecidas (oxidadas) com a utilização de bisturi e pinças esterilizadas por repetidas flambagens. O material foi dividido, individualmente, em frascos de vidro de 250 ml contendo 20 ml de meio de cultivo MS líquido (MURASHIGE E SKOOG, 1962) na fase de enraizamento (Figura 38). As plântulas foram mantidas por 60 dias em laboratório de cultura de tecidos a 25°C sob luz artificial (3000 lux) com um fotoperíodo de 12 horas de luz.

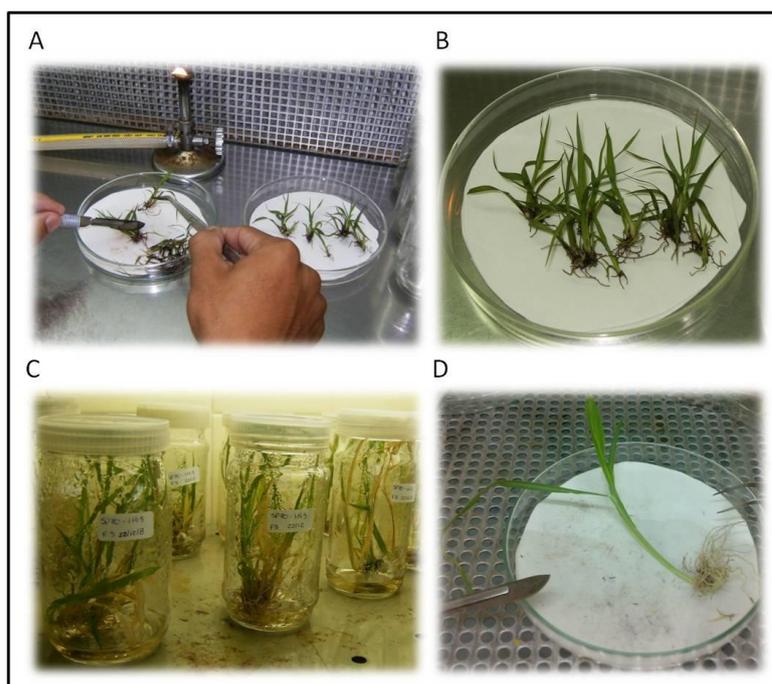


Figura 38: Plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas: (A) repicadas em câmara de fluxo laminar, (B) individualizadas, (C) em frascos de vidro com meio de cultivo MS em fase de enraizamento e (D) contendo folhas e raízes em abundância para a inoculação da bactéria. (Fotos: Patrícia Galvão)

Após atingirem um número considerável de raízes e folhas para as inoculações (Figura 38), as plântulas foram individualizadas de modo que a região de inserção da folhas sofresse pequenas feridas que permitiriam a entrada da bactéria. A partir desta etapa, as plântulas foram destinadas a cultivos diferentes: um experimento de curta duração (10 dias) em condições de hidroponia e outro com duração mais longa (120 dias) em vasos com substrato areia:vermiculita.

2.2.1 Experimento em condições de hidroponia (curta duração)

As plântulas foram acondicionadas em aparatos individualizados contendo solução de Hoagland modificada (HOAGLAND e ARNON, 1950) sem nitrogênio. Suas raízes foram depositadas sobre telas de modo que ficassem imersas na solução (Figura 39).



Figura 39: Plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas cultivadas em condição de hidroponia (Foto: Patrícia Galvão)

Para o preparo dos inóculos, células de *G. diazotrophicus* PAL5 e lao^- foram cultivadas em meio DYGS na ausência e presença de $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de antibiótico canamicina, respectivamente. Após o cultivo em 30°C sob agitação de 200 rpm as células foram sedimentadas e ressuspensas em solução salina a fim de excluir quaisquer substâncias possivelmente secretadas pelas bactérias ao meio de cultivo. O equivalente a $10^6 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ foi inoculado em cada aparato contendo a solução de Hoagland modificada. No tratamento controle, apenas foi inoculada a solução salina.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as plântulas foram mantidas por até dez dias sob temperatura controlada em casa de vegetação da Universidade Federal do Rio de Janeiro em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas liderado pela Dra. Adriana Hemerly. Após 1, 3, 7 e 10 dias da inoculação, dez repetições de cada tratamento foram coletadas e avaliadas. Foi contabilizado o número de raízes adventícias e laterais, a comprimento da parte aérea e o peso fresco de cada indivíduo.

2.2.2 Experimento em condições de vaso (longa duração)

As plântulas individualizadas foram transferidas para frascos de vidro com capacidade para 250 ml contendo 20 ml de um novo meio de cultivo MS líquido sem hormônios e com a concentração de sacarose e nutrientes reduzida 10 vezes conforme descrito por Reis et al (1997), onde foi inoculado o equivalente a $10^6 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ de *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio DYGS e os mutantes MAd3A (*nif*) e lao^- cultivados no mesmo meio de cultivo contendo antibiótico canamicina ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Cada tratamento teve 13 frascos inoculados, contendo cerca de quatro a seis perfis de cana-de-açúcar micropropagada, totalizando 65 frascos. Os tratamentos foram: sem inoculação - controle; inoculação com a estirpe selvagem *G. diazotrophicus* PAL5, inoculação com mutante *nif* de *G. diazotrophicus* (MAd3A) e inoculação com mutante lao^- de *G. diazotrophicus*.

As plântulas foram mantidas por sete dias em laboratório de cultura de tecidos a 25°C sob luz artificial (3000 lux) com um fotoperíodo de 12 horas de luz e então transferidas para bandejas de isopor do tipo plantágil e levadas para casa de vegetação de biossegurança, onde permaneceram em aclimação por 30 dias (Figura 40), antes de serem transferidas para vasos e se desenvolverem por 120 dias (Figura 41).

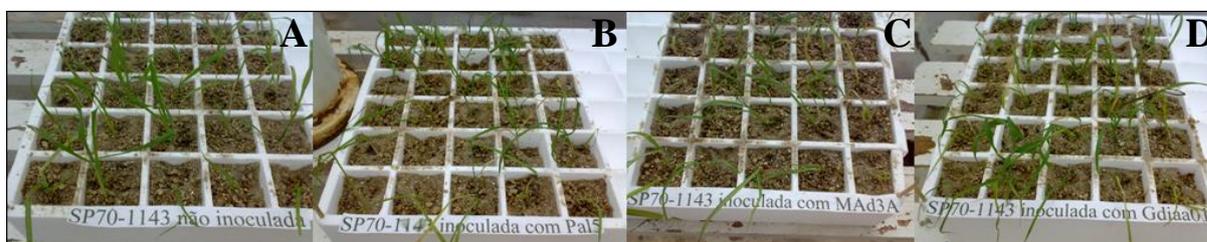


Figura 40: Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar em bandejas de isopor do tipo plantágil. (A): Plântulas não-inoculadas; Plântulas inoculadas sete dias após a inoculação com (B): *G. diazotrophicus* estirpe selvagem PAL5; (C): *G. diazotrophicus* estirpe mutante MAd3A; D: *G. diazotrophicus* estirpe mutante la⁻ (Fotos: Patrícia Galvão).

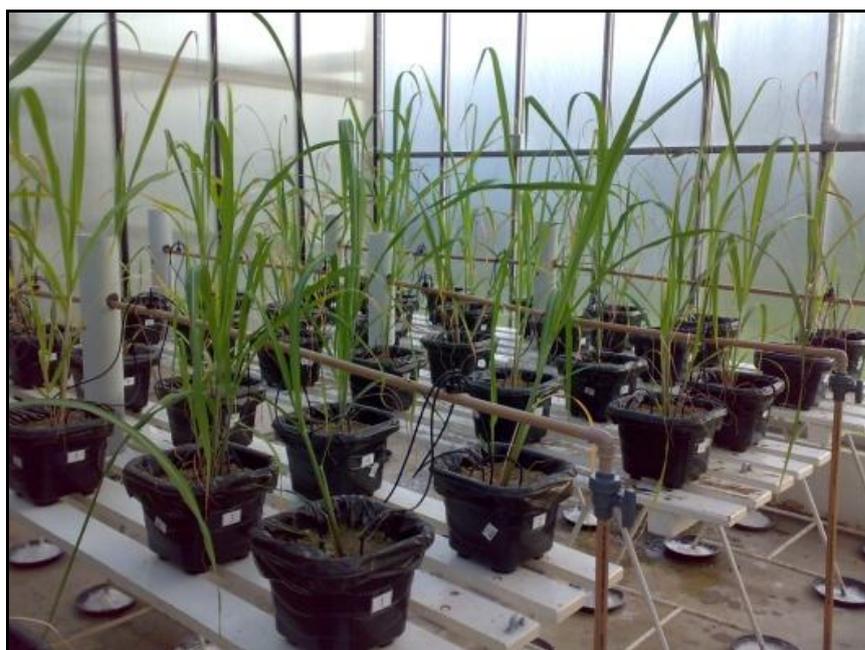


Figura 41: Plantas de cana-de-açúcar não-inoculadas e inoculadas com *G. diazotrophicus* crescidas em vasos contendo 5 Kg de substrato areia:vermiculita. (Fotos: Patrícia Galvão).

Uma amostra de 100 g do substrato areia:vermiculita (2:1) foi utilizada para análise do Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Alumínio (Al), Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) disponíveis e pH pelo laboratório de Solos da Embrapa Agrobiologia (Tabela 8:).

Tabela 8: Resultado da análise do substrato areia:vermiculita (2:1).

pH	Al	Ca	Mg	P	K	N
em Água		cmolc/dm ³		mg/dm ³		%
7,6	0,0	4,3	2,5	47,8	323,3	0,004

Com base nesses dados e na massa seca de cana-de-açúcar esperada por vaso, o pH do substrato foi corrigido com gesso e adubado com fósforo e potássio. Para cada vaso, contendo 5 kg de substrato areia:vermiculita (2:1), misturou-se 0,5 g de FTE Br12, 2,8 g de Sulfato de Potássio e 10,3g de Superfosfato Simples. Foram utilizadas duas doses de N-mineral: 30 e 60 PPM, equivalentes a 60 e 120 kg de N.ha⁻¹, aplicados como sulfato de amônio marcado com 0,5% de átomos de ¹⁵N em excesso, para futura determinação da contribuição da FBN na cultura e da eficiência no uso do adubo.

A condutividade elétrica (CE) é um indicativo da concentração de sais ionizados na solução e fornece um parâmetro para a estimativa da salinidade do substrato (WILSON, 1984). Portanto, uma amostra do substrato adubado foi coletada para a determinação da CE do extrato da pasta saturada. Após a análise a 25°C, foi observado o valor de 1,740 dS.m⁻¹. Segundo Calvins e colaboradores (2000), valores de CE entre 0,76 e 2 dS.m⁻¹ são considerados valores baixos, adequados para plantas sensíveis à salinidade.

O experimento foi delineado em seis blocos ao acaso.

- **Contagem de microrganismos diazotróficos**

A contagem do número de bactérias diazotróficas presentes nos tecidos foi realizada através da metodologia do Número Mais Provável (NMP) sugerida por Döbereiner e colaboradores (1995b). Para tal, 1 g das raízes, colmos e folhas de plantas com 7, 30 e 120 dias após a inoculação (DAI) foram previamente esterilizados superficialmente através da imersão destas em solução de Cloramina-T a 1% por 3 minutos e em água destilada estéril por cerca de 10 minutos. Após este período, o material foi enxaguado diversas vezes com água destilada estéril e macerado juntamente com 9 ml de solução salina com auxílio de pistilo e cadinho. Em seguida, foram feitas diluições seriadas dessas amostras em soluções salinas (10² a 10⁻⁷).

As contagens em meio semi-sólido foram feitas através da inoculação de 0,1 ml de cada diluição no centro de três frascos contendo meio semi-sólido LGI-P. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Após incubação por 15 dias a 30°C os tubos foram checados quanto à presença ou ausência de película e a contagem foi realizada com auxílio da Tabela de McCrady para três repetições de cada diluição (DÖBEREINER et al., 1995b).

Devido à incapacidade de fixar nitrogênio da bactéria MAd3A e, conseqüentemente, de formar película em meio semi-sólido, as contagens foram realizadas em placas de Petri para os tratamentos inoculados com a bactéria nif⁻. Para tal, em triplicatas, foram distribuídos 20 µl das diluições 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ na superfície do meio LGI-P sólido com auxílio de alça de *Drygalski*. Após incubação por 10 dias a 30°C a determinação do número de células foi feita, multiplicando-se o número de colônias presentes na diluição 10⁻⁴ pelo fator de diluição correspondente e pelo volume da amostra.

- **Acúmulo de biomassa**

As plantas foram coletadas 120 dias após a inoculação e foram divididas em raízes, colmos e folhas. As raízes foram lavadas cuidadosamente a fim de remover o substrato evitando ao máximo a perda das mesmas. Em seguida, cada parte das plantas foi separada individualmente em sacos de papel, pesadas e, posteriormente secadas em estufa a 65°C (Figura 42). Após uma semana na estufa, as partes das plantas foram novamente pesadas com o objetivo de obter o acúmulo de matéria seca das amostras.



Figura 42: Coleta do experimento 120 DAI. (A) Plantas adultas de cana-de-açúcar sendo retiradas dos vasos, (B) Separação das folhas de uma planta de cana-de-açúcar e (C) Raízes sendo cuidadosamente lavadas para retirar o excesso de substrato.

- **Nitrogênio total acumulado nos tecidos**

Após a determinação de peso seco, as raízes, colmos e folhas, foram, individualmente, moídos por duas vezes com auxílio de um moinho de corte (IKA®). As amostras foram condicionadas em potes de plástico, rotuladas e enviadas para o laboratório de Solos da Embrapa Agrobiologia onde foram realizadas as análises de N total conforme descrito por Tedesco (1985).

- **Eficiência do uso do adubo nitrogenado e contribuição da FBN**

Após as amostras terem sido analisadas quanto ao conteúdo de N total, as amostras foram moídas novamente, desta vez com auxílio de um moinho de bola e posteriormente foram enviadas para o laboratório de Solos da Embrapa Agrobiologia onde foram realizadas as análises de enriquecimento do isótopo ^{15}N em espectrômetro de massa modelo Delta Plus (Finnigan, U.K.).

Para calcular a eficiência do uso do adubo nitrogenado, primeiramente calculou-se a quantidade de N-total oriunda do adubo em cada planta. Para tal, dividiu-se a % de átomos de $^{15}\text{N}_{\text{exc}}$ em cada planta analisada por 0,5 (porcentagem de átomos de N^{15} em excesso no adubo aplicado) e, em seguida, essa fração foi multiplicada pelo valor de N-total de cada planta. Uma vez que para cada vaso adubado com a dose equivalente a $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, foram aplicados 150 mg de N na forma de sulfato de amônio e para aqueles adubados com $120 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ foram aplicados 300 mg do N-fertilizante, para obter a eficiência do uso do adubo, dividiu-se a quantidade de N na planta oriunda do adubo pela quantidade de adubo nitrogenado aplicado naquele determinado vaso (150 ou 300 mg). O valor foi expresso em porcentagem.

- **Análises estatísticas**

Os dados foram analisados quanto a sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). Em seguida, foram feitas análises de variância e teste de Tuckey (5 ou 10%) para comparação das médias, utilizando-se o programa SAEG 8.0 (RIBEIRO JÚNIOR, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Definição da concentração de bactérias capaz de promover o crescimento vegetal para os experimentos de inoculação:

Os resultados apresentados na Figura 43 indicam que a concentração de 10^6 UFC.ml⁻¹ de *G. diazotrophicus* PAL5 foi a que melhor promoveu o crescimento das plântulas de arroz coletadas aos dez dias após a inoculação. As concentrações de 10^5 e 10^7 UFC.ml⁻¹ não influenciaram no crescimento das plantas, uma vez que a média do peso das plântulas inoculadas não diferiram do controle. Já as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5 nas concentrações 10^4 e 10^8 UFC.ml⁻¹ tiveram seu crescimento prejudicado, provavelmente pela concentração de hormônios produzidos pelas bactérias.

