



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EDDIE LUIDY IMADA

**DETERMINAÇÃO DA ROTA METABÓLICA DE PRODUÇÃO
DE ÁCIDO INDOLACÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES
DE BIOSÍNTESE EM *Rhizobium tropici* CIAT 899 E
Rhizobium freirei PRF81**

EDDIE LUIDY IMADA

**DETERMINAÇÃO DA ROTA METABÓLICA DE PRODUÇÃO
DE ÁCIDO INDOLACÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES
DE BIOSÍNTESE EM *Rhizobium tropici* CIAT 899 E
Rhizobium freirei PRF81**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Elisete Pains Rodrigues.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

I31d Imada, Eddie Luidy.

Determinação da rota metabólica de produção de ácido indolacético e identificação de genes de biossíntese em *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Rhizobium freirei* PRF81 / Eddie Luidy Imada. – Londrina, 2015.
62 f. : il.

Orientador: Elisete Pains Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Rizóbio – Teses. 2. Auxina – Teses. 3. Hormônios vegetais – Teses. 4. Genética – Expressão – Teses. 5. Genética microbiana – Teses. I. Rodrigues, Elisete Pains. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 579.841.3

EDDIE LUIDY IMADA

**DETERMINAÇÃO DA ROTA METABÓLICA DE PRODUÇÃO DE
ÁCIDO INDOLACÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE
BIOSSÍNTESE EM *Rhizobium tropici* CIAT 899 E *Rhizobium freirei*
PRF81**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dra. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista
Universidade Estadual de Ponta Grossa –
UEPG

Londrina, 27 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio, incentivo e compreensão nos momentos de ausência

.

À prof^a Dra. Elisete Pains Rodrigues por me permitir trabalhar com liberdade, pelas valiosas discussões e estar sempre aberta a sugestões, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço em especial a pós-doutoranda Amanda Paiva, que sempre se mostrou muito prestativa, dedicada e paciente para a realização das análises de expressão por RT-qPCR mesmo em função de todas adversidades.

Aos meus amigos, pelos momentos de diversão e reflexão ao longo da minha trajetória acadêmica.

À todos os colegas do Laboratório de Genética de Microorganismos, pela agradável convivência.

À Embrapa Soja e a Dra. Mariangela Hungria pelo acesso a estrutura física e apoio que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. César Augusto Tischer, pelo auxílio nos experimentos de espectrometria de massa.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UEL.

A CAPES pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudo.

IMADA, Eddie Luidy. **Determinação da rota metabólica de produção de ácido indolacético e identificação de genes de biossíntese em *Rhizobium tropici* CIAT 899 e *Rhizobium freirei* PRF81.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Rhizobium tropici e *Rhizobium freirei* são espécies diazotróficas, conhecidas por promoverem o crescimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Uma das características mais marcantes da interação entre rizóbios e leguminosas é a formação de estruturas diferenciadas nas raízes das plantas hospedeiras, os nódulos, que são órgãos especializados na troca de nutrientes entre as bactérias e a raiz maximizando os benefícios da fixação biológica de nitrogênio (FBN). A formação de nódulos é uma relação simbiótica que envolve uma troca de sinais moleculares entre a planta e bactéria, entre os quais encontram-se flavonoides e hormônios vegetais. O ácido-3-indolacético (AIA) é um hormônio vegetal que desempenha um papel crucial no processo de biogênese destas estruturas. Embora o mecanismo de ação e regulação de alguns sinais moleculares, como os flavonoides, tenham sido amplamente revisados e estudados, o mecanismo de ação e regulação de AIA ainda é pouco compreendido. Devido à importância deste fitohormônio no estabelecimento de relações simbióticas entre rizóbios e leguminosas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de auxinas e identificar as vias de biossíntese e os prováveis genes envolvidos na produção deste fitohormônio em *R. tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81. Para isto, foram utilizados métodos colorimétricos (Salkowski) e análise por cromatografia líquida de ultra performance *tandem* espectrometria de massa (UPLC-MS). Ainda, genes de biossíntese de AIA foram identificados por meio de análises *in silico* dos genomas destas estirpes e a expressão destes genes foi avaliada por RT-qPCR na estirpe CIAT 899. Os resultados destas análises revelaram diferenças marcantes entre as estirpes CIAT 899 e PRF 81 quanto capacidade de produção de auxinas. CIAT 899 foi mais eficiente e produziu aproximadamente 600% mais auxinas que PRF 81. A produção em ambas as estirpes foi regulada negativamente na presença de N assimilável, sendo o efeito mais pronunciado na presença de amônia que reduziu a produção em até 12x na estirpe CIAT 899. A amônia é principal produto da FBN e age como o principal regulador nas etapas finais de simbiose e nas reações envolvidas com a FBN, reforçando a importância da elucidação do papel do AIA nestes processos. Além disso, foi determinado que o ácido-3-indol pirúvico (IPyA) é o principal intermediário da biossíntese de AIA nestas bactérias, visto que no perfil metabólico obtido por UPLC/MS foi detectado AIA, IPyA e indol-3-lactato (produto da redução do IPyA). Análises *in silico* identificaram genes com alta similaridade e conservação estrutural com genes já validados experimentalmente pertencentes a via do IPyA tanto no genoma da estirpe CIAT 899 quanto na PRF 81. Contudo, não foram observadas grandes diferenças que pudessem explicar os fenótipos contrastantes destas estirpes com relação a capacidade de biossíntese de AIA. As análises de expressão por RT-qPCR mostraram que estes genes foram induzidos por triptofano na estirpe CIAT 899, sugerindo uma possível função no metabolismo de triptofano e síntese de AIA via IPyA.