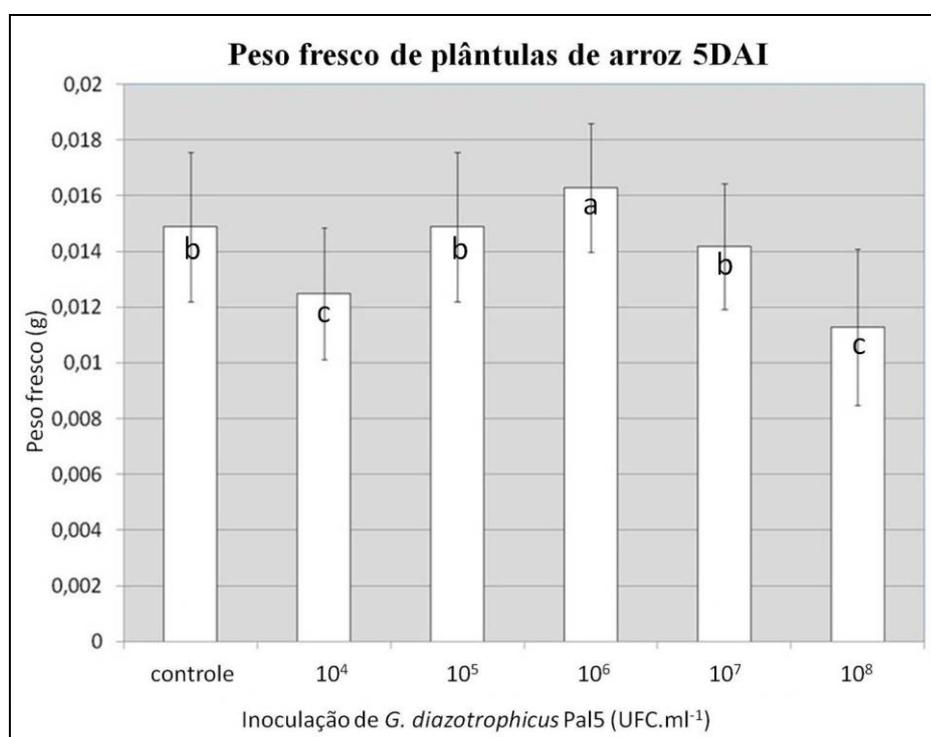


Figura 43: Pesos frescos das plântulas de arroz não inoculadas (controle) e inoculadas com diferentes concentrações de *G. diazotrophicus*. As médias foram obtidas de dez repetições de cada tratamento. As letras representam médias que diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Dobbelaere, et al. (1999) também verificaram que concentrações crescentes de células de *Azospirillum brasilense* Sp245 e Sp7 (10^6 to 10^9 UFC mL⁻¹) tiveram efeito pronunciado no desenvolvimento e morfologia de raízes de trigo, resultando em um decréscimo no tamanho das raízes e na formação de pêlos radiculares. Provavelmente, este efeito se dá pela produção de fitormônios, em especial o AIA. Já é sabido que diversas bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir AIA, indicando que a produção de auxina seja um fator importante na capacidade de promoção do crescimento pelas BPCVs (KHALID et al., 2003; PATTEN e GLICK, 1996). Evidências mais recentes propõem que o aumento radicular e o consequente acúmulo de nutrientes por plantas inoculadas com bactérias diazotróficas sejam devidos à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias, como os fitormônios (DOBBELAERE e OKON, 2007). A contribuição da auxina para a promoção do crescimento vegetal se dá através do aumento do crescimento de raízes e da proliferação e alongamento de

pêlos radiculares, o que amplia a absorção de nutrientes pela planta (KEVIN, 2003). A habilidade de produzir fitohormônios como ácido indol-acético (AIA), ácidos giberélicos (GAs) e citocininas tem sido detectada na maioria das bactérias associadas a plantas, principalmente as diazotróficas (BACA e ELMERICH, 2007). No entanto, vale ressaltar que o aumento excessivo na produção de biomassa total de raiz pode não ser desejável, uma vez que as raízes são importantes órgãos consumidores de assimilados (BOOGAARD et al., 1996).

Na Figura 44 pode-se observar um maior volume de pêlos radiculares na região seccionada da raiz da plântula de arroz inoculada com 10^6 UFC.ml⁻¹ de *G. diazotrophicus* PAL5. Essa morfologia diferenciada provavelmente foi a responsável pelo incremento de biomassa das plântulas inoculadas com tal concentração de células, possivelmente devido a maior assimilação de água e nutrientes. É possível que o efeito tenha sido possível devido à produção do AIA pelas bactérias que, após terem sido secretados no meio de cultivo, influenciaram no fenótipo das raízes. A importância do AIA produzido por *Azospirillum brasilense* Sp245 e Sp7 na promoção do crescimento de plantas foi investigada usando as estirpes selvagem e mutantes defectivos na produção de AIA por Dobbelaere, et al. (1999). Esses autores realizaram experimentos comparando diversos parâmetros de plantulas de trigos inoculadas com as estirpes selvagem de *A. brasilense* e um mutante que produz apenas 10% de AIA. Eles demonstraram claramente o efeito deste fitormônio na promoção do crescimento de plantas, uma vez que as plantulas inoculadas com o mutante apresentaram redução no tamanho das raízes e no volume de pêlos radiculares quando comparadas com as inoculadas com a estirpe selvagem. Spaepen, et al. (2007) também obteve resultados similares ao inocular sementes de trigo com *Azospirillum brasilense* Sp245 e um mutante defectivo na produção de AIA. Portanto, com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi definida a concentração de 10^6 UFC.ml⁻¹ de *G. diazotrophicus* para os experimentos de inoculação de curta e longa duração com plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.

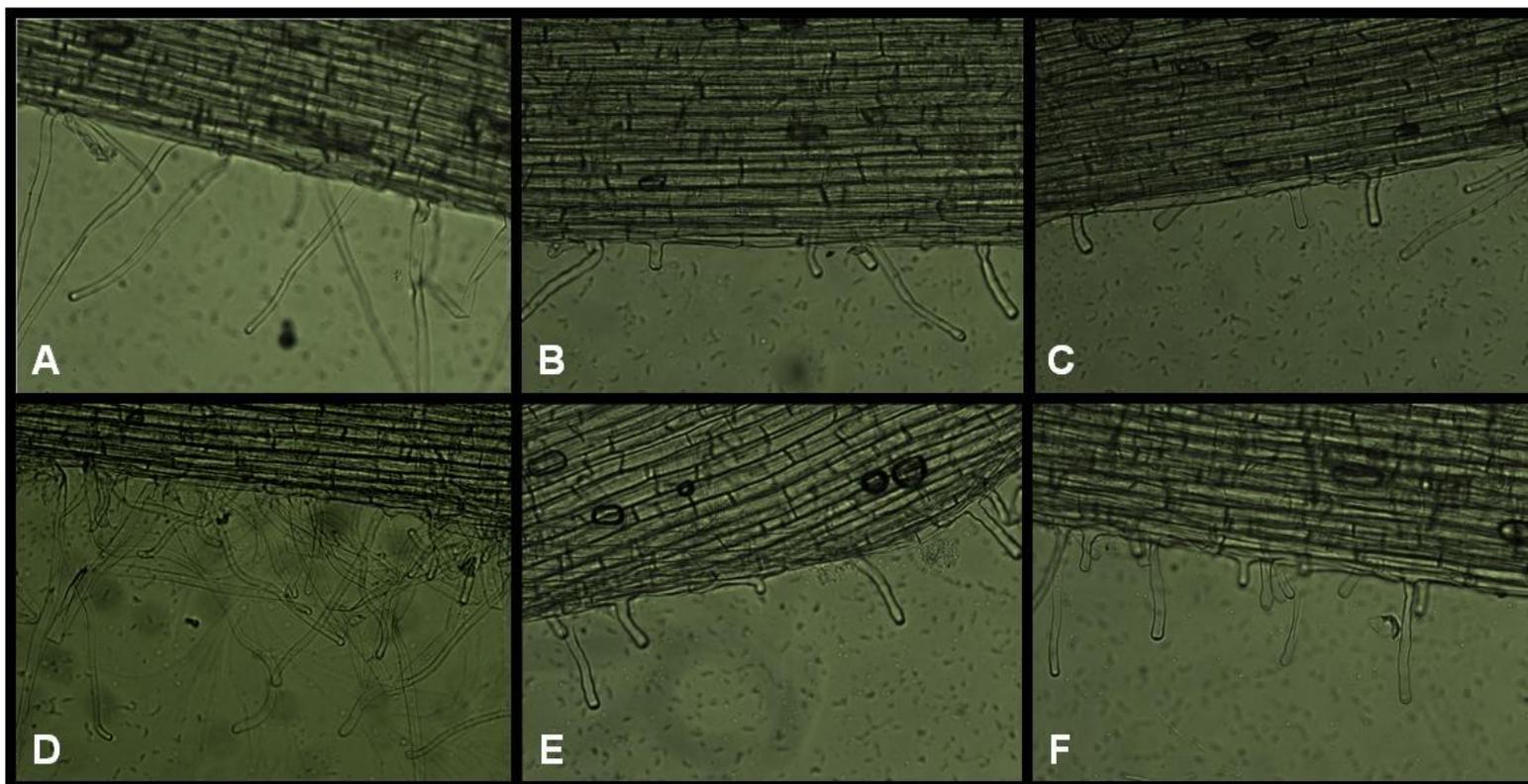


Figura 44: Microscopia óptica de raízes de plântulas de arroz (A) não inoculadas e inoculadas com *G. diazotrophicus* nas concentrações de (B) 10^4 UFC.ml⁻¹, (C) 10^5 UFC.ml⁻¹, (D) 10^6 UFC.ml⁻¹, (E) 10^7 UFC.ml⁻¹ e (F) 10^8 UFC.ml⁻¹. (Fotos de Patrícia Galvão)

3.2 Experimento em condição de hidroponia (curta duração)

A avaliação da promoção do crescimento das plântulas de cana-de-açúcar através da contabilização de número de raízes adventícias e laterais, bem como a pesagem do peso fresco mostrou um efeito da inoculação da estirpe selvagem na promoção de crescimento da parte aérea a partir de um dia após a inoculação (Tabela 9).

Tabela 9: Médias dos números de raízes adventícias e laterais, comprimento da parte aérea e peso fresco das plântulas de cana-de-açúcar até dez dias após a inoculação com *G. diazotrophicus*.

TRATAMENTO	Raízes Adventícias		Raízes laterais		Peso Fresco Total
	----(nº)----		----(nº)----		----(g)----
1 dia após a inoculação					
Controle não inoculado	4,2	NS	15,7	NS	0,237 b
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	3,6	NS	16,4	NS	0,263 ab
<i>G. diazotrophicus</i> la ⁻	3,5	NS	12,9	NS	0,270 a
CV%	35,58		72,23		11,37
3 dias após a inoculação					
Controle não inoculado	3,9	NS	32,9	ab	0,257 b
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	5,5	NS	50,6	a	0,390 a
<i>G. diazotrophicus</i> la ⁻	4,2	NS	30,6	b	0,270 b
CV%	35,26		45,57		13,12
7 dias após a inoculação					
Controle não inoculado	3,6	NS	54,4	NS	0,310 ab
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	5,2	NS	65,6	NS	0,353 a
<i>G. diazotrophicus</i> la ⁻	4	NS	37,8	NS	0,270 b
CV%	36,64		52,65		18,83
10 dias após a inoculação					
Controle não inoculado	3,9	NS	55,7	NS	0,283 b
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	4,2	NS	78,1	NS	0,350 a
<i>G. diazotrophicus</i> la ⁻	3,9	NS	44	NS	0,270 b
CV%	40,08		62,96		17,03

As letras representam médias que diferiram pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

NS: Médias não significativas pelo teste de Tuckey a 10% de probabilidade.

Para as plântulas coletadas a partir dos três DAI pôde-se observar que o peso fresco total das plântulas controles não diferiu estatisticamente daquelas inoculadas com o mutante (Figura 45). Contudo, os valores obtidos para essa variável em plântulas inoculadas com a estirpe selvagem foram superiores e diferiram estatisticamente daquelas plântulas não-inoculadas.

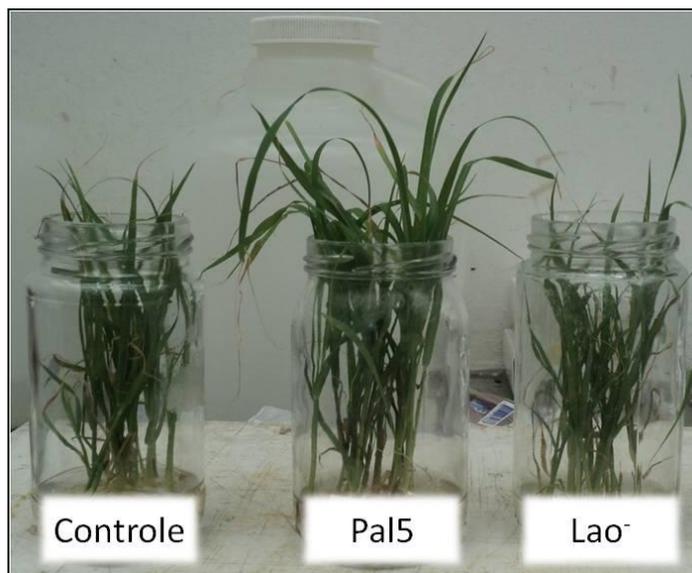


Figura 45: Plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas coletadas 3 DAI e que foram inoculadas com a estirpe selvagem e mutante de *G. diazotrophicus*. (Foto: Patrícia Galvão)

Como pode ser observado na Tabela 9, a inoculação com a estirpe PAL5 promoveu um aumento no número de raízes laterais e adventícias, fato não observado nas plantas inoculadas com a estirpe mutante, que apresentaram valores similares e não diferiram estatisticamente do controle não inoculado.

Vários experimentos de inoculação com *Azospirillum* spp, *Gluconacetobacter* spp e *Enterobacter* spp, além de outras bactérias diazotróficas, reportam o aumento da biomassa e do volume radicular, principalmente nas etapas iniciais de desenvolvimento (MUÑOZ-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003). Nos primeiros estudos com associações entre Poaceas e bactérias diazotróficas, acreditava-se que os benefícios obtidos eram fundamentalmente derivados da fixação biológica de nitrogênio (DOBBELAERE et al., 2001), entretanto, estudos posteriores demonstraram que os efeitos positivos proporcionados por estes microrganismos também eram oriundos de alterações morfológicas e fisiológicas, principalmente, nas raízes das plantas inoculadas (OKON e VANDERLEYDEN, 1997). A promoção do crescimento das raízes, especialmente o aumento da densidade de pêlos radiculares nas zonas fisiologicamente ativas, poderia conduzir a uma melhor exploração do solo, aumentando a absorção de nutrientes e água e, conseqüentemente, melhorando o crescimento e desenvolvimento das plantas (SUMAN et al., 2005; DOBBELAERE e OKON, 2007). Conforme já discutido anteriormente, evidências recentes sugerem que o aumento radicular e o conseqüente acúmulo de nutrientes por plantas inoculadas com bactérias diazotróficas sejam devidos à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias, como os fitormônios (DOBBELAERE e OKON, 2007). A habilidade de produzir fitohormônios como AIA, GAs e citocininas tem sido detectada na maioria das bactérias que se associam às plantas, principalmente as diazotróficas (BACA e ELMERICH, 2007).

Através da inoculação com um mutante *nif*, Sevilla et al, (2001) sugeriram uma possível influência de fitormônios na promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar. O presente estudo complementa as observações feitas por esses autores e mostra o efeito de promoção de crescimento por bactérias uma vez que demonstra o crescimento das plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas promovido pela estirpe selvagem PAL5 quando comparadas com as plântulas inoculadas com o mutante defeitivo na produção de AIA após dez dias de cultivo. Este dado é mais uma evidência de que os fitormônios, em especial as auxinas, são muito importantes na promoção do crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estádios de desenvolvimento das mesmas.

3.3 Experimento em vasos (longa duração)

- **Contagem de microrganismos diazotróficos**

A contagem realizada 7 DAI mostrou que o número de células por grama de massa fresca variou entre as amostras, algumas abaixo do nível mínimo detectado pela técnica de NPM, enquanto outras variaram de 0,45 a $9,8 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ (Tabela 10 e Figura 46).

Tabela 10: Número de células ($\times 10^8$) por grama de peso fresco de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar variedade SP70-1143 micropropagadas e inoculadas com a estirpe selvagem e mutantes de *G. diazotrophicus*.

Tratamentos	Número de células ($\times 10^8$) (UFC.g ⁻¹)					
	meio LGI-P semi-sólido			meio LGI-P sólido		
	7 DAI	30 DAI	120 DAI	7 DAI	30 DAI	120 DAI
Controle não inoculado	AND	AND	AND	AND	AND	AND
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	1,1	AND	AND	NA	NA	NA
<i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻	AND	AND	AND	9,8	AND	AND
<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻	0,45	AND	AND	NA	NA	NA

Análise realizada em uma amostra composta oriunda de 3 repetições. Valores expressos em números de células bacterianas por grama de massa fresca.

AND: abaixo do nível detectável pela técnica de NMP.

NA: não avaliado.

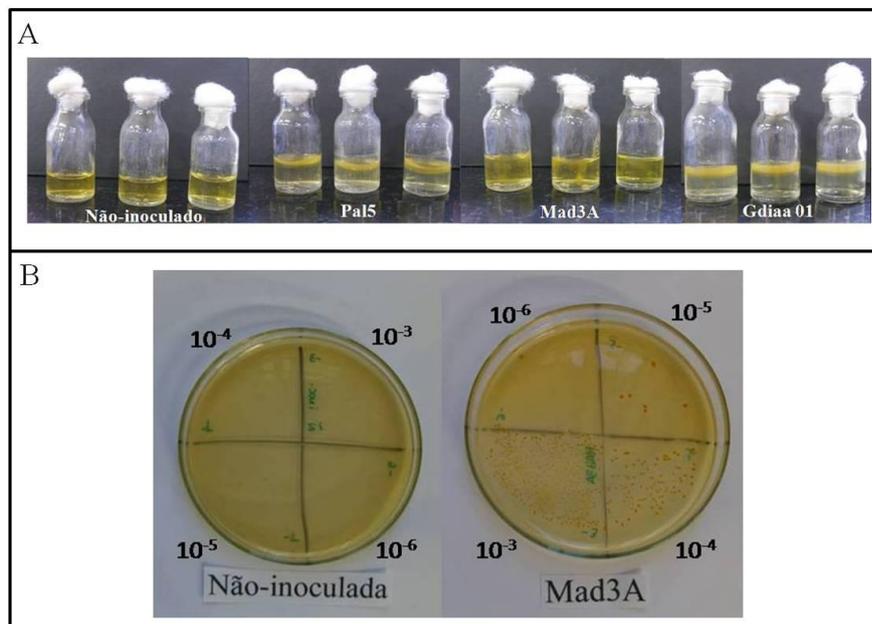


Figura 46: (A) Formação de película característica de *G. diazotrophicus* PAL5 e lao⁻ em meio LGI-P semi-sólido a partir de plantas coletadas 7 DAI (B) Formação de colônias características de *G. diazotrophicus* nif⁻, em meio LGI-P sólido a partir de plantas coletadas 7 DAI. (Fotos: Patrícia Galvão)

Já para as coletas realizadas aos 30 e 120 DAI não foi possível observar a presença de película nos meios semi-sólidos ou de colônias nos meios sólidos, sugerindo que a população de bactérias nos tecidos foram inferiores àquelas detectáveis pelos métodos. É possível que o tempo de exposição das raízes à cloramina-T (3 minutos) durante o processo de desinfestação superficial tenha sido muito elevado, eliminando, inclusive as bactérias endofíticas

inoculadas. Além disso, o período de adaptação durante a fase de plantágil possivelmente submeteu às bactérias a uma condição de estresse que pode ter reduzido a sua população. Isso explicaria a não-detecção dos microorganismos nos meios de cultivo semi-sólidos. Técnicas mais robustas, como a PCR em tempo real, poderiam ter sido usadas para detectar a presença das bactérias no interior dos tecidos das plantas.

- **Acumulo de Biomassa seca e de nitrogênio**

Foi possível observar uma diferença visual nas raízes das plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a estirpe selvagem PAL5 de *G. diazotrophicus* e as mutantes *nif⁻* e *lao⁻*, coletadas 120 dias após a inoculação (Figura 47). As raízes das plantas inoculadas com PAL5 apresentaram-se mais volumosas, aparentando possuírem um número mais elevado de raízes secundárias e pêlos radiculares para as duas doses de adubo aplicado (Figura 47). As plantas coletadas 120 DAI com o mutante *lao⁻* apresentaram raízes mais grossas, com um número muito reduzido de ramificações ou pêlos radiculares comparadas com as plantas inoculadas com a estirpe selvagem. Esse fenótipo refletiu no acúmulo de biomassa dessas raízes que, apesar de mais pesadas em relação aos outros tratamentos, embora essa diferença não tenha sido significativa, visualmente não apresentaram o mesmo volume e a mesma área superficial (Tabela 11). Como pode ser observado na Figura 47, por serem bem mais finas, as raízes das plantas inoculadas com PAL5 apresentaram menor biomassa seca para as duas doses de nitrogênio aplicado, apesar de um volume muito mais amplo de raízes e área de superfície muito mais elevada.

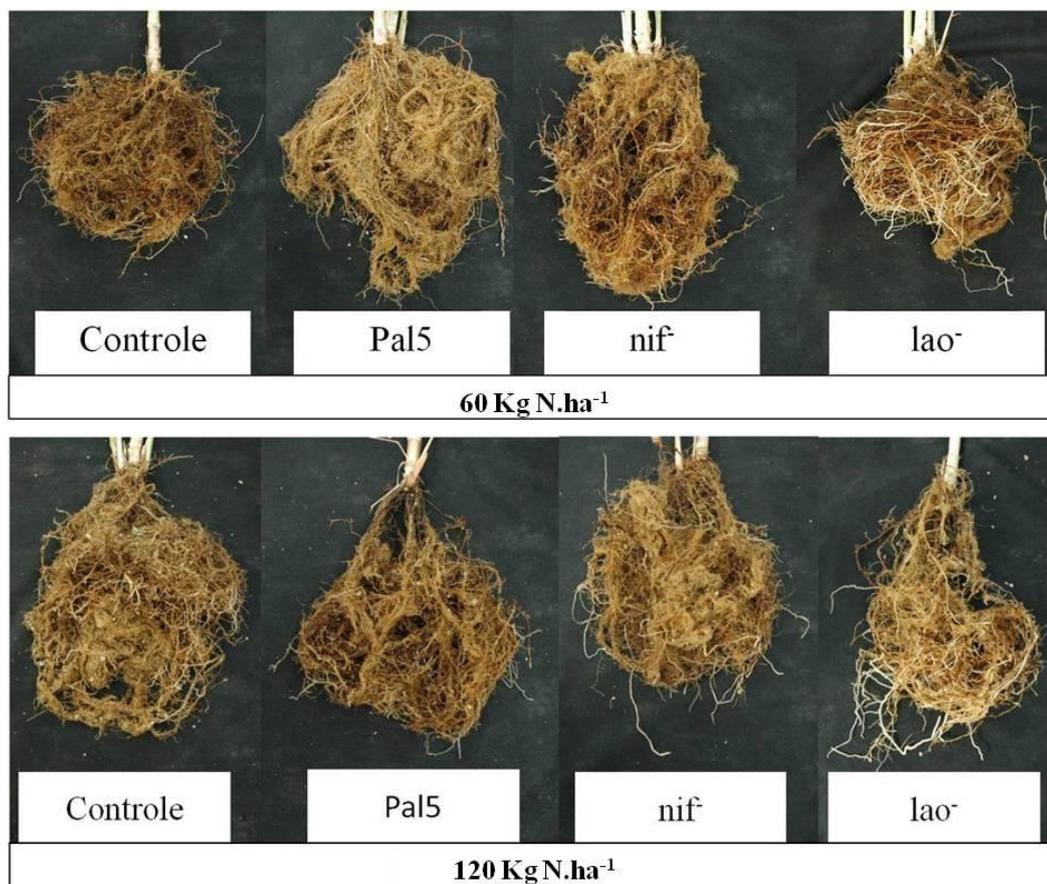


Figura 47: Foto das raízes das plantas não-inoculadas e inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL5, *nif⁻* e *lao⁻* adubados com 60 kg N.ha⁻¹ ou 120 kg N.ha⁻¹ (Foto: Patrícia Galvão).

Tabela 11: Análise das plantas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas e adubadas com 60 e 120 kg.ha⁻¹ de N coletadas 120 DAI.

Tratamento	Dose	Peso seco	Teor de N	N total
	-----(Kg.ha ⁻¹)-----	-----(g)-----	-----(%)-----	-----(mg.planta ⁻¹)---
RAIZ				
Controle não inoculado		32,17 ab*	0,2343 NS	73,4 ab*
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5		28,00 b*	0,2002 NS	56,1 ab*
<i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻	60	27,17 b*	0,1727 NS	47,3 b*
<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻		38,50 a*	0,2430 NS	92,7 a*
CV%		14,16	34,05	33,66
Controle não inoculado		33,67 ab**	0,3657 NS	121,2 NS
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5		26,67 b**	0,3631 NS	101,4 NS
<i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻	120	38,67 a**	0,3813 NS	162,2 NS
<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻		33,50 ab**	0,4097 NS	136,4 NS
CV%		22,28	29,69	29,25
COLMO				
Controle não inoculado		30,67 NS	0,2675 NS	80,6 NS
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5		28,17 NS	0,2983 NS	84,5 NS
<i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻	60	28,17 NS	0,2327 NS	66,0 NS
<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻		31,67 NS	0,3590 NS	126,4 NS
CV%		25,16	66,22	54,61
Controle não inoculado		19,50 NS	0,3777 NS	73,8 NS
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5		19,67 NS	0,3378 NS	70,1 NS
<i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻	120	17,83 NS	0,3386 NS	65,6 NS
<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻		19,83 NS	0,3770 NS	80,5 NS
CV%		25,03	27,20	42,10
FOLHA				
Controle não inoculado		19,00 NS	0,7247 NS	121,1 NS
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5		20,67 NS	0,5203 NS	100,8 NS
<i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻	60	19,50 NS	0,6575 NS	121,6 NS
<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻		19,17 NS	0,6447 NS	116,9 NS
CV%		8,66	53,21	57,68
Controle não inoculado		34,00 ab**	0,3900 NS	132,5 NS
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5		38,17 a**	0,3390 NS	130,4 NS
<i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻	120	36,00 ab**	0,3638 NS	130,4 NS
<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻		33,50 b**	0,3534 NS	129,5 NS
CV%		8,57	27,82	37,60

As letras representam médias que diferiram pelo teste de Tuckey a *5% ou **10% de probabilidade.

NS: As médias não diferiram pelo teste de Tuckey a 10% de probabilidade.

Apesar das raízes das plantas inoculadas com a estirpe selvagem PAL5 terem apresentado menor biomassa quando comparadas com as raízes de plantas dos outros tratamentos, o mesmo não foi observado em relação à parte aérea. Como apresentado na Tabela 11, não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém é possível observar que

as médias obtidas para a biomassa seca da parte aérea das plantas inoculadas com PAL5 foram superiores aquelas inoculadas com as estirpes mutantes (Figura 48 e Figura 49).

Possivelmente, a baixa dose de fitormônio auxina produzida pela estirpe mutante lao⁻ pode ter influenciado o fenótipo observado: raízes grossas e com pouca área superficial. Conseqüentemente, essas plantas podem ter absorvido menos água e nutrientes tais como potássio, fósforo, etc do que as plantas inoculadas com a estirpe selvagem PAL5, que apresentaram raízes mais ramificadas e com maior área superficial, refletindo assim no acúmulo de matéria seca na parte aérea dessas plantas (Figura 47, Figura 48 e Figura 49).

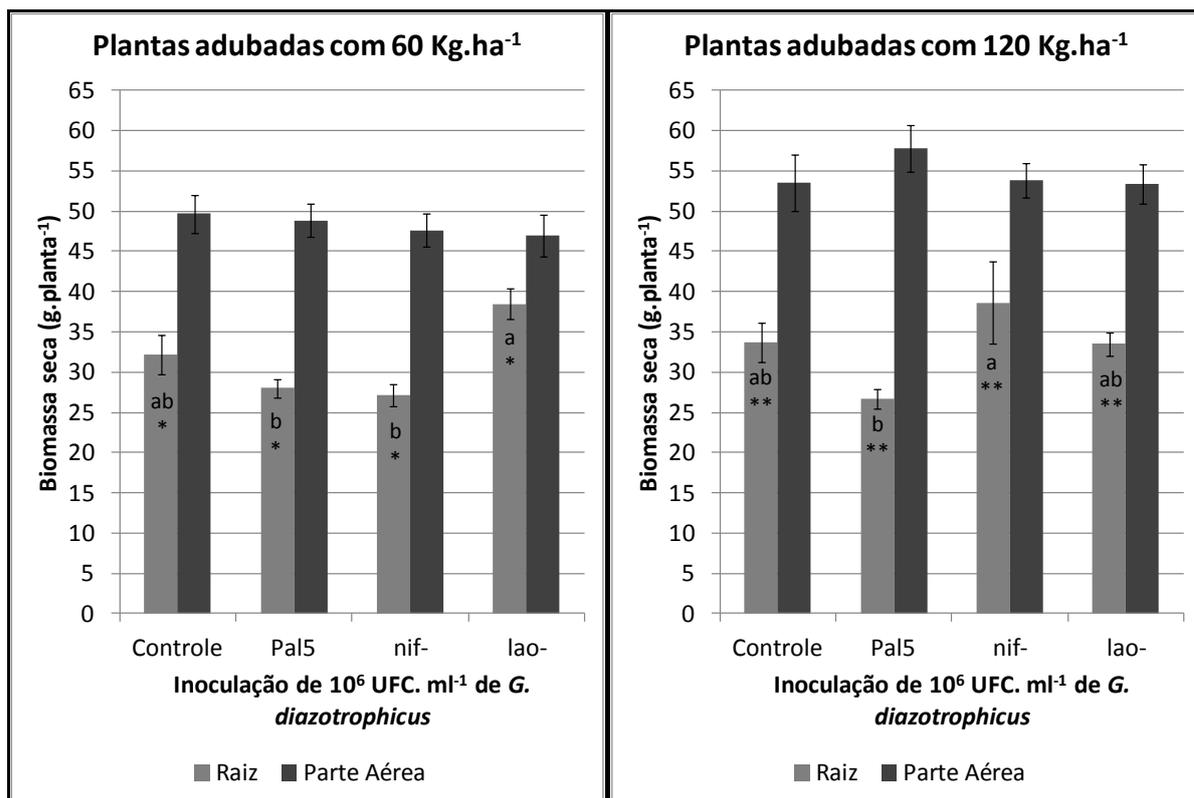


Figura 48: Biomassa seca das plantas de cana-de-açúcar controle e inoculadas com diferentes estirpes de *G. diazotrophicus* coletadas 120 dias após inoculação e adubadas com 60 ou 120 kg.ha⁻¹ de sulfato de amônia marcado com 0,5% de N¹⁵ em excesso. As letras representam médias que diferiram pelo teste de Tuckey a *5% ou **10% de probabilidade

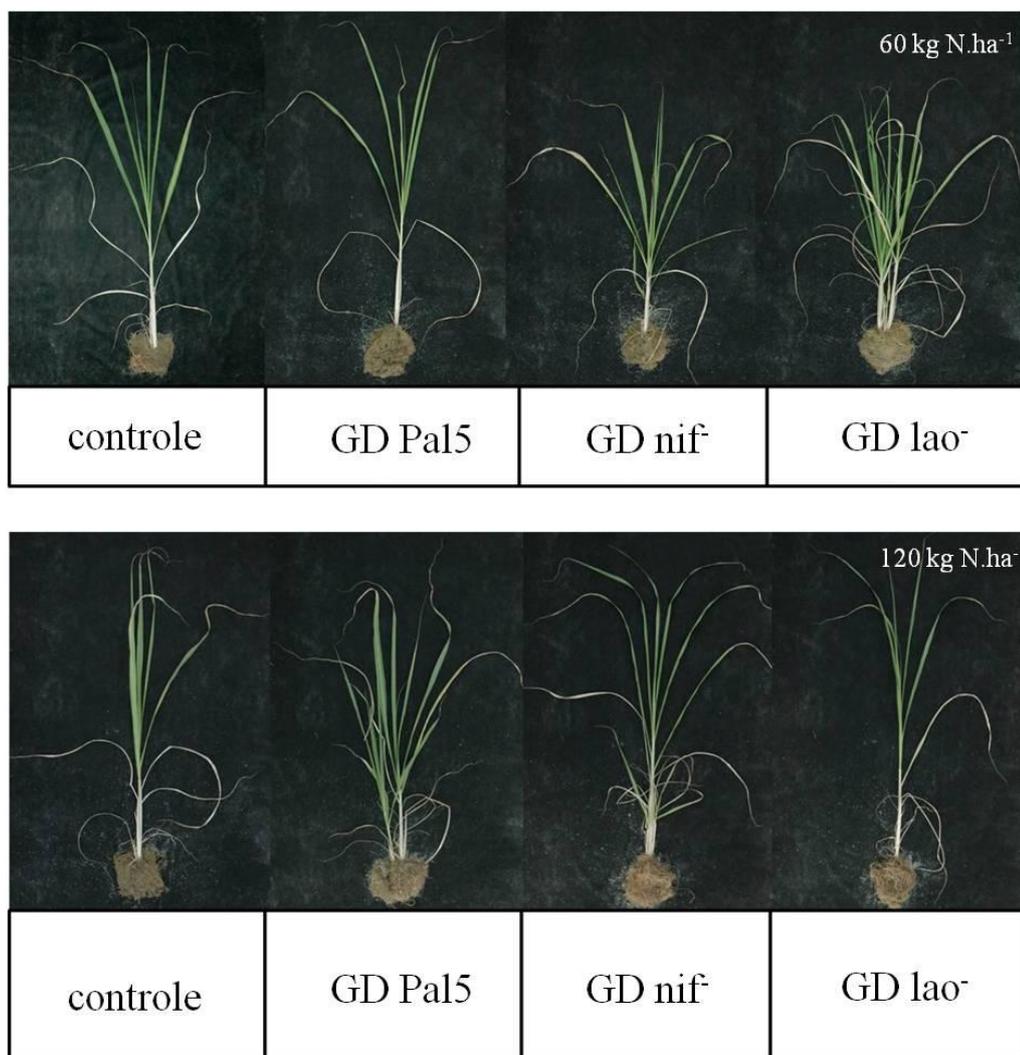


Figura 49: Foto das plantas de cana-de-açúcar 120 dias após a inoculação com *G. diazotrophicus* PAL5 e mutantes *nif⁻* e *lao⁻* adubadas com 60 ou 120 kg N.ha⁻¹ cultivadas em um mesmo bloco experimental (Foto: Patrícia Gavão).

Já as plantas inoculadas e crescidas com a menor dose de N (60 kg.ha⁻¹) apresentaram uma resposta mais visível à inoculação: as plantas inoculadas com os mutantes apresentaram acúmulo de massa seca na parte aérea inferior às plantas inoculadas com a estirpe selvagem, evidenciando a importância da produção de fitormônios por *G. diazotrophicus* para a promoção de crescimento da cultura da cana-de-açúcar.