Palavras-chave: Rizóbio. Auxina. Hormônios vegetais. Genética.

IMADA, Eddie Luidy. **Determination of the metabolic pathway of indole acetic acid production and identification of biosynthetic genes in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium freirei* PRF81.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Rhizobium tropici and *Rhizobium freirei* are diazotrophic species known by promote growth in *Phaseolus vulgaris*, a leguminous plant. One of the most unique features of the rhizobia-legume interaction is the formation of differentiated structures in the roots of host plants, called nodules, specialized on the exchange of nutrients between bacteria and the root, maximizing the benefits of biological nitrogen fixation (BNF). The nodule formation is a symbiotic relationship that involves an exchange of molecular signals between plant and bacteria such as flavonoids and plant hormones. The indole-3-acetic acid (IAA) is a plant hormone that plays a crucial role in the biogenesis process of these structures. *Rhizobium tropici* and *Rhizobium freirei* are rhizobia known to promote plant growth in bean by the mechanism mentioned above. Although the action mechanism and regulation of certain molecular signals, such as flavonoids have been widely reviewed and studied, the action mechanism of IAA and its regulation is poorly understood in these species. Due to the importance of this phytohormone, in the establishment of symbiotic relationships between legumes and rhizobia, this study aimed to evaluate the production of auxin and identify biosynthesis pathways and genes involved in the production of IAA in *R. tropici* and *R. freirei*. Colometric methods (Salkowski and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS) were used. Further, genes of auxin biosynthesis were identified through *in silico* analysis of the genomes of these strains and the expression was evaluated through RT-qPCR on CIAT 899 strain. These analyzes results revealed striking differences between CIAT 899 and PRF 81 strains on IAA biosynthesis. CIAT 899 was more efficient and produced more auxins than PRF 81 by 6-fold. Production in both strains was downregulated in the presence of assimilable N, with the most pronounced effect in the presence of ammonia, which cut production by up to 12x in CIAT 899. The ammonia, is the main product of BNF and acts as the main regulator in final stages of symbiosis, reinforcing the importance of this hormone during symbiosis. Furthermore, it was found that the acid-indol-3-pyruvic (IPyA) is the major intermediate of IAA biosynthesis of these bacteria, whereas in the metabolic profile obtained by UPLC-MS was detected IAA, IPyA and indole-3-lactate (reducing product of IPyA). *In silico* analysis, identified genes with high similarity and structural conservation with genes already validated experimentally belonging to the IPyA pathway in both the genome of CIAT 899 as PRF 81; However, with no major differences that could explain the contrasting phenotypes of these strains. The expression analysis by RT-qPCR showed that these genes were induced by tryptophan at 899 CIAT strain suggesting a possible role in the metabolism of tryptophan IAA biosynthesis via IPyA.

Keywords: Rhizobium. Auxin. Plant hormones. Genetics. Microbial genetics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Rotas e enzimas envolvidas na biossíntese de AIA em bactérias25
- Figura 2** – Efeito do triptofano no crescimento e produção de auxinas em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) na presença de triptofano (TRP) em meio de cultivo YM. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.....38
- Figura 3** – Efeito da apigenina no crescimento e produção de auxinas em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) na presença de triptofano (TRP) em meio de cultivo YM. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.....38
- Figura 4** – Efeito do $(\text{NH}_4)_3\text{HPO}_4$ 1 mg/mL no crescimento e produção de auxinas em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) na presença de triptofano (TRP) em meio de cultivo YM. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.....39
- Figura 5** – Efeito do KNO_3 (1 mg/mL) no crescimento e produção de auxinas em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) na presença de triptofano (TRP) em meio de cultivo YM. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.....39
- Figura 6** – Cromatograma dos padrões de compostos indoólicos triptamina (TAM), indol-3-ácido láctico (ILA), indol-3-acetamida (IAM), triptofano (TRP), indol-3-acetonitrila (IAN), antranilato (ANT), indol-3-ácido acético (AIA), indol-3-etanol (TOL) e indol-3-ácido pirúvico (IPyA).41
- Figura 7** – Perfil metabólico de *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) obtido do cultivo na presença de triptofano gerado a partir da extração dos valores massa/carga (m/z) dos respectivos compostos.....42
- Figura 8** – Efeito de diferentes fontes de N no perfil metabólico de *Rhizobium tropici* CIAT 899 cultivado na presença triptofano.....43

Figura 9 – Efeito de diferentes fontes de N no perfil metabólico de <i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 na presença triptofano.....	44
Figura 10 – Contexto genômico da L-aminoácido oxidase de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Rhizobium freirei</i> PRF 81. Legenda: Laranja – Transposon, azul – L-aminoácido oxidase e verde – Citocromo C.	46
Figura 11 – Sobreposição dos modelos tridimensionais da LAAO encontrada em <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 (roxo) com o modelo da LAAO de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (branco).	47
Figura 12 – Contexto genômico dos genes y4we e y4wf de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 e <i>Rhizobium freirei</i> PRF 81. Legenda: Cinza – proteínas hipotéticas, bege – Indole-3-acetaldehyde oxidase e laranja – histidinol aminotransferase.....	47
Figura 13 – Níveis de expressão dos genes relacionados à biossíntese de AIA via IPyA em <i>R. tropici</i> CIAT 899 após crescimento para fase exponencial (DO600nm 0.5) na presença de triptofano. A expressão relativa foi determinada pelo software REST2009. Dados representam a média de três repetições biológicas ± desvio padrão.....	49
Figura 14 – Sobreposição dos modelos tridimensionais dos transportadores encontrados em <i>R. tropici</i> RTCIAT 899_PB01115 (A) e RTCIAT 899_PC03520 (B) (Vermelho) com o modelo do transportador aroP de <i>E. coli</i> (branco)	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes e proteínas codificadas em <i>R. tropici</i> e <i>R. freirei</i>	46
Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão por RT-qPCR.	49
Tabela 3 – Análise estatística resultante de três replicatas técnicas e biológicas dos genes relacionados a biossíntese de AIA via IPyA em <i>R. tropici</i> CIAT 899 após crescimento para fase exponencial (DO600nm 0.5) na presença de triptofano. As análises estatísticas foram determinadas pelo software REST2009.	50

LISTA DE ABREVIações

BPCV	bactérias promotoras de crescimento vegetal
FBN	fixação biológica do nitrogênio
AIA	ácido-indol-3-acético
ROS	espécies reativas de oxigênio
TTSS	sistema de secreção tipo III
SPS	polissacarídeos de superfície
AIA	ácido-3-indol acético
ANT	antranilato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta básica de procura e alinhamento global)
D.O.	densidade óptica
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida de ultra performance)
IAAld	indol-3-acetaldeído
IAM	indol-3-acetamida
IAN	indol-3-acetonitrila
IAOx	indol-3-acetaldoxima
IBA	indol-3-ácido butírico
ILA	indol-3-ácido láctico
IOR	indol-ferredoxin oxidoreductase
IMOR	indolpiruvato: metilviologeno oxidoreductase
IPA	indol-3-ácido propiônico
IPyA	indol-3-ácido pirúvico
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> (Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto)
N	nitrogênio
rpm	rotações por minuto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (extração em fase sólida)
TAM	indol-3-etanolamina ou triptamina
Taq	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TOL	indol-3-etanol ou triptofol
TOL	triptofol
TRP	triptofano