Apesar dos tratamentos não diferirem estatisticamente entre si, a quantidade de N oriunda do adubo nitrogenado presente nas plantas inoculadas com PAL5 foi inferior à encontrada nas plantas inoculadas com *nif⁻* (Tabela 12). Entretanto, o mesmo foi superior ao tratamento inoculado com a estirpe *lao⁻* provavelmente devido ao fato de apresentarem menor volume e área radicular. Já as plantas não inoculadas apresentaram a menor eficiência de uso do N aplicado. Por outro lado, não há evidências de contribuição da FBN pela estirpe selvagem e nem pelo mutante *lao⁻* já que não diferiram do mutante *nif⁻*. É possível que o tempo de cultivo e o espaço físico dos vasos onde o experimento foi conduzido tenham sido limitantes para o desenvolvimento das plantas e, portanto o processo de FBN foi prejudicado assim como a absorção pelas raízes do sulfato de amônio marcado com N¹⁵.

Tabela 12: Eficiência do uso do adubo nitrogenado das plantas inoculadas com diferentes estirpes de PAL5 (selvagem e mutantes) e adubadas com 120 kg.ha⁻¹ de sulfato de amônio marcado com 5% de N¹⁵ em excesso.

Tratamento	Eficiência do uso do adubo nitrogenado
	-----(%)----
Controle não inoculado	83,53
<i>G. diazotrophicus</i> PAL5	89,34
<i>G. diazotrophicus</i> nif ⁻	92,69
<i>G. diazotrophicus</i> lao ⁻	86,24
CV%	27,11

Médias não significativas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Este experimento realizado em casa de vegetação de biossegurança envolvendo plantas micropropagadas de cana-de-açúcar da variedade SP70-1143 inoculadas com diferentes estirpes de *G. diazotrophicus* PAL5 e adubadas com duas doses de sulfato de amônio evidencia a capacidade de promoção do crescimento por essa estirpe bacteriana. Os resultados fornecem indícios sobre a influência da auxina produzida por PAL5 no fenótipo das raízes de cana-de-açúcar. A inoculação com o mutante lao⁻, defectivo na produção de AIA, foi importante para a comparação entre os fenótipos radiculares obtidos.

Sevilla e colaboradores (2001) sugeriram a influência de fitormônios na promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas cultivadas na presença de N por 60 dias inoculadas com um mutante *nif* de *G. diazotrophicus* e comparadas com a estirpe selvagem PAL5. Já em condições deficientes de N, as plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a PAL5 cresceram melhor e tiveram superior conteúdo de N que as plantas inoculadas com a MAd3A ou não inoculadas, indicando que a FBN é um mecanismo significativo na promoção do crescimento nesta interação. Os resultados obtidos no presente estudo completam os dados de Sevilla et al (2001), e sugerem que os fitormônios, em especial as auxinas, são importantes na promoção do crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estádios de desenvolvimento das mesmas. Oliveira et al., (2002) observou que plantas cultivadas em vasos e coletadas 45 dias após a inoculação com *G. diazotrophicus* Pal5 apresentaram um aumento na biomassa seca de raízes quando comparada com as plantas controles. De maneira geral, a maioria dos estudos de inoculação de culturas agrícolas com bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal mostram que esta prática é de grande relevância tanto do ponto de vista econômico como ambiental. Entretanto, a inconsistência em trabalhos de inoculação com bactérias diazotróficas é bastante conhecida e modificações no ambiente, solo ou substrato e genótipo são considerados como responsáveis por esta variação de respostas à inoculação entre diferentes experimentos (DOBBELAERE et al., 2001). Seria interessante realizar novos experimentos de inoculação com os mutantes AIA⁻ e *nif*, entretanto, com período de duração mais longo e com maior volume de substrato, para que esses fatores não limitem a absorção dos nutrientes e o crescimento das raízes e, conseqüentemente, o processo de FBN e a capacidade de promoção de crescimento das estirpes não sejam subestimados. Associado a isso, investir no uso de técnicas moleculares como a PCR em tempo real, o DGGE e a hibridização in situ que permitam a detecção das bactérias inoculadas ao longo do desenvolvimento das plantas.

4 CONCLUSÕES

A inoculação da estirpe selvagem Pal5 promoveu o crescimento da parte aérea e aumentou a biomassa fresca de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas cultivadas em condições de hidroponia.

As plantas inoculadas com Pal5 apresentaram raízes mais volumosas, aparentando um número mais elevado de raízes secundárias e pêlos radiculares quando crescidas em vasos e comparadas com as plantas inoculadas com o mutante *lao*⁻.

A biomassa seca da parte aérea das plantas inoculadas com Pal5 foi superior àquelas inoculadas com as estirpes mutantes *lao*⁻ e *nif* para as duas doses de adubo nitrogenado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos na Embrapa Agrobiologia sugerem que, de modo similar a outras bactérias, a produção de AIA em *G. diazotrophicus* é bastante complexa e pode envolver diferentes proteínas cuja função ainda não foi caracterizada, podendo estar relacionadas à biossíntese propriamente dita de AIA ou mesmo ao transporte deste hormônio. Logo, o mutante defeutivo na produção de AIA utilizado neste trabalho (lao⁻) é uma estirpe promissora para o estudo de promoção de crescimento por esta bactéria. Estudos de genômica funcional e de inoculação em plantas de cana-de-açúcar utilizando este mutante devem ajudar na elucidação de como o AIA é sintetizado por *G. diazotrophicus*, a importância da auxina na promoção de crescimento da cana-de-açúcar e na interação planta-microorganismo. Pelo nosso conhecimento, não existem estudos publicados envolvendo a genômica funcional de mutantes de PAL5 defeitivos na produção de compostos indólicos. Portanto, a avaliação da expressão de algumas das proteínas observadas neste trabalho, cuja expressão foi diferencial na estirpe mutante lao⁻ através de estudos de PCR em tempo real possivelmente ajudará a entender alteração na expressão dessas proteínas também a nível transcricional, ou, ainda, se essas proteínas sofrem alguma regulação pós-traducional e, por isso, tiveram seus níveis de expressão modificados nos gels 2DE-PAGE conforme observado no presente trabalho. Esses estudos também deverão ajudar a entender se a mutação na enzima Lao influencia outras vias metabólicas da bactéria, a ponto de interferir na expressão de determinadas proteínas a nível transcricional.

A observação que a produção de AIA por *G. diazotrophicus* PAL5 foi dependente da adição do triptofano ao meio de cultura sugere que este aminoácido é o precursor do AIA nesta bactéria. Assim sendo, a realização de estudos cultivando PAL5 em diferentes concentrações deste aminoácido poderiam auxiliar no entendimento da sua real importância na biossíntese deste fitormônio nesta bactéria. O estudo do perfil de proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 envolvendo a suplementação do meio de cultivo com o triptofano é um trabalho pioneiro com esta bactéria. Estudos de qPCR da expressão dos genes do operon *trp* sob diferentes concentrações de triptofano adicionadas ao meio de cultivo poderá auxiliar a esclarecer como se dá o processo de regulação destes genes em PAL5 quando ocorre a disponibilidade do triptofano em diferentes concentrações. Em adição, essas análises ajudariam a entender como esse processo se dá durante a interação com plantas de cana-de-açúcar, onde o triptofano é exsudado pelas raízes e certamente contribui para o controle da biossíntese de AIA que irá participar no processo inicial de interação com a planta e na promoção do crescimento radicular das mesmas.

Além disso, os resultados obtidos neste trabalho após a inoculação da estirpe mutante lao⁻ em plantas de cana-de-açúcar forneceram indícios sobre a influência da auxina produzida por PAL5 no fenótipo das raízes de cana-de-açúcar seja *in vitro* ou em condições de casa-de-vegetação. Esse mutante defeutivo na produção de AIA mostra-se como uma ferramenta em potencial para novos estudos de inoculação de plantas de cana-de-açúcar. Outros experimentos, com período de duração mais longos e vasos contendo maior volume de substrato, envolvendo a inoculação de plantas de cana com os mutantes AIA⁻ e *nif*, poderiam ajudar a comparar e mensurar os efeitos advindos do processo de fixação biológica de nitrogênio, produção de AIA e outros mecanismos que possivelmente estejam ocorrendo durante o crescimento das plantas.

6REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.O.; YANG, S.F. Ethylene, the gaseous plant hormone: mechanism and regulation of biosynthesis. *Trends in Biochemistry. Sciences*, v.6, p.161-164, 1981.
- ADDICOTT, F. F.; LYON, J. L. Physiology of abscisic acid and related substances. **Annual Review of Plant Physiology**, v.20, p.139-164, 1969.
- AKIYOSHI, D.E., KLEE, H., AMASINO, R.M., NESTER, E.W.; GORDON, M.P. *T-DNA of Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA** . v.81, p. 5994–5998, 1984.
- ANTELMANN, H.; TJALSMA, H.; VOIGT, B.; OHLMEIER, S.; BRON, S.; VAN DIJL, J.M.; HECKER, M. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. **Genome Research**, v.11, n.9, p.1484– 1502, 2001.
- ANTOUN, H.; KLOPPER, J.W. Plant Growth promoting rhizobacteria. In: Brenner, S., and Miller, J.F. (Ed.) **Encyclopedia of Genetics**. p. 1477-1480, 2001.
- ARDISSONE S, FRENO P, LAURENTI E, JANTSCHKO W, OBINGER C, PUPPO A, FERRARI, R.P. Purification and physical-chemical characterization of the three hydroperoxidases from the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*. **Biochemistry**. v.43:12, p.692-12699, 2004.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, v.62, p.45-151, 1998.
- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield and oil content of canola (*Brassica nappus* L.). **Australian Journal of Agricultura Research**, v.55, p.187-194, 2004.
- ASGHAR, H.; ZAHIR, Z.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.
- ASHCROFT, A.E. Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. **Natural Product Reports**, v.20, n.2, p.202-215, 2003.
- BABALOLA, O.O.; OSIR, E.O.; SANI, A.I.; ODHIAMBO, G.D.; BULIMO, W.D. Amplification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic (ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in *Striga*-infested soil. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p.157-160, 2003.
- BACA, B.E. AND ELMERICH, C. Microbial production of plants hormones by microorganisms. In: **Associative Nitrogen-fixation Bacteria and Cyanobacteria**. IV. 2007. Series: Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress, vol. 2007. p.113-137. ELMERICH, C.; NEWTON, W. (Eds). Springer Life Science. The Netherlands. 2007.

BA-IDRISS, E.E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRIS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plantgrowth-promoting effect. **Microbiology**, v.148, p. 2097-2109, 2002.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History of the biological nitrogen fixation research in *graminaceous* plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. v.77 (3), p.549-579, 2005.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 417-423, 2002.

BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R. dos S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, p. 621-666, 1999.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BARASH; MANULIS-SASSON. Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans*. **Trends in Microbiology**. v.15, n.12, p.538-545, 2007.

BARBIERI; GALLI. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasiliensis* mutant with altered indole-3-acetic acid production. **Research in Microbiology**, v.144, p.69-75, 1993.

BARBIERI, P.; ZANELLI, T.; GALLI, E.; ZANETTI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasiliense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v.36, p.87-90, 1986.

BAREA, J.M., NAVARRO, E.; MONTOYA, E. Production of plant-growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. **Journal of Applied Bacteriology** v.40, p.129–134, 1976.

BARON, C.; ZAMBRYSKI, P.C. The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: variations on a common theme? **Annual Review of Genetics**. v. 29, p. 107-129, 1995.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.

BEATTIE, G.A. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: S.S. Gnanamanickam (ed). **Plant-Associated Bacteria**. Springer, Netherlands, p. 1–56. 2006.

BELIMOV, A.A.; HONTZEAS, N.; SAFRONOVA, V.I.; DEMCHINSKAYA, S.V.; PILUZZA, G.; BULLITTA, S.; GLICK, B.R. Cadmium-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.241–250, 2005.

BELIMOV, A.A.; SAFRONOVA, V.I.; SERGEYEVA, T.A.; EGOROVA, T.N.; MATVEYEVA, V.A.; TSYGANOV, V.E.; BORISOV, A.Y.; TIKHONOVICH, I.A.; KLUGE, C.; PREISFELD, A.; DIETZ, K.J.; STEPANOK, V.V. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.642–652, 2001.

BENT, E.; TUZUN, S.; CHANWAY, C.P.; ENEBAK, S. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.793-800, 2001.

BERLETH, T.; SACHS, T. Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 57-62, 2001.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PÁDUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANÇA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUÉRES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.; MARTIN QUINTANA FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; MACEDO, J.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; RÖSSLE, S. C.; URMÉNYI, T.; RAEI PEREIRA, A.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRÜGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **BMC Genomics**. v.10, p.1-17, 2009.

BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R. In **Biological Nitrogen Fixation** (STACEY, G., BURRIS, R. H. AND EVANS, E. J., eds.), Chapman and Hall, New York, p. 736-762, 1992.

BJELLQVIST, B., EK, K. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v.6, n.4, p.317-339, 1982.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**. v.17 (3), p.121-127, 1999.

BLAHA, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; MIRZA, M.S.; MOE'NNE-LOCCOZ, Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in

phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. **FEMS Microbiology Ecology**, v.56, p.455–470, 2006.

BLATTNER, F.R, PLUNKETT, I.I.I.G.; BLOCH, C.A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V., RILEY, M. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**. v. 277 p.1453–62, 1997.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v.4, n.4, p.343-350, 2001.

BODDEY, R.M., POLIDORO, J.C., RESENDE, A.S., ALVES, B.J.R., URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N² fixation to sugarcane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology** v.28, p.889–895, 2001.

BOIERO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Phytohormone production by strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.874–880, 2007.

BOOGAARD, R. VAN DEN; VENEKLAAS, E.J.; LAMBERS, H. The association of biomass allocation with growth and water use efficiency of two *Triticum aestivum* cultivars. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.23, p.751-761, 1996.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248–254, 1976.

BRANDL, M.T.; LINDOW, S. E. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, p.4121-4128, 1996.

BRAUN, R.J., KINKL, N., BEER, M., UEFFING, M. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 389, p.1033-1045, 2007.

BROWN, M.E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**., v.12, p.181-197, 1974.

BUKAU, B., A.L. HORWICH. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell** v. 92, p. 351–366, 1998.

BURD, G.I.; DIXON, D.G. ; GLICK, B.R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3663–3668, 1998.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In: N.S. SUBBA RAO Y.R. DOMMERGUES, (eds.), **Microbial Interactions in Agriculture and Forestry**. Science Publishers, Enfield, USA, V. 2, p.229-250, 2000.

BUYER, J.S.; KRATZKE, M.G.; SIKORA, L.J. A method for detection of pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growth-promoting *Pseudomonas* strain, in the barley rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.677-681, 1993.

CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.1-22.

CALVINS, T.J.; WHIPKER B. E.; FONTENO, W.C.; HARDEN, B.; McCALL, I.; GIBSON, J. L. Monitoring and managing pH and EC using the PourThru Extraction Method. **Horticulture Information Leaflet / NCSU**, Raleigh, n.590, 2000.

CAMPBELL, B.G.; THOMSON, J. A. 1-Aminocyclopropane- 1-carboxylate deaminase genes from *Pseudomonas* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.138, p.207-210, 1996.

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 74, p. 214-219, 1988.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G.; Blue Silver: A very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**. v.25, p. 1327-1333, 2004.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v.63, p.1670-1680, 1999.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**. v.108, p.23-31, 1988.

CHAVES, D.F.S.; FERRER, P.P.; CRUZ, L.M.; MONTEIRO, R.A. ; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. A two-dimensional proteome reference map of *Herbaspirillum seropedicae* proteins. **Proteomics**, v.7, p.3759-3763, 2007.

CHAVES, D.F.S. *Análise e identificação de proteínas celulares e proteínas secretadas por Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2008. 156 f. Tese (doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**. v.6, p.5504-16, 2006.

CLARKE, L.M., DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R. *Survival of Rhizobium meliloti WSM419 in laboratory culture: effect of combined pH shock and carbon substrate stress*. **Soil Biology and Biochemistry**. v.25, p.1289-1291, 1993.

COHEN, A.C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. *Azospirillum brasilense Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants*. **Plant Growth Regulation**. v.54, p.97-103, 2008.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: fevereiro de 2012.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, p.1-18, 1995

CRAWFORD, I.P.; GUNSALUS, I.C. Inducibility of tryptophan synthetase in *Pseudomonas putida*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.56, p.717-724, 1966.

CRAWFORD, I.P. Evolution of a biosynthetic pathway: the tryptophan paradigm. **Annual Review of Microbiology**, v.43, p.567-600, 1989.

CRAWFORD, I.P. Gene arrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. **Bacterial. Rev.**, v.39, p.87- 120, 1975.

CRAWFORD, I.P.; NICHOLS, B.P.; YANOFSKY, Y.C. Nucleotide sequence of the *trpB* gene in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Journal of Molecular Biology**. v.42, p.489-502, 1980.