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVO GERAL	15
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1.	Interação planta-bactéria	16
3.2.	Simbiose <i>Rhizobium</i>-feijoeiro	18
3.3.	Aspectos moleculares envolvidos na simbiose rizóbio-leguminosas	21
3.4.	Auxina	23
3.5.	Tecnologias e ferramentas no estudo de vias metabólicas	28
3.5.1.	<i>RT-qPCR</i>	28
3.5.2.	<i>InterPro</i>	28
3.5.3.	<i>MicroScope</i>	29
3.5.4.	<i>Cromatografia Líquida de ultra performance (UPLC) e Espectrometria de massa (MS)</i>	29
4.	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1.	Estirpes e condições de cultivo	30
4.2.	Análise da produção de auxinas pelas estirpes <i>R. tropici</i> CIAT 899 e <i>R. freirei</i> PRF 81	30
4.2.1.	<i>Análise colorimétrica (Salkowski)</i>	31
4.2.2.	<i>Análise por UPLC-MS</i>	31
4.3.	Análise <i>in silico</i> dos genes envolvidos em vias de biossíntese de AIA	32
4.4.	Seleção de iniciadores	33
4.5.	Análise da expressão por RT-qPCR	34
4.5.1.	<i>Extração de RNA e síntese de cDNA</i>	34
4.5.2.	<i>RT-qPCR</i>	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

5.1.	Produção de auxinas em função da fase de crescimento	37
5.2.	Análises de UPLC-MS	40
5.3.	Identificação de genes envolvidos na biossíntese de AIA	44
5.3.1.	<i>Análise genômica de genes envolvidos na via Indolpiruvato (IpyA)</i>	45
5.3.2.	<i>Análise expressão (RT-qPCR)</i>	48
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7.	CONCLUSÃO	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9.	ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

Bactérias são habitantes comuns encontradas em associação com diversas espécies. Conforme a capacidade de afetar a saúde da planta hospedeira, estas bactérias podem ser consideradas comensais, quando não afetam a planta diretamente, patógenas ou parasitas, quando causam um impacto negativo, ou mutualísticas quando causam um efeito benéfico na hospedeira (BEATTIE, 2007). No entanto, as relações ecológicas querem compatibilidade, de modo que a designação de bactérias associadas a plantas como mutualista ou patógena, indica apenas o seu potencial de ter uma associação mutualística ou patogênica com uma ou algumas espécies de plantas (HIRSCH, 2004). Isto pode ser facilmente observado em espécies do gênero *Xanthomonas*: Embora o gênero seja capaz de afetar mais de 240 gêneros de plantas, cada espécie de *Xanthomonas* apresenta sua patogenicidade normalmente a um único gênero ou até mesmo espécie vegetal, não afetando outros gêneros. (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Bactérias que possuem associações mutualísticas com plantas tem sido alvo de muitos estudos, particularmente em interações com plantas de interesse agrícola, devido aos efeitos positivos da inoculação destas bactérias no crescimento e produtividade. Os efeitos benéficos das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) podem ser atribuídos a diversos mecanismos, como a fixação biológica do nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos, aumento da absorção de nutrientes, aumento da resistência contra estresses ambientais e antagonismo a patógenos. O uso de BPCV em substituição aos insumos industriais tem ganhado força por ser uma tecnologia eficiente, limpa, de baixo custo e adequada ao modelo de produção sustentável exigido atualmente (SAHARAN; NEHRA, 2011; DE-BASHAN *et al.*, 2012.).

Um caso de interação muito bem estudada ocorre entre bactérias simbióticas do grupo dos rizóbios e plantas leguminosas (Fabaceae), como a soja e feijão. A simbiose rizóbio-leguminosa resulta no desenvolvimento de nódulos radiculares, onde a bactéria realiza FBN fornecendo, deste modo, nitrogênio assimilável à planta. Em troca, a planta fornece fotossintatos aos

nódulos, de modo que os rizóbios tenham uma fonte de carbono contínua para sobreviver e continuar fixando nitrogênio, fechando assim um ciclo de cooperação (DENISON e KIERS, 2004; WEST *et al.*, 2002).

As espécies *Rhizobium tropici* (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991) e *Rhizobium freirei* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013) são bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) simbiotes de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), caracterizadas por serem tolerantes a altas temperaturas (40 °C), condições ácidas e outros tipos de estresses. Estas características, comuns nos solos brasileiros, tornam *R. tropici* e *R. freirei* espécies apropriadas para uso como fertilizante biológico na cultura do feijão, como já foi comprovado por HUNGRIA e colaboradores (2003).