CRAWFORD, T.; BATES, J. H. Analysis of plasmids in *Mycobacterium avium*-intracellulare isolates from persons with acquired immunodeficiency syndrome. **American Review of Respiratory Diseases**, v.134, p.659-661, 1986.

CREIGHTON, T.E.; YANOFSKY, C. Indole-3-glycerol phosphate synthetase of *Escherichia coli*, an enzyme of the tryptophan operon. **The Journal of Biological Chemistry**. v.241, p.4625-4637, 1966.

CRESPI, M.; MESSENS, E.; CAPLAN, A.B.; VAN MONTAGU, M.; DESOMAR, J. Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. **EMBO Journal**, v.11, p.795-804, 1992.

CZEKSTER, C.L. **A enzima Indol-3-glicerol fosfato sintase de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: estudos cinéticos e mecanismo químico.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção de Mestre em Bioquímica, Porto Alegre, 74pp, 2008.

DAVID, C.; HERVE, C.; NICOLAS, F.; ISABELLE, S.J.; MOHAMED, A.; FRANC. P. The crystal structure of the pyoverdine outer membrane receptor FpyA from *Pseudomonas aeruginosa* at 3.6 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.347, p.121-134, 2005.

DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: DAVIES P.J, ed, **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**, Ed 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 1-12, 1995.

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Biotechnology**, v.6, p.282-286, 1988.

DE SALAMONE, G.; GIORDANO, M.; TREVANI, A.S.; GAMBERALE, R.; VERMEULEN, M.; SCHETTINNI, J.; GEFFNER, J.R. Promotion of neutrophil apoptosis by TNF-alpha. **Journal of Immunology**. v.166, p.3476–3483, 2001.

DEY, R.; PAL, K.K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Aracis hypoggaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**. v.159, p.371–394, 2004.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**. v.28: p.871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; TRYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v.212, p.155-164, 1999.

DOBBELAERE, S.; OKON, Y. The plant growth-promoting effect and plant responses. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**. Springer, p.145-170, 2007.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. eds. ***Azospirillum* VI and related microorganisms**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p.15-30. 1995a.

DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with nonleguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 19, p. 251-258, 1959.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas. Itaguai-RJ: EMBRAPA - SPI, 1995b.

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

DONG, Z.; CANNY, M.J. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v.105, p.1139-1147, 1994.

DOS SANTOS, M.F. **Proteoma diferencial da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivada com plântulas de cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 2008.

DOS SANTOS, M.F.; PÁDUA, V.L.M.; NOGUEIRA, E.M.; HEMERLY, A.S.; DOMONT, G.B. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. **Journal of Proteomics**. v.73, p. 917 - 931, 2010.

DUAN, J.; MULLER, K.M.; CHARLES, T.C.; VESELY, S.; GLICK, B.R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in Rhizobia: Isolation, characterization and regulation. *Proceedings of the 7th International PGPR Workshop*, Amsterdam, p.50, 2006.

DUNN, B. Splitting image. **Nature Structural & Molecular Biology**. v.4, p.969–972, 1997.

DUNN, W.B.; BAILEY, N.J.C.; JOHNSON, H.E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. **Analyst**. v.130, p.606–625, 2005.

DUTTA, D.; GACHHUI, R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**. v.57, p.353–357, 2007.

ELLIS, R.J. Chaperomics: in vivo GroEL function defined. **Current Biology**. v.15, p.661–3, 2005.

ERMOLENKO, D.N.; MAKHATADZE, G.I. Bacterial cold-shock proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.59, p.1902-1913, 2002.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H.A.; AKBARI, A.A. Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains Application on Wheat Growth Indexes. **World Applied Sciences Journal**, v.6, n.11, p.1576-1584, 2009.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. *Current World fertilizer trends and Outlook to 2014*. FAO, Roma, 2010, 40 p.

FAYET, O.; ZIEGELHOFFER, T.; GEORGOPOULOS, C. The GroES and GroEL heat shock gene products of *E. coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. **Journal of Bacteriology**. v.171, p.1379-1385, 1989.

FEKKES, P.; DRIESSEN, A.J.M. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.63, p.161–173, 1999.

FRANKENBERGER, W.T.Jr.; ARSHAD, M; *Phytohormones in soils: Microbial production and function*. Marcel Dekker, Inc. New York, 1995.

FREIFELDER, D.M. **Microbial Genetics**. Jones and Bartlett Publishers inc., USA, 1987.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.51 (Pt 4), p.1305-14, 2001.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.

FURTADO, Celso. **Formação econômica do Brasil**. 30.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2001. 248p

GALPERIN, M.Y.; KOLKER, E. New metrics for comparative genomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, n.5, p.440-7, 2006.

GAUDIN, V.; VRAIN, D.; JOUANIN, L. Bacterial genes modifying hormonal balance in plant. **Plant Physiology and Biology**, v.32, p.11-29, 1994.

GHOSH, S.; PENTERMAN, J.N.; LITTLE, R.D.; CHAVEZ, R.; GLICK, B.R. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the growth of canola seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.277–281, 2003.

GILLIS, M.; KERSTERS, K. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.39, n.3, p.361-364, 1989.

GLICK B.R., BASHAN Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v.15, p. 353-378, 1997.

GLICK, B. R.; KARATUROVIĆ, D. M.;NEWELL, P. C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.533–536, 1995.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D.M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. **Imperial College Press**. London, 1999.

GLICK, B.R.; PENROSE, D.M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v.190, p.63–68, 1998.

GLICKMANN, E.; GARDAN, L.; JACQUET, S.; HUSSAIN, S.; ELASRI, M.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.156-162, 1998.

GOLDSTEIN, A.H. Bacterial mineral phosphate solubilization: historical perspectives and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture**. v.1, p.57–65, 1986.

GOMEZ-ROLDAN, V.; FERMAS, S.; BREWER, P.B.; PUECH-PAGÈS, V.; DUN, E. A.; PILLOT, J.P.; LETISSE, F.; MATUSOVA, R.; DANOUN, S.; PORTAIS, J.C.; BOUWMEESTER, H.; BÉCARD, G.; BEVERIDGE, C.A.; RAMEAU, C.; ROCHANGE, S.F. Strigolactone inhibition of shoot branching. **Nature**, v. 455, n.7210, p.180–194, 2008.

GÖRG, A.; WEISS, W. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, p.3665-3685, 2004.

GÖRG, A.; WEISS, W., IN: RABILLOUD, T. (Ed.), **Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods**, Springer, Berlin, Heidelberg. p. 57–106, 2000.

GOURION, B., M. ROSSIGNOL; J.A. VORHOLT, A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.103, p.13186-13191, 2006.

GRACIOLLI, L.A.; FREITAS, J.R.D.E.; RUSCHEL, A.P. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). **Revista de Microbiologia**. v.14, p.191-196, 1983.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.1, p.39-63, 2002.

GREINER, R.; HALLER, E.; KONIEZNY, U.; JANY, K.D. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.341, p.201-206, 1997.

GRICHKO, V.P.; GLICK, B.R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.11-17, 2001.

GUTIERREZ-MANERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v.111, p.206-211, 2001.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v.245, p.83-93, 2002.

HARARI, A.; KIGEL, J.; OKON, Y. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. **Plant and Soil**, v.110, p.275-282, 1988.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16 p. 463-471, 2008.

HARTMAN, A.; SINGH, M.; KLINGMULER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indole acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**. v.29, p.916-923, 1983.

HAYNES, D.; RALPH, P.; PRANGE, J.; DENNISON, B. The impact of the herbicide diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. **Marine Pollution Bulletin**, v.41, n.7-12, p. 288-293, 2000.

HERRMANN, K.M.; WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** v.50, p.473-503, 1999.

HOAGLAND, D.R; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347p.

HOLMGREN, E.; CRAWFORD, I.P. Regulation of tryptophan genes in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology** v.149, p.1135–1137, 1982.

HONMA, M.; SHIMOMURA, T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**., v.42, p.1825-1831, 1978.

HONMA, M. Stereospecific reaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. In J. C. PECH, A. LATCHÉ, C. BALAGUÉ (Eds.), **Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene** (pp. 111–116). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993.

HONTZEAS, N.; RICHARDSON, A. O.; BELIMOV, A.A.; SAFRONOVA, V.I.; ABU-OMAR, M.M.; GLICK, B.R. Evidence for horizontal gene transfer (HGT) of ACC deaminase genes **Applied and Environmental Microbiology**, 71 pp. 7556–7558, 2005.

HUANG, L.; SHEN, M.; CHERNUSHEVICH, I.; BURLINGAME, A.L.; WANG, C.C.; ROBERTSON, C.D. Identification and isolation of three proteasome subunits and their encoding genes from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.102, p. 211–223, 1999.

HUNT, S.M.N.; THOMAS, M.R. Optimal Replication and the importance of experimental design for gel-based quantitative proteomics. **Journal of Proteome Research**, v.4, n.3, p.809-819, 2005.

HUREK, T.; REINHOLD, B.; VANMONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain-BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 7, p. 1913-1923, 1994.

HÜTTER, R.; NIEDERBERGER, P.; DEMOSS, J.A. Tryptophan biosynthetic genes in eukaryotic microorganisms. **Annual Review of Microbiology**. v.40, p.55–77, 1986.

JACOBSON, C.B.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.1019–1025, 1994.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Further observation on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.357, p.747-760, 2001.

JAMES, P.; QUADRONI, M. Protein identification in DNA databases by peptide mass fingerprinting. **Protein Science**, v.3, p.1347-1350, 1994.

JAMESON, P.E. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. **Plant Growth Regulation**. v.32, n.2, p.369-380, 2000.

JIA, Y.J.; KAKUTA, Y.; SUGAWARA, M.; IGARASHI, T.; OKI, N.; KISAKI, M.; SHOJI, T.; KANETUNA, Y.; HORITA, T.; MATSUI, H.; HONMA, M. Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.63, p.542–549, 1999.

JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E. *Coffea arabica L.*, a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogenfixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n. 9, p.3676-83, 1997.

KAKIMOTO, T. Perception and signal transduction of cytokinins. **Annual Review of Plant Biology**. v.54, p.605–627, 2003.

KASTRITIS, P.L.; BONVIN, A.M. Are scoring functions in protein-protein docking ready to predict interactomes? Clues from a novel binding affinity benchmark. **Journal of Proteomic Research**. v.9, p.2216–2225, 2010.

KATIYAR, V.; GOEL, R. Siderophore-mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. **Plant Growth Regulation**, v.42, p.239-244, 2004.

KAZEMI-POUR, N.; CONDEMINE, G.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. **Proteomics** v.4, p.3177-3186, 2004.

KAZMI, S.; KRULL, I. S. **Proteomics and the current state of protein separations science, Part one**. Pharma Genomics, p.14-29, August, 2001.

KERNER, K.J.; NAYLOR, D.J.; ISHIHAMA, Y.; MAIER, T.; CHANG, H-C.; STINES, A.P., et al. Proteome-wide analysis of chaperonin dependent protein folding in *Escherichia coli*. **Cell**. V.122, p.209–20, 2005.

KEROVUO, J.; LAURAEUS, M.; NURMINEN, P.; KALKKINEN, N., APAJALAHTI, J. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2079-2085, 1998.

KEVIN, V.J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers; **Plant and Soil** v.255, p.571–586, 2003.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.473-480, 2004.

KIM, K.Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G.A. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.995-1003, 1998.

KLEE, H.J.; HAYFORD, M.B.; KRETZMER, K.A.; BARRY, G.F.; KISHORE, G.M. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. **Plant Cell**, v.3, p.1187–1193, 1991.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: **Proceedings of the fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, INRA, v.2, p.879-892, 1978.

KLOEPPER, J.W. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR, in: **Abstracts and short papers. 6th International PGPR workshop, 5-10, 2003.**

KLOEPPER, J.W.; ZABLOKOVICZ, R.M.; TIPPING, E.M.; LIFSHITZ, R. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: D. L. KEISTER; P. B. CREGAN (Eds.). **The rhizosphere and plant growth**, p.315-326, 1991.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**. v.7, p.39-43, 1989.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik**, v.26, p.231-243, 1975.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology** v.59, p.867-873, 1993.

KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, K.; KOJIMA, K.; URASAWA, S.; UEHARA, N.; OMIZU, Y.; KISHI, Y.; YAGIHASHI, A.; KUROKAWA, I. Analysis of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by molecular typing method based on coagulase gene polymorphisms. **Epidemiology and Infection.**, v. 115, p. 419-426, 1995.

KOGA, J.; ADACHI, T.; HIDAKA, H. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. **Molecular and General Genetics**. v.226, p. 10-16, 1991.

KORMUTÁK, A.; SALAJ, T.; VOOKOVÁ, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. **Biologia Bratislava**, v. 61, p. 479-485, 2006.

KUCEY R.M.N.; JANZEN H.H.; LEGGETT M.E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**, v.42, p.199-227, 1989.

KÜHNER, S.; VAN NOORT, V.; BETTS, M.J.; LEO-MACIAS, A.; BATISSE, C.; RODE, M.; YAMADA, T.; MAIER, T.; BADER, S.; BELTRAN-ALVAREZ, P.; CASTAÑO-DIEZ, D.; CHEN, W.H.; DEVOS, D.; GÜELL, M.; NORAMBUENA, T.; RACKE, I.; RYBIN, V.; SCHMIDT, A.; YUS, E.; AEBERSOLD, R. Proteome organization in a genome-reduced bacterium. **Science** (New York, NY) v.326, p.1235–1240, 2009.

KUMAR, V.; NARULA, N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, n.3, p.301-305, 1999.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAMBERT, B.; JOOS, H. Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. **Trends in Biotechnology**, v.7, p.215– 9, 1989.

LAPORT, M.S., CASTRO, A.C.D., VILLARDO, A., LEMOS, J.A.C., BASTOS, M.C. F., GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Expression of the Major Heat Shock Proteins DnaK and GroEL in *Streptococcus pyogenes*: A Comparison to *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 42, p. 264–268, 2001.

LEHNINGER, ALBERT L. **Princípios de bioquímica**. 4 ed: São Paulo. Sarvier, 2006.

LERY, L.M.S.; HEMERLY, A.S.; NOGUEIRA, E.M.; VON KRÜGER, W.M.A.; BISCH, P.M. Quantitative Proteomic Analysis of the Interaction Between the Endophytic Plant-Growth-Promoting Bacterium and Sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 562-576, 2011.

LERY, L.M.S.; VON KRÜGER, W.M.A.; VIANA, F.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; BISCH, P.M.A comparative proteomic analysis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic nitrogen compound. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1784, n.11, p.1578-1589, 2008b.

LERY, L.M.; COELHO, A.; VON KRUGER, W.M.; GONÇALVES, M.S.; SANTOS, M.F.; VALENTE, R.H.; SANTOS, E.O.; ROCHA, S.L.; PERALES, J.; DOMONT, G.B.; TEIXEIRA, K.R.; BERTALAN, M.; FERREIRA, P.C.; BISCH, P.M. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. **Proteomics**. v.8, n.22, p.4833, 2008a.

LETHAM, D.S. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *zea mays*. **Life Sciences**, v.2, p.569-573, 1963.

LICHTER, A.; BARASH, I.; VALINSKY, L.; MANULIS, S. The genes involved in cytokinin biosynthesis in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*: Characterization and role in gall formation. **Journal of Bacteriology**. v.177, p.4457-4465, 1995a.

LICHTER, A.; MANULIS, S.; SAGEE, O.; GAFNI, Y.; GRAY, J.; MEILAN, R.; MORRIS, R. O.; BARASH, I. Production of cytokinins by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* and isolation of a locus conferring cytokinin biosynthesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.8, p.114-121. 1995b.

LIMA, E.; BODDEY, R.M. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a 15N aided nitrogen balance. **Soil Biology Biochemistry**, v.19, n.2. p.165-170, 1987.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v.86, p.1-25, 2004.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p.541-556, 2009.

MA, Z.; BASKIN, T.I.; BROWN, K.M.; LYNCH, J.P. Regulation of Root Elongation under Phosphorus Stress Involves Changes in Ethylene Responsiveness. **Plant Physiology**, v.131, p.1381-1390, 2003.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; RYU, J.H.; SA, T.M. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. **Planta**. v.224, p.268-78, 2006.

- MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impact of development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.27-34, 2004.
- MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDL, M.T.; LINDOW, S.E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, n.7, p.634-42, 1998.
- MASALHA, J.; KOSEGARTEN, H.; ELMACI, O.; MENGEL, K. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.433-439, 2000.
- MATHESIUS, U., SCHLAMMAN, H.R.M., SPAINK, H.P., SAUTTER, C., ROLFE, B.G., AND DJORDJEVIC, M.A. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. **The Plant Journal**, v.14, n.1, p.23-34, 1998.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.565-572, 2004.
- MEHTA, A.; ROSATO, Y.B. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by representational difference analysis of cDNA. **Genetics and Molecular Biology** v.28, p. 140–149, 2005.
- MENESES, C.H.G.; ROUWS, L.F.M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I. Exopolysaccharide Production Is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **The American Phytopathological Society**. v.24, n.12, p.1448–1458, 2011.
- MIERNYK, J.A. Abscisic acid inhibition of kinetin nucleotide formation in germinating lettuce seeds. **Plant Physiology**, v.45, p.63–66, 1979.
- MILLER, C.O.; SKOOG, F.; OKUMURA, F.S.; SALTZA, M.H.V.; STRONG, F. M. Structure and synthesis of kinetin. **Journal of the American Chemical Society**, v.77, n.9, p.2662-2663, 1955.
- MINAMI, Y.; HIGUCHI, S.; YAGI, F.; TADERA, K. Isolation and some properties of the antimicrobial peptide (Pa-AMP) from the seeds of pokeweed (*Phytolacca americana*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.62, p.2076–2078, 1998.
- MORRIS, R.O. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. In Davies, P.J. (ed.), **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**, Kluwer Academic Publishers, p.318–339, 1995.
- MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, v. 46, p. 454-464, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-479, 1962.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of n fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Hesbaspirillum* spp. from Indian sugar cane varieties. **Biology and Fertility of Soil**, v.29, p. 157-164, 1999.