Dada a importância desta simbiose legume-rizóbio no contexto da agricultura sustentável, os eventos e os aspectos moleculares envolvidos nesta interação são alvo de inúmeros estudos, que buscam compreender melhor esta simbiose e deste modo, obter maior eficiência na nodulação e da FBN (COOPER, 2007; DENISON, 2000; FERGUSON *et al.*, 2010). Um fator importante envolvido no estabelecimento da simbiose é a produção de fitohormônios pelos rizóbios, em particular a auxina (AIA) (COOPER, 2007). Embora o papel da auxina no processo de formação de nódulo ainda não esteja totalmente esclarecido, tem sido relatado que a síntese de auxina atua durante as fases iniciais do processo de infecção e.g. enrolamento dos pelos radiculares, formação do cordão de infecção e na iniciação e diferenciação do nódulo (PII; CRIMI; CREMONESE, 2007; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

Considerando a importância das auxinas, seja como promotor do crescimento ou sinalizador celular, inúmeros estudos têm buscado compreender melhor como as bactérias sintetizam este fitohormônio e qual o seu envolvimento na interação planta-bactéria (DING; OLDROYD, 2009; GRUNEWALD *et al.*, 2009; MATHESIUS, 2008; PII; CRIMI; CREMONESE, 2007).

A produção deste fitohormônio já foi relatada em *Rhizobium tropici* (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), bem como em outras espécies do gênero *Rhizobium* (ERNSTSEN *et al.*, 1987; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; PÉREZ-GALDONA *et al.*, 1989; SPAEPEN *et al.*, 2009), e seus efeitos promotores de crescimento vegetal já são bem conhecidos (VARGAS; MENDES; HUNGRIA,

2000). Pelo menos cinco vias de biossíntese de auxina já foram descritas em bactérias: indol-3-acetamida (IAM), ácido indol-3-ácido pirúvico (IPyA), indol-3-acetonitrila (IAN), triptamina (TAM) e oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) (DUCA *et al.*, 2014; SPAEPEN, 2015). Em algumas bactérias as enzimas, genes e os mecanismos de regulação envolvidos na biossíntese de auxina são conhecidos. No entanto, em *R. tropici* e *R. freirei* muito pouco é conhecido sobre a biossíntese deste fitohormônio e seu papel no estabelecimento da simbiose. Devido à importância deste fitohormônio, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de auxinas e identificar genes e as vias de biossíntese envolvidos na produção de AIA em *R. tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos de regulação do fitormônio ácido indolacético no contexto da interação rhizóbio leguminosa e determinar os possíveis genes envolvidos na biossíntese deste fitormônio

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção e crescimento das estirpes CIAT 899 e PRF 81 na presença do aminoácido triptofano e em diferentes fontes de nitrogênio;
- Determinar o perfil metabólico das estirpes CIAT 899 e PRF 81 na presença do aminoácido triptofano e em diferentes fontes de nitrogênio através de análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa;
- Identificar possíveis genes de biossíntese de auxina através de análises *in silico*;
- Avaliar a expressão dos genes identificados na presença e ausência de triptofano por RT-qPCR

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Interação planta-bactéria

Procariotos, principalmente membros do domínio Bacteria, são numericamente dominantes na maioria das comunidades microbianas em plantas, com populações que alcançam densidades de até 10^{10} células por grama de tecido vegetal, conforme revelado por técnicas independentes de cultivos (WEIDNER *et al.*, 2000; ASHELFORD *et al.*, 2003). As plantas naturalmente apresentam uma variedade de micro-habitats, os quais possuem características únicas e podem ser colonizados por diferentes grupos de bactérias associativas, tais como: a rizosfera, que compreende a zona de influência das raízes; a filosfera que abrange a superfície dos órgãos aéreos (folhas, flores, ramos e caules) da planta; os sítios endofíticos, os quais incluem os tecidos internos da planta e a espermosfera. As bactérias associativas geralmente são membros de comunidades bacterianas complexas (YANG *et al.*, 2001). De acordo com sua relação com a planta hospedeira, estas bactérias podem ser agrupadas como comensalista, parasitas ou patógenas e mutualistas.

Bactérias comensalistas, as quais compreendem a maioria das bactérias associadas a plantas, captam nutrientes secretados na superfície das raízes e folhas, não alterando, contudo, o desenvolvimento da planta. Por outro lado, as bactérias patógenas afetam negativamente sua hospedeira. A maioria das bactérias patógenas são gram-negativas pertencentes às classes α , β , e γ das proteobactérias. Algumas são de extrema importância, pois causam doenças em vegetais de interesse econômico como, por exemplo, os gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas* responsáveis pela maioria das doenças que causam necrose em vegetais de interesse econômico como o arroz, trigo, tomate, feijão, entre outros. Em adição, bactérias que promovem benefícios para sua hospedeira são chamadas de mutualistas, estes pertencem a diversos filos e são de grande interesse agrícola, pois suas interações benéficas geram um aumento considerável na produção das culturas, como soja, feijão, milho, cana-de-açúcar, arroz, etc. As interações entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. com cana-de-açúcar, e *Rhizobium* spp.

com plantas leguminosas, são exemplos que resultam em benefícios na produtividade e tem sido aproveitada pelo homem (BEATTIE, 2007).