NAGASAWA, T.; MAUGER, J.; YAMADA, H. A novel nitrilase, arylacetoneitrilase, of *Alcaligenes faecalis* JM3. Purification and characterization. **European Journal of Biochemistry**, v.194, p.765-772, 1990.

NATERA, S.H.A., GUERREIRO, N.; DJORDJEVIC, N.A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.995-1009, 2000.

NAVEED, M.; ZAHIR, Z.A.; KHALID, M.; ASGHAR, H.N.; AKHTAR, M.J.; ARSHAD, M. Rhizobacteria containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat under fertilized conditions. **Pakistan Journal of Botany** v.40, n.3, p.1231-1241, 2008.

NEILANDJS, B.; LEONGS, A. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.187-208, 1986.

NEUHOFF, V.; AROLD, N. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, n.6, p.255-62, 1988.

NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A. Fixação biológica e metabolismo de nitrogênio em plantas. *In*: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R.O.; DÖBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, C; MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**. P. 127-167, Itaguaí, 1993.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry** v.250, p.4007, 1975.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

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

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, p.197-200, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v.284, p.23-32, 2006.

- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, p.205-215, 2002.
- ORTEGA, N.; BUSTO, M.D.; PEREZ-MATEO, M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International, Biodeterioration & Biodegradation**, v.47, p7-14, 2001.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837 – 846, 2000.
- PAPPIN, D.J.; HOJRUP, P. Rapid identification of proteins by peptide mass fingerprinting. **Current Biology**, v.3, n.6, p.327-32, 1993.
- PARDANANI, A., WIEBEN, E.D., SPELSBERG, T.C., TEFFERI, A. Primer on medical genomics. Part IV: Expression proteomics. **Mayo Clinic Proceedings**. v.77, p.1185-1196, 2002.
- PARK, O.K. Proteomic Studies in Plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v.37, p.133-138, 2004.
- PATTEN, C.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.635-642, 2002a.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3795-3801, 2002b.
- PENROSE, D.M.; MOFFATT, B.A.; GLICK, B.R. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. **Canadian Journal of Microbiology** v.47, p.77-80, 2001.
- PERROT-RECHENMANN, C.; NAPIER, R.M. **Auxins, Vitamins and Hormones**, v. 72, p. 203-233, 2005.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobia interactions. **Plant, Cell and Environment**. v.26, p.189-199, 2003.
- PERTRY, I.; VACLAVIKOVA, K.; DEPUYDT, S.; GALUSZKA, P.; SPICHAL, L.; TEMMERMAN, W.; STES, E.; SCHMULLING, T.; KAKIMOTO, T.; VAN, M.M.; et al. Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.106, p.929–934, 2009.

PITTARD, J. Biosynthesis of the aromatic amino acids. In Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli and salmonella: cellular and molecular biology*, vol 1 ASM, Washington, DC, pp 458-484, 1996.

PODILE, A.R.; KISHORE, G.K. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S.S. **Plant-Associated Bacteria**, Springer. p. 195–230, 2006.

POLLMANN, S.; MULLER, A.; PIOTROWSKI, M.; WEILER, E.W. Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**. v.216, p.155–16, 2002.

PRASAD, T.K., STEWART, C.R. cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. **Plant Molecular Biology** v.18, p. 873–85. 1992

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.609–15, 1993.

PRINSEN, E.; VAN DONGEN, W.; ESMANS, E.L.; VAN ONCKELEN, H.A. HPLC linked electrospray tandem mass spectrometry: a rapid and reliable method to analyze indole-3-acetic acid metabolism in bacteria. **Journal of Mass Spectrometry**, v.32, p.12–22, 1997.

RAAIJMAKERS, J.M.; LEEMAN, M.; VAN OORSCHOT, M.M.P.; VAN DER SLUIS, I.; SCHIPPERS, B.; BAKKER, P.A.H.M. Dose response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v.85, p.1075-1081, 1995.

RABILLOUD, T. Ed. Proteome Research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. **Principles e Praticce**. Berlin: Springer Verlag, v.I, p.248, 2000.

REIS, J.R.; SILVA, L.G. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.985-994, 2000.

REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.F.; FERREIRA, A.C.; REIS JÚNIOR, F.B.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas. Seropédica, RJ: EMBRAPA-CNPAB. 11p. (EMBRAPA-CNPAB. **Documentos**, 30), 1997.

REIS, V.M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L. Improved methodology for isolation and identification of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, n.4, p.401-405, 1994.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S. (Org.) **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Cap. 6, p. 153-174, 2006.

RENGEL, Z.; BATTEN, G.D.; CROWLEY, D.E.; The physiology of micronutrient homeostasis in field crop. **Field Crop Research**, v.60, p.27, 1999.

RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 2001. 301 p.

RIBEIRO, V.H.; TONELLA, C.A. Atividade Canavieira no Brasil: O Estado, a agro-indústria e os trabalhadores da cana-de-açúcar. **Revista Geografar (UFPR)**, v.5, p.143-166, 2010.

ROCHA. L., COSTA. P.H.A., MAGALHÃES, J.C.C., EVARISTO , R.G.S., VASCONCELOS, E.A.R., COUTINHO, M.V., PAES N.S., SILVA, M.C.M., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado técnico**, Embrapa, Brasília, p.1-12, 2005.

RODRIGUES, E.P. **Isolamento e Caracterização de Mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos na produção de auxinas**. Tese de Doutorado em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de ciências da Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v.17, p.319-339, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, p.827-837, 2006.

ROSS, C.M.; WINKLER, M.E. Structure of the *Caulobacter crescentus* trpFBA operon. **Journal of Bacteriology**. v.170, p.757-768, 1988.

ROUWS, L.F.M.; MENESES, C.H.S.G.; GUEDES, H.V.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I.; SCHWAB, S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gusA reporter genes. **Letters in Applied Microbiology**. v.51, p.325-330, 2010.

RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E.; HENIS, Y. Nitrogen fixation in sugar cane (*Saccharum officinarum*). In: GRANHALL, V. (Ed.) **Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria**. Swedish Natural Science Research Council, p. 297-302, 1978.

SAIER, M.H., JR. **Enzymes in metabolic pathways: a comparative study of mechanism, structure, evolution, and control**. New York: Harper and Row. 1987

SANTNER, A.; IRINA, L.; CALDERON-VILLALOBOS, A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature chemical biology**. v.5, p.301-307, 2009.

SANTOS, P.M., TEIXEIRA, M.C., SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a estresse químico em microrganismos. Métodos em Biotecnologia - Proteômica Quantitativa. **Boletim de Biotecnologia** n.7, 2004.

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, 1994.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 282-285, 1995.

SCHWECHHEIMER, C. Understanding gibberellic acid signaling—are we there yet? **Current Opinion in Plant Biology**, v.11, p.9–15, 2008.

SEKINE, A.; FUJIWARA, M.; NARUMIYA, S. Asparagine residue in the *rho* gene product is the modification site for botulinum ADP ribosyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.8602-8605, 1989.

SENIOR, A.E., WEBER, J. Happy motoring with ATP synthase. **Nature Structural & Molecular Biology**. v.11, p.110-112, 2004.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N. KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutants strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 14, n.3, p. 358-366, 2001.

SHARMA, A.; JOHRI, B.N. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. **Microbiological Research**, v.158, p.243-248, 2003.

SHARMA, A.; SAHGAL, M.; JOHRI, B.N. Microbial communication in the rhizosphere: Operation of quorum sensing. **Current Science**, v.85, n.8, 2003.

SHEEHY, R. E.; HONMA, M.; YAMADA, M.; SASAKI, T.; MARTINEAU, B.; HIATT, W. R. Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.5260–5265, 1991.

SHERMAN, M., GOLDBERG, A. Heat shock-induced phosphorylation of GroEL alters its binding and dissociation from unfolded proteins. **The Journal of Biological Chemistry**. V.269, p.31479–83, 1994.

SHIN, R.; BERG, R.H.; SCHACHTMAN, D.P. Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. **Plant and Cell Physiology**. v.46, p.1350–1357, 2005.

SILVEIRA, G.L.L. **Identificação de proteínas com expressão induzida por choque térmico em *Herbaspirillum seropedicae***. Tese de Doutorado em Biotecnologia Vegetal. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Paraná, 2009.

SINGH, S.; KAPOOR, K.K. Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.139-144, 1998.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, p.205-240, 2004.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v.312, p.15-23, 2008.

SPAEPEN, S.; VAN DURME, J.; DAS, F.; MAURER-STROH, S.; ROUSSEAU, F.; SCHYMKOWITZ, J.; VANDERLEYDEN, J. Brominated phenols as auxin-like molecules. **European Journal of Soil Biology**, v.45, n.1, p.81-87, 2009.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p.425-448, 2007.

SPEICHER, D.W. Overview of proteome analysis. In: **Proteome Analysis: Interpreting the Genome** (D. Speicher, ed.). Elsevier, The Netherlands, pp. 1-18, 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, p.487-506, 2000.

STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.77, n.1, p.67-72, 1991.

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. Cycles of soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorous, Sulfur, **Micronutrients**, 2nd Edition. New York: Wiley, 1999.

STRADER, L.C.; BARTEL, B. A new path to auxin. **Nature Chemical Biology**, v.4, p.337-339, 2008.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 183-190, 2000.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.155-162, 2005.

SZMRECSÁNYI, T. **O Planejamento da Agroindústria Canavieira do Brasil**. (1930: 1975). São Paulo: Hucitec, 1979.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4.ed., Porto Alegre: ARTMED, p.820, 2009.

TAPIA-HERNANDEZ, A. M. R. Bustillos-Cristales. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in Pineapple plants. **Microbial Ecology**, v.39, n.1, p.49-55, 2000.

TAYLOR, I.B.; SONNEVELD, T.; BUGG, T.D.H.; THOMPSON, A.J. Regulation and manipulation of the biosynthesis of abscisic acid, including the supply of xanthophyll precursors. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.24, p.253–273, 2005.

TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. Análise de solo , plantas e outros materiais. Porto alegre, UFRGS, Faculdade de Agronomia, Departamento de Solos, **Boletim técnico** n.05, 1985.

TEIXEIRA, W.A. **As Transformações no Espaço Agrário do Paraná, com a introdução da Agricultura Energética Canavieira**. Mestrado, UNESP, Rio Claro, 1988, 281p.

TEJERA, N.; ORTEGA, E.; GONZALES-LOPES, J.; LLUCH, C. Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 528-535, 2003.

THOMAS, J.H.; KELLEY, J.L.; ROBERTSON, H.M.; LY, K.; SWANSON, W.J. Adaptive evolution in the SRZ chemoreceptor families of *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.102, p.4476-4481, 2005.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S. Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. **Soil Science Society America Journal**, v.56, n.1, p.105-114, 1992.

VAN LOON, L.C.; GERAATS, B.P.J.; LINTHORST, H.J.M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v.11, p.184–191, 2006.

VAN RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J., The Rhizobium plant symbiosis. **Microbiology Reviews**. v.58, p.124-142, 1995.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizosphere as biofertilisers. **Plant Soil**, v.255, p.571-586, 2003.

VITAMVAS, P.; KOSOVA, K.; PRASIL, I.T. Proteome analysis in plant stress research. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**. v.43, p.1-6, 2007.

VOHARA, A.; SATYANARAYANA, T. Pitases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.23, n.1, p.29-60, 2003.

WANG, Z.; WILSON, W.A.; FUJINO, M.A.; ROACH, P.J. Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p, **Molecular and Cellular Biology**., v.21, p.5742–5752, 2001.

WEHR T.A. Photoperiodism in humans and other primates: evidence and implications. **Journal of Biological Rhythms**. v.16, p.348–364, 2001.

WEICKERT, M.J.; ADHYA, S. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. **The Journal of Biological Chemistry**. v.267, p. 15869–74, 1992.

WEINGART, H.; ULLRICH, H.; GEIDER, K.; VÖLKSCH, B. The role of ethylene production in virulence of *Pseudomonas syringae* pvs. *glycinea* and *phaseolicola*. **Phytopathology**, v.91, p.511-518, 2001.

WEINGART, H.; VOLKSCH, B. Ethylene Production by *Pseudomonas syringae* Pathovars In Vitro and In Planta. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.1, p.156-161, 1997.

WENT, F.W.; THIMANN, K. V. **Phytohormones** (Macmillan: New York). 1997.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part III: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. In: WESTERMEIER, R; NAVEN, T. (Ed.). **Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VCH, 2004. p.261.

WEYENS, N.; VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S.; NEWMAN, L.; VANGRONSVELD, J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.10, p.591-598, 2009.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Biology**, v.52, p.487-511, 2001.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology (N Y)**, v.14, n.1, p.61-65, 1996.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.19-50, 1996.

WILSON, G.C.S. Analytical analyses and physical properties of horticultural substrates. **Acta Horticulturae**, n.150, p.19-32, 1984.

WITTMANN-LIEBOLD, B.; GRAACK, H. R. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**, v.6, p.4688-4703, 2006.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v.95, p.707-735, 2005.

XIE, H.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Current Microbiology** v.32, p.67-71, 1996.

XIE, P.; JANOWIAK, J. E.; ARKIN, P.A.; ADLER, R.; GRUBER, A.; FERRARO, R.; HUFFMAN, G.J.; CURTIS, S. GPCP pentad precipitation analyses: An experimental data set based on gauge observations and satellite estimates. **Journal of Climate**, v.16, n.2, p.197 - 2,214, 2003.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16s ribosomal RNA: the elevation of the subgenus

Gluconoacetobacterium to generic level. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v.61, p.1244-1251, 1997.

YAMADA, Y.; HOSHIRO, K.; ISHIKAWA, T. *Gluconacetobacter* nom. corrig. (*Gluconacetobacter* [sci]). In validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.48, p.327-328, 1998.

YAMAGUCHI, S. Gibberellin metabolism and its regulation. **Annual Review of Plant Biology**. v.59, p.225–251, 2008.

YANOFSKY, C.; CRAWFORD, I.P. The tryptophan operon. In: F.C. NEIDHARDT, J.L. INGRAHAM, K.B. LOW, B. MAGASANIK, M. SCHAECHTER,; H.E. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Umberger, eds (Washington, DC: American Society for Microbiology), pp. 1453-1472, 1987.

YOKOTA, E.; MCDONALD, A.R.; LIU, B.; SHIMMEN, T.; PALEVITZ, B.A. Localization of a 170 kDa myosin heavy chain in plant cells. **Protoplasma** v.185, p.178–187, 1995.

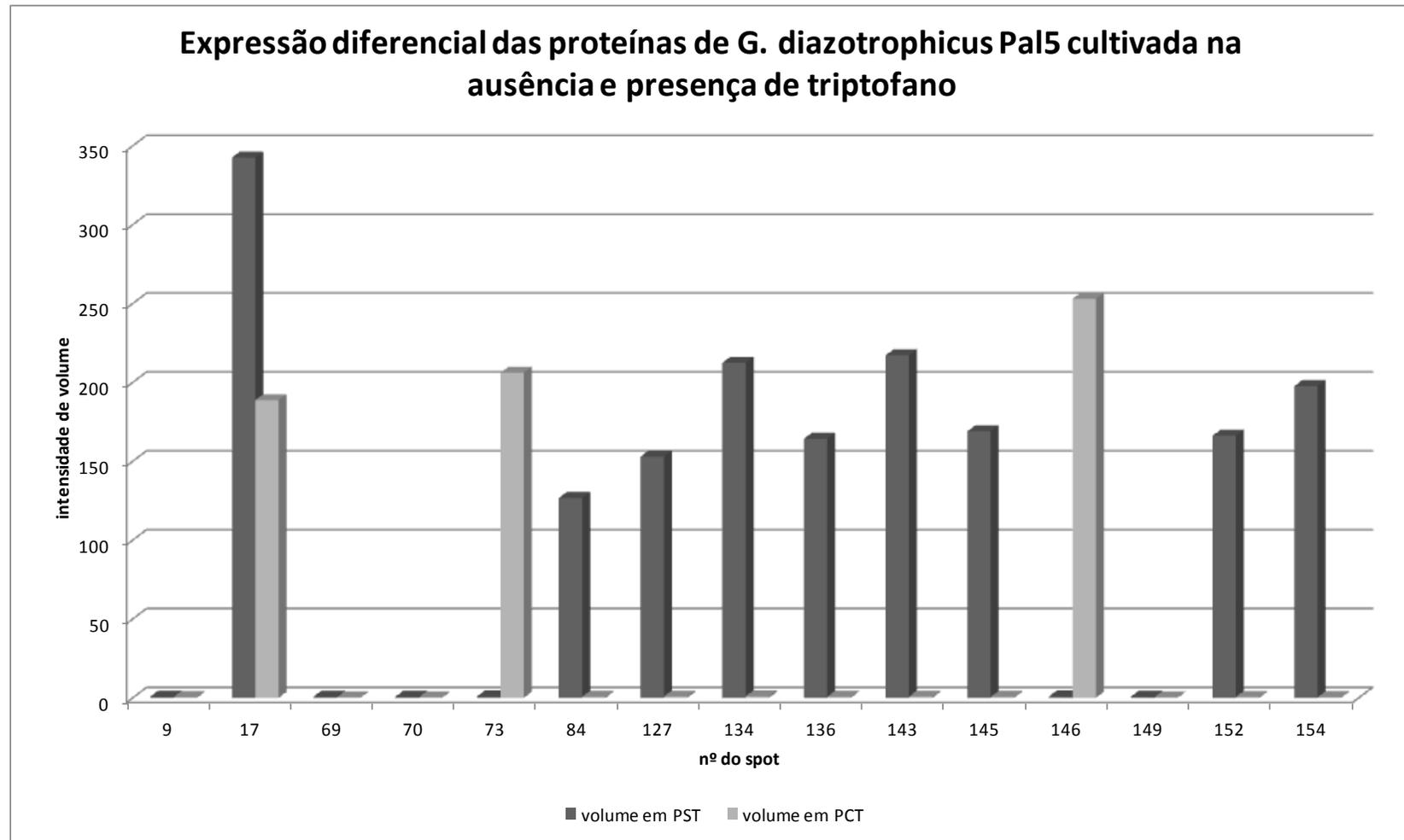
ZALKIN, H. Anthranilate synthase: relationships between bifunctional and monofunctional enzymes. in H. BISWANGER; E. SCHMINCKE-OTT, eds. **Multifunctional proteins**. Wiley, New York, p.123-149, 1980.

7ANEXOS

Anexo 1: Expressão diferencial das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano) e no tratamento (*G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml⁻¹ de triptofano). (p<0,05)

nºdo spot	volume em PST	volume em PCT
	-----intensidade-----	
9	0,75	0,49
17	342,56	188,76
69	0,80	0,39
70	0,72	0,32
73	0,96	206,10
84	126,73	0,69
127	153,00	0,84
134	212,40	0,99
136	164,34	0,72
143	217,24	0,83
145	169,04	0,65
146	1,00	253,02
149	0,77	0,39
152	166,23	0,62
154	197,67	0,46

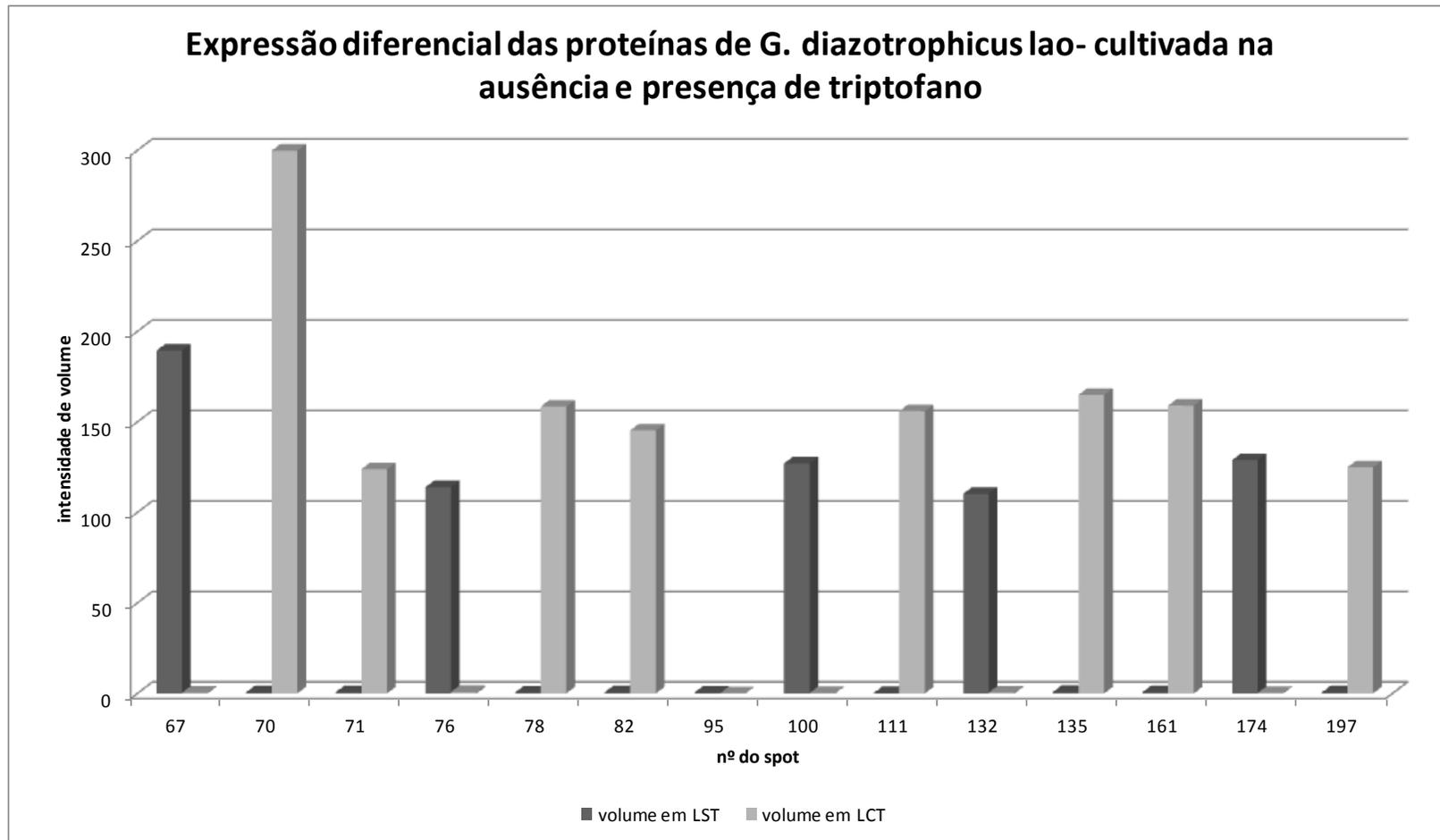
Anexo 2: Expressão diferencial das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano) e no tratamento (*G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de triptofano). ($p < 0,05$).



Anexo 3: Expressão diferencial das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* laoi cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano) e no tratamento (*G. diazotrophicus* laoi cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml⁻¹ de triptofano). (p<0,05)

n°do spot	volume em LST	volume em LCT
	-----intensidade-----	
67	189,42	0,44
70	0,63	299,90
71	0,75	123,94
76	113,95	0,80
78	0,57	158,48
82	0,67	145,39
95	0,50	0,12
100	127,08	0,26
111	0,25	155,98
132	110,30	0,56
135	0,81	164,96
161	0,75	159,10
174	128,94	0,35
197	0,59	124,95

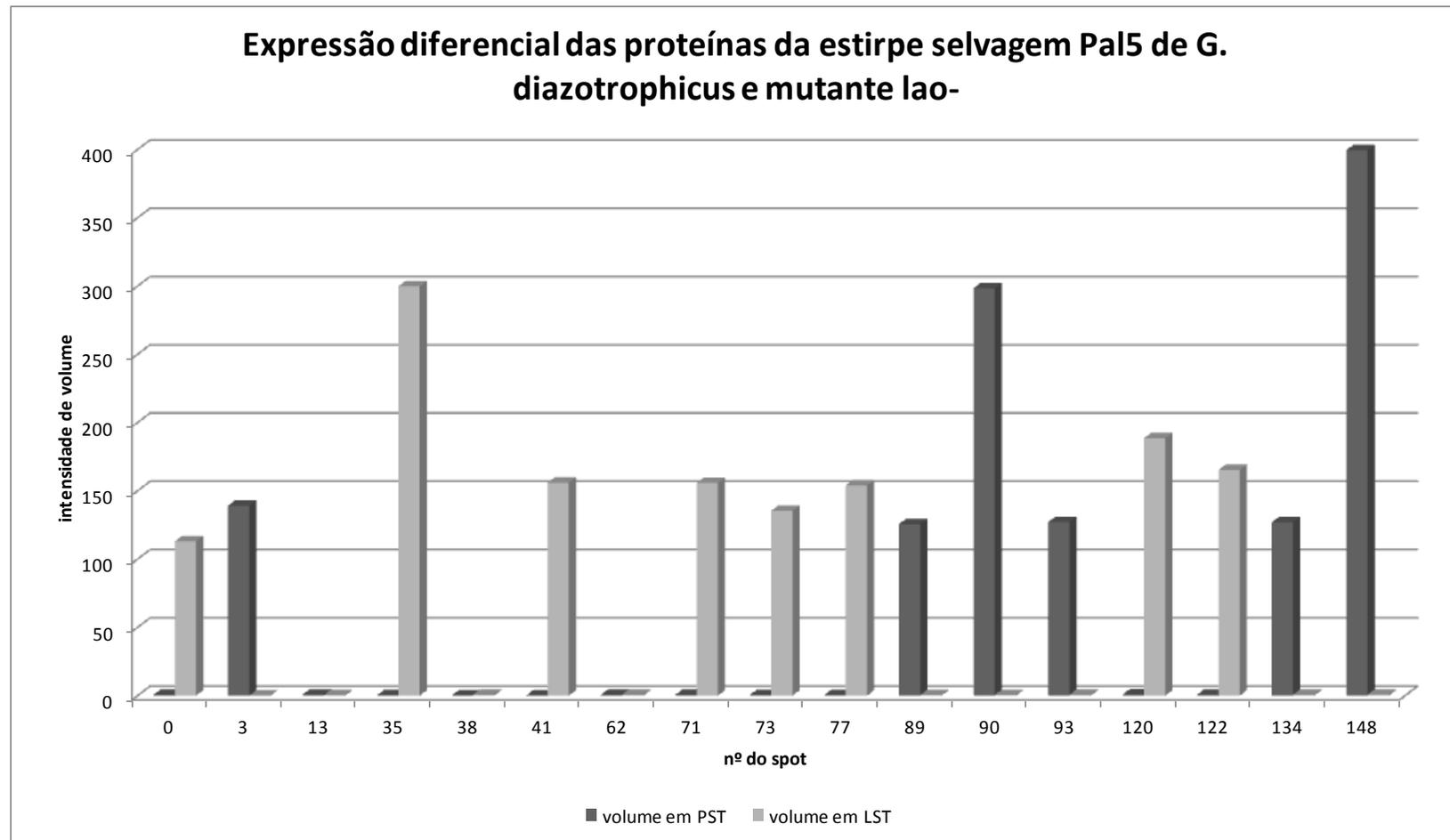
Anexo 4: Expressão diferencial das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em meio LGI-P sem adição de triptofano) e no tratamento (*G. diazotrophicus* lao⁻ cultivada em meio LGI-P acrescido de 100 ug.ml⁻¹ de triptofano). (p<0,05)



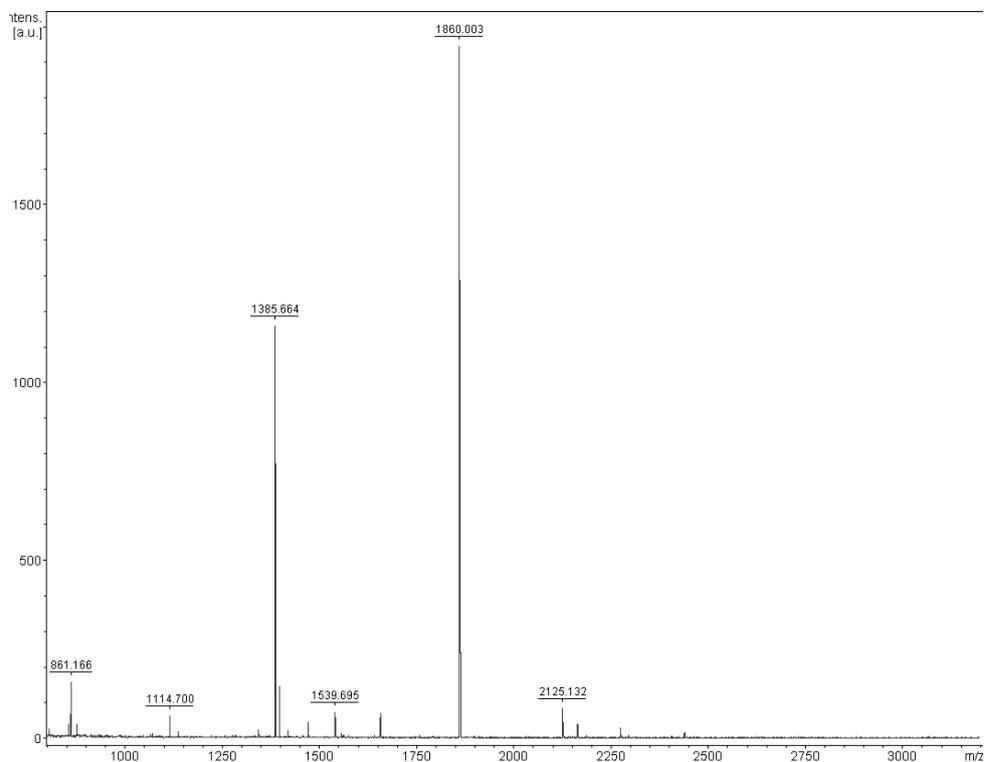
Anexo 5: Expressão diferencial das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* PAL5) e no tratamento (*G. diazotrophicus* lao). (p<0,05)

nºdo spot	volume em PST	volume em LST
	-----intensidade-----	
0	0,65	113
3	139	0,11
13	0,79	0,46
35	0,32	300
38	0,16	0,74
41	0,14	156
62	0,61	0,70
71	0,65	156
73	0,54	135
77	0,56	154
89	126	0,50
90	298	0,54
93	127	0,64
120	0,87	189
122	0,79	165
134	127	0,67
148	400	0,77

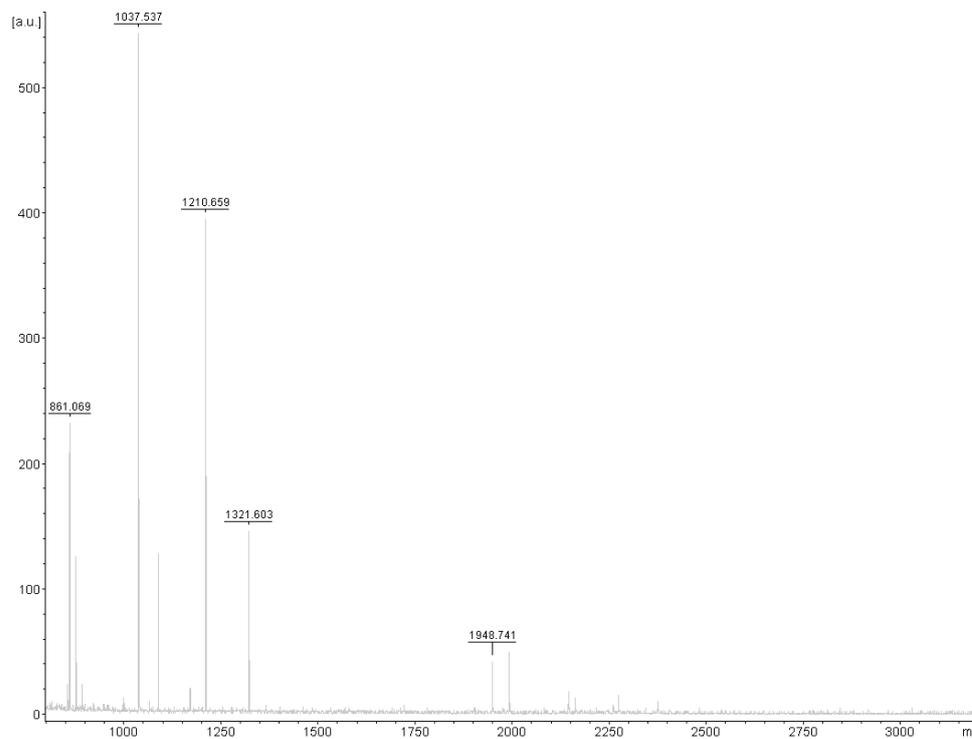
Anexo 6: Expressão diferencial das proteínas identificadas no controle (*G. diazotrophicus* PAL5) e no tratamento (*G. diazotrophicus* lao⁻). (p<0,05)