Os benefícios das bactérias às plantas são atribuídos a diversos fatores, entre eles, o aumento de nutrientes disponível na rizosfera por meio de decomposição de matéria orgânica, aumento da captação de nutrientes em função do aumento da superfície radicular causada pela secreção de fitormônios, aumento da captação de ferro pela produção de sideróforos, estímulo a outras simbioses benéficas ao hospedeiro, solubilização de fosfato e pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (KLOEPPER *et al.*, 1980; VESSEY, 2003). Este último é atribuído à existência da nitrogenase, um complexo enzimático amplamente distribuído entre membros da ordem Rhizobiales e outras bactérias. A nitrogenase compreende duas proteínas: a dinitrogênio redutase, um homodímero com centros ferro-enxofre (FeS) o qual se liga a duas moléculas de ATP e transfere elétrons para a segunda proteína do complexo, uma proteína ferro-molibdênio (FeMo), que possui o sítio de ligação e redução do nitrogênio atmosférico (FERGUSON, S. J., 1998; IGARASHI, 2003).

O provimento de N para plantas via FBN é um importante componente da agricultura sustentável, pois evita o uso de fertilizantes químicos, que devido às más práticas de uso podem gerar grandes impactos ambientais. Devido ao grande número de simbioses rizóbio-leguminosa, as quais representam grande parte dos cultivos de interesse comercial, e a sua capacidade de realizar a FBN, os rizóbios têm sido utilizados como fertilizante biológico desde 1890 nas mais diversas culturas (KRISHNAN; BENNETT, 2007; SESSITSCH *et al.*, 2002).

O mutualismo que ocorre entre os membros da ordem Rhizobiales e membros da família Fabaceae é uma das interações planta-bactéria mais estudadas. Diversas espécies de leguminosas são noduladas por bactérias do grupo dos rizóbios, tais como a ervilha (*Pisum sativum*) que é nodulada por *Rhizobium legumisarum* bv *viciae* (LAGUERRE *et al.*, 1996), a soja por *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN, 1982), *B. elkanii* (KUYKENDALL; SAXENA, 1992) e *Sinorhizobium fredii* (CHEN; YAN; LI, 1988), e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) pelas espécies *R. giardinii* (AMARGER *et al.*, 1997) e *R. tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991) entre outras.

A interação rizóbio-leguminosa é conhecida há muito tempo. Em 1888, Beijerinck relatou o isolamento de uma bactéria capaz de formar nódulos e descobriu que elas eram responsáveis pelo processo de fixação de nitrogênio, nomeando esta bactéria como *Bacillus radicícola*. Posteriormente, Frank alterou o nome para *Rhizobium* que inicialmente continha apenas a espécie *R. leguminosarum* (WILLEMS, 2006). Inicialmente, a classificação dos rizóbios era baseada na especificidade ao hospedeiro, no entanto, foi descoberto que algumas bactérias, especialmente as de origem tropicais, como *Sinorhizobium* sp. NGR234, são bastante promiscuas sendo capazes de nodular 232 espécies pertencentes a mais de 100 gêneros (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999), enquanto outras como *R. leguminosarum* bv. *trifolii* nodulam apenas plantas do gênero *Trifolium*. Embora o hospedeiro ainda influencie a classificação de novas espécies, não há um consenso comum quanto à classificação de rizóbios (KRISHNAN; BENNETT, 2007).

O termo “rizóbio” foi inicialmente utilizado para descrever os membros do gênero *Rhizobium*, é atualmente usado para descrever todas as bactérias filogeneticamente próximas ou originalmente descritas dentro do gênero *Rhizobium* capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em associação com leguminosas (WILLEMS, 2006). Antes de 1980, o gênero *Rhizobium* continha apenas quatro espécies; na década de 90 apresentava dez espécies descritas, e atualmente, de acordo com o portal LPSN (<http://www.bacterio.net/>), mais de setenta e nove espécies de *Rhizobium* já foram descritas. Devido à capacidade das espécies de fixar nitrogênio em plantas leguminosas, nas quais há um grande interesse comercial, dezenas de espécies de rizóbio foram descobertas e, com a utilização de técnicas mais avançadas de identificação molecular, muitas foram reclassificadas de estirpes a espécie.