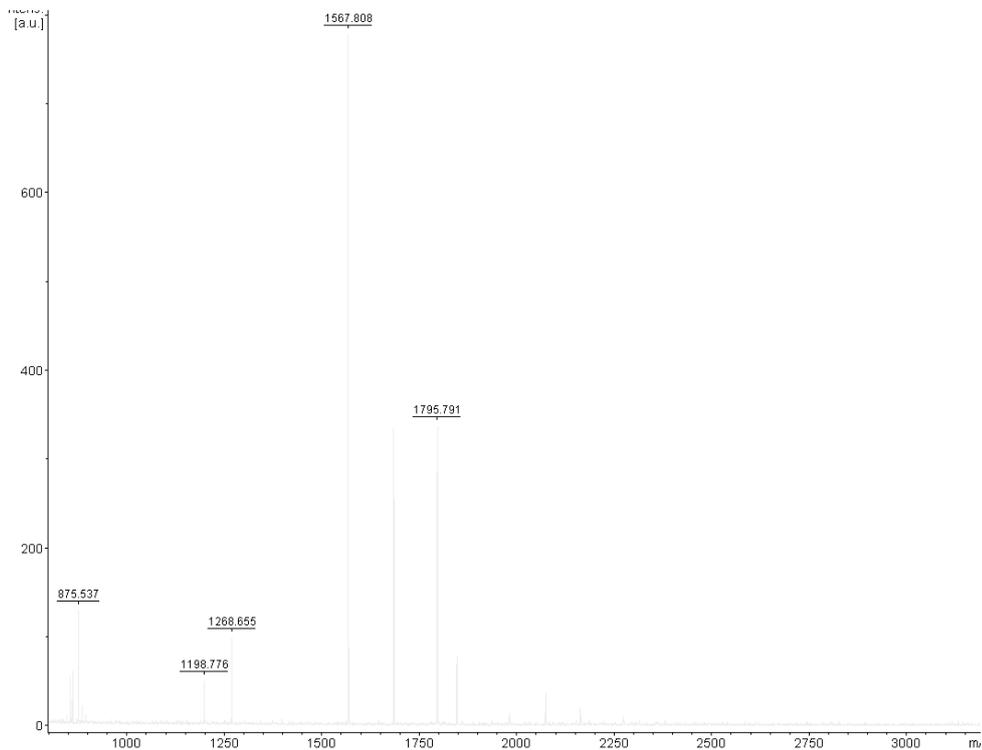
Anexo 7: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 9 do tratamento PST (proteína identificada como superóxido dismutase)



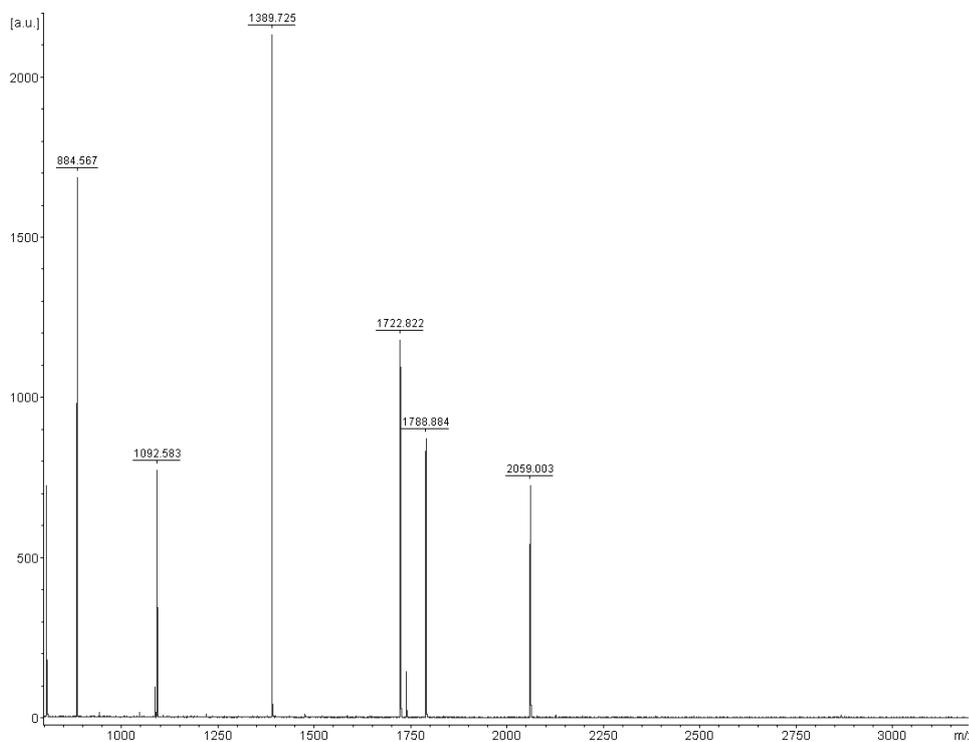
Anexo 8: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 69 do tratamento PST (proteína identificada como catalase)



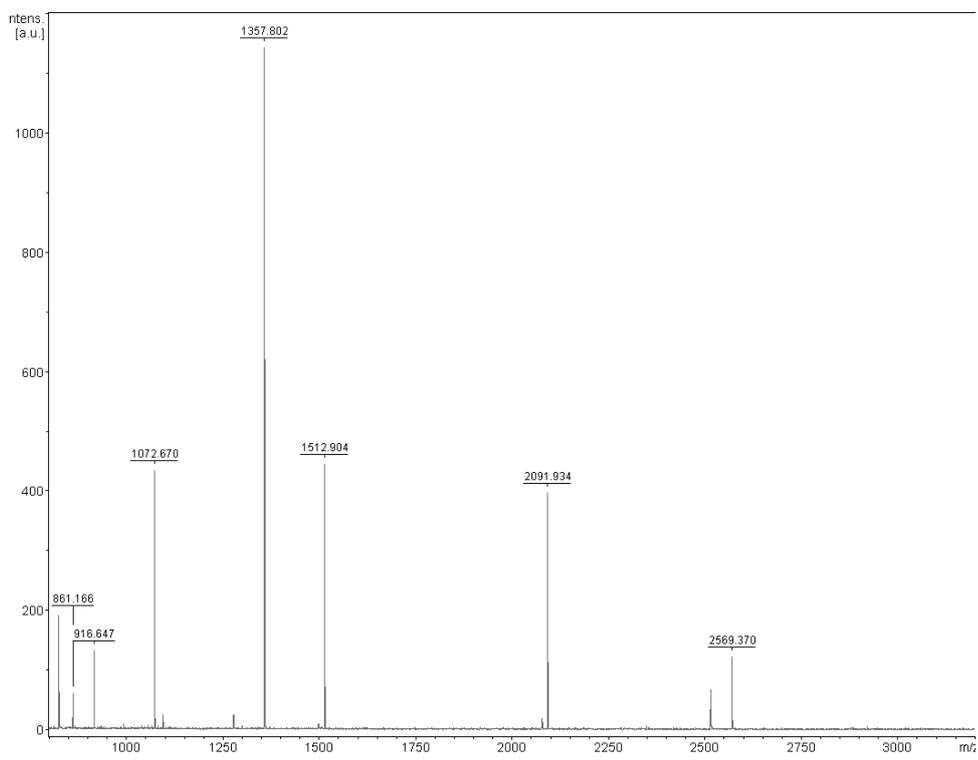
Anexo 9: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 84 do tratamento PST (proteína identificada chaperonina GroEL)



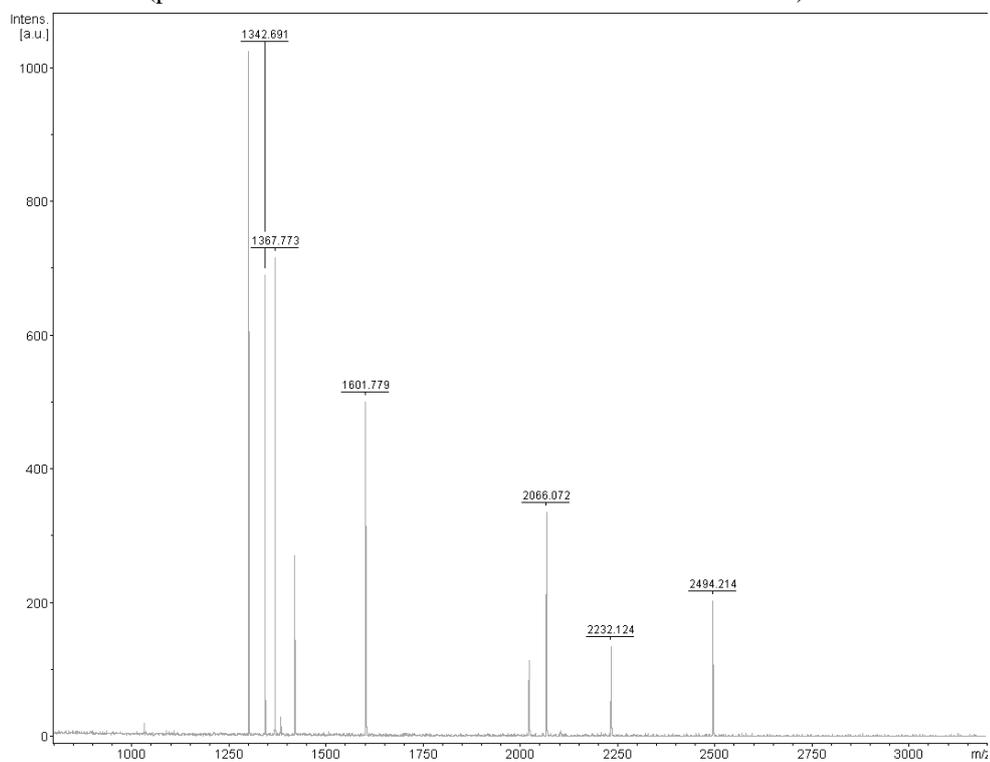
Anexo 10: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 82 do tratamento PST (proteína identificada como fosfoenolpiruvato hidratase)



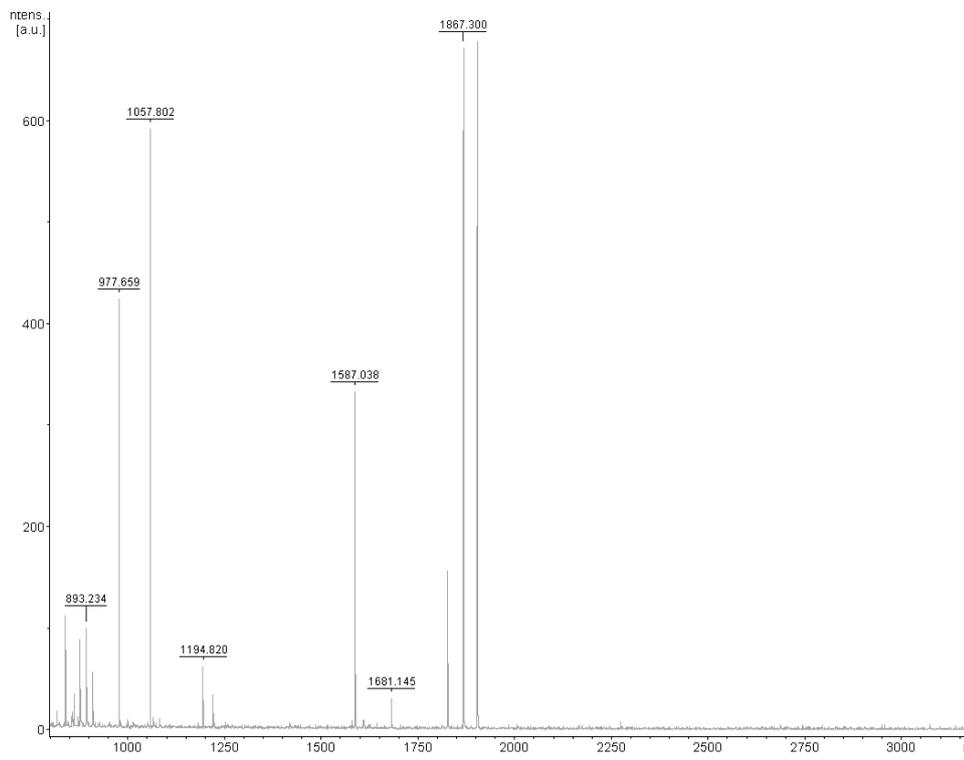
Anexo 11: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 84 do tratamento PCT (proteína identificada como protease de serina)



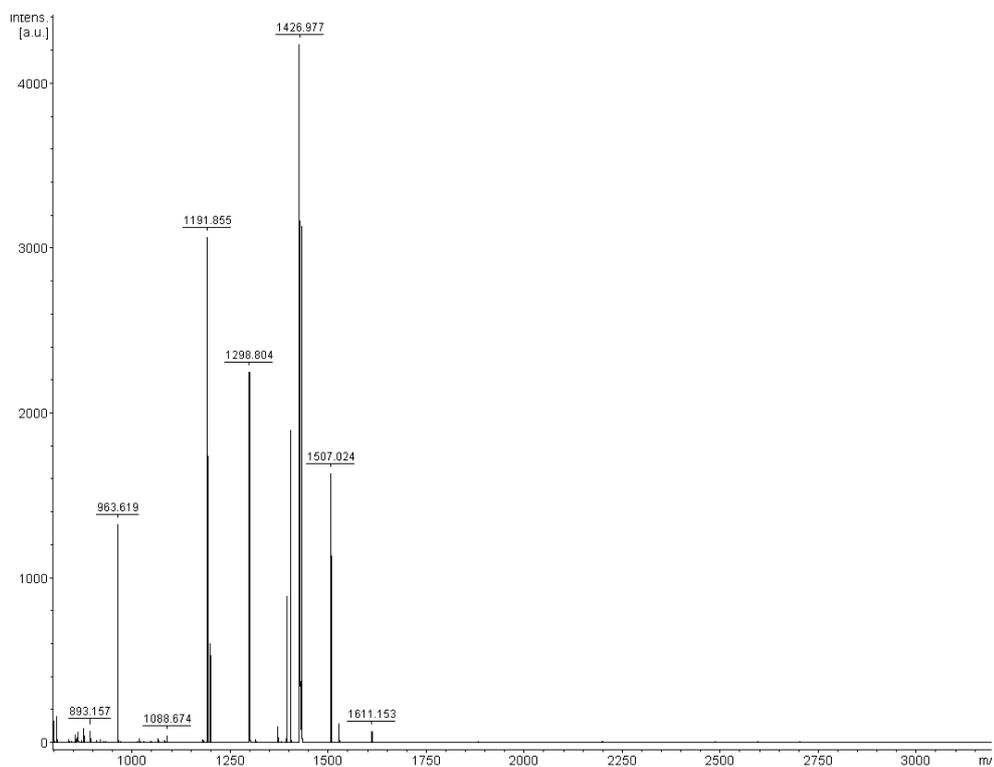
Anexo 12: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 134 do tratamento PCT (proteína identificada como subunidade Beta da ATP sintase)



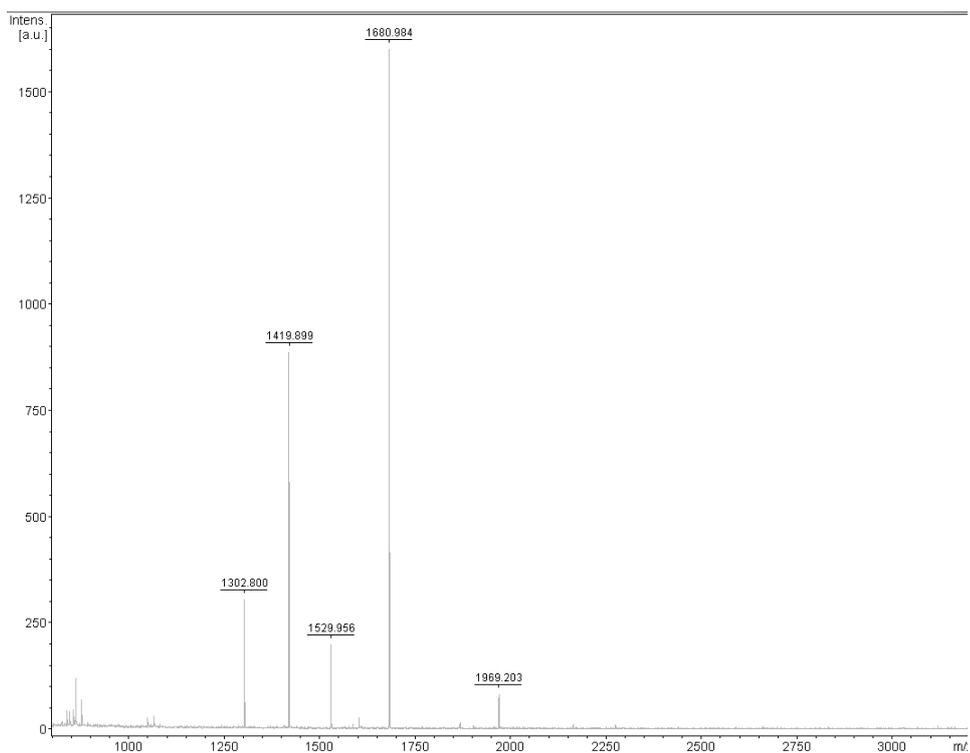
Anexo 13: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 70 do tratamento LST (proteína identificada como 6-phosphogluconato desidrogenase).



Anexo 14: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 71 do tratamento LST (proteína identificada como alcanal monooxigenase).



Anexo 15: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 100 do tratamento LST (proteína identificada como proteína periplasmática de ligação a D-xilose).



Anexo 16: Perfil de massa dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF para o *spot* 174 do tratamento LST (proteína identificada como pirofosfatase inorgânica).