3.2. Simbiose *Rhizobium*-feijoeiro

Uma das interações de grande relevância socioeconômica no Brasil é a interação entre bactérias do gênero *Rhizobium* sp. e plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). O gênero *Phaseolus* sp. pertence à família Fabaceae (Leguminosae), uma das maiores famílias botânicas, caracterizada pela ocorrência de seus frutos do tipo legume, que são amplamente utilizados na

alimentação humana. Este gênero possui duas espécies amplamente cultivadas, o feijão comum (*P. vulgaris* L.) e o feijão-fava (*P. lunatus*), além de outras espécies menos cultivadas como *P. coccineus* e *P. accutifolius* (PRATAP; KUMAR, 2011).

O feijão comum é amplamente cultivado no mundo. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil é segundo maior produtor de feijão, com uma área de cultivo de 3,365 milhões de hectares. O consumo médio per capita de feijão no Brasil é de 17 kg por ano. Contendo um teor proteico de 20% o grão desempenha um papel indispensável na dieta do país, sendo a principal fonte de proteína em regiões pobres, com um custo aproximado de 0,30 centavos por refeição (FAO, 2013).

O cultivo de feijão é considerado uma cultura de subsistência em pequenas propriedades, embora também seja adotado em sistemas produtivos que fazem uso de tecnologias intensivas, como a irrigação, controle fitossanitário e colheita mecanizada (PARANÁ, 2012). O cultivo desta leguminosa, realizado em três safras ao longo do ano, ocupa lugar de destaque na agricultura paranaense. O estado do Paraná é o segundo maior produtor de feijão do país, com 426 mil hectares de área plantada na safra de 2014/15. Cultivada principalmente em propriedades de pequeno a médio porte, é uma das principais alternativas para o pequeno produtor. O cultivo também gera uma grande demanda de mão de obra tanto familiar como contratada. A cultura do feijão sempre teve um papel importante para economia paranaense como geradora de emprego e renda no campo. O estado do Paraná contribuiu com 767 mil toneladas durante a safra de 2014/15, totalizando 23% da produção brasileira (BRASIL, 2015).

O Brasil, assim como toda região tropical, apresenta baixa produtividade para cultura de feijão, com cerca de 1067 kg ha⁻¹ durante a safra de 2014/15, sendo frequentemente atribuída às más práticas de cultivo, como fornecimento insuficiente de N e pouco uso de tecnologia (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003). Mesmo com novas tecnologias e cultivares, o rendimento do feijão no Brasil ainda é considerado baixo, devido a um aspecto comum dos solos brasileiros que é a falta de N disponível e a acidez do solo. Para o aumento da produtividade, o uso de fertilizantes nitrogenados minerais a base de ureia é amplamente utilizada, contudo além de ser caro para um pequeno produtor, o

uso excessivo de fertilizantes pode levar a sérios danos ambientais (FOLEY *et al.*, 2011).

Como alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados, os biofertilizantes contendo bactérias diazotróficas tem beneficiado a cultura do feijão. Duas estirpes, PRF 81 (=SEMIA 4080) e CIAT 899 (=SEMIA 4077) de *R. freirei* e *R. tropici*, respectivamente, conhecidas por promoverem a fixação biológica de nitrogênio, tem sido recomendada como inoculante para cultura do feijão (CHUEIRE *et al.*, 2000). A estirpe PRF 81 foi inicialmente classificada como *R. tropici* com base em análises do gene rRNA 16S, a qual apresenta uma grande similaridade com a estirpe tipo da espécie CIAT 899 (HUNGRIA *et al.*, 2000). Em 2009, Ribeiro e colaboradores (2009) por meio de análises de MLST (*Multilocus sequence typing*) observou uma grande diferença entre os genomas PRF 81 e CIAT 899, sendo classificada em 2013 por Dall'Agnol e colaboradores (2013) como uma nova espécie, *Rhizobium freirei* em homenagem a João Ruy Jardim Freire, um ilustre rizobiologista brasileiro.

R. tropici (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991) e *R. freirei* (DALL'AGNOL *et al.*, 2013) são bactérias nativas das regiões tropicais da América do Sul e são caracterizadas por serem tolerantes a altas temperaturas (40 °C), condições ácidas e por apresentarem uma melhor estabilidade genética que outras espécies de *Rhizobium*, mantendo suas propriedades simbióticas mesmo em condições de estresse (DALL'AGNOL *et al.*, 2013; MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991).

Devido às estas características, as quais se sobrepõem às condições encontradas nos solos brasileiros, *R. tropici* e *R. freirei* são espécies recomendadas para o uso agrícola. Inoculantes comerciais para feijão contendo a estirpe CIAT 899, de origem colombiana e pertencente à coleção de espécies de *Rhizobium* do Centro Nacional de Agricultura Tropical, demonstraram um aumento médio na produção de 414 kg ha⁻¹. Já a estirpe PRF 81, de origem brasileira e pertencente à coleção do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), demonstrou um aumento médio na produção de 435 kg ha⁻¹ (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003), comprovando assim a eficácia destas espécies como inoculantes para feijão.

3.3. Aspectos moleculares envolvidos na simbiose rizóbio-leguminosas

Uma das características mais marcantes da simbiose rizóbio-leguminosa é a formação de estruturas especializadas nas raízes das plantas hospedeiras, os nódulos. A formação de nódulos envolve uma troca de sinais moleculares entre a planta e bactéria, onde a bactéria responde a sinais da planta, geralmente flavonoides, produzindo moléculas sinalizadoras, chamadas de fatores de nodulação. Estes fatores induzem o encurvamento dos pelos radiculares, seguido de hidrólise localizada da parede celular e invaginação da membrana plasmática e da parede celular, gerando os chamados cordões de infecção. As bactérias, presas nos pelos radiculares encurvados, penetram na raiz e se multiplicam dentro do cordão de infecção, o qual conduz o rizóbio às células corticais em divisão. Neste momento, as células de rizóbio entram na célula hospedeira, por endocitose, onde elas se diferenciam em bacteroides e passam a realizar a FBN intensamente (BEATTIE, 2007).

O termo “diálogo molecular” foi primeiramente usado por Dénarié e colaboradores (1993) para descrever a troca de sinais químicos que levam a infecção dos pelos radiculares e formação de nódulos nas relações simbióticas planta-bactéria. Os principais participantes neste diálogo são os flavonoides, liberados pela leguminosa hospedeira, e os fatores de nodulação (lipo-chito-oligossacarídeos), sintetizados pelos rizóbios. Outros compostos conseguem induzir a transcrição de genes de nodulação (*nod*), mas na maioria dos casos, somente em concentrações maiores que aquelas observadas pela indução por flavonoides (GUASCH-VIDAL *et al.*, 2013; GAGNON; IBRAHIM, 1998).

Na rizosfera de plantas leguminosas, os rizóbios sofrem a influência de compostos quimiotáticos e são atraídos pela planta na presença de moléculas exsudadas pela raiz como flavonoides, os quais auxiliam na colonização da raiz. Na presença de outros compostos secretados pela planta como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos esta atração tende a ser mais forte (COOPER, 2007).

Flavonoides são metabólitos secundários, gliconas ou agliconas, de uma variedade de subclasses como: chalconas, flavonas, flavononas e isoflavonas. Eles são capazes de induzir os genes de nodulação mesmo em uma baixa

concentração (micromolar ou até mesmo nanomolar). Havendo interação compatível entre os pares na rizosfera, as raízes secretam mais flavonoides, aumentando a capacidade de indução dos genes *nod* dos microssimbiontes (COOPER, 2007; VAN BRUSSEL *et al.*, 1990).

Nos exsudatos radiculares de *P. vulgaris* são encontrados diversos flavonoides como a daidzeína, coumestrol, naringenina, genisteína e a apigenina, sendo este último o flavonoide presente em maior concentração e capacidade de indução de genes *nod* (BOLANOS-VASQUEZ; WERNER, 1997; DARDANELLI *et al.*, 2012; ESTÉVEZ *et al.*, 2009).

O modo de ação dos flavonoides durante a indução dos genes *nod* ainda não foi totalmente elucidado, mas certos aspectos já estão bem esclarecidos (HASSAN; MATHESIUS, 2012). A transcrição dos genes necessários para síntese do fator de nodulação (fator *Nod*) é regulada pelo produto dos genes *nodD*, a proteína NodD, um regulador transcricional da família LysR. Sob indução dos flavonoides, a proteína NodD se liga as regiões conservadas, os *nod*-boxes, encontradas nas regiões promotoras de genes *nod*, ativando a transcrição destes e conseqüentemente, a produção de fatores Nod (FISHER; LONG, 1993; PECK *et al.*, 2006).

Fatores de nodulação são sinais essenciais no desenvolvimento do processo simbiótico, sem os quais os rizóbios não conseguem entrar nas raízes de leguminosas (RELIC *et al.* 1994). Eles são resultantes da ação de uma série de enzimas codificadas em sua maioria pelos genes *nod* de rizóbios. Estes fatores são lipochito-oligossacarídeos formados por resíduos de N-acetil-D-glicosamina unidos por ligações β -1,4 e uma cadeia de ácido graxo ligada à extremidade não redutora (COOPER, 2007). Os fatores de nodulação podem variar quanto ao número de resíduos de N-acetil-D-glicosamina, o tipo de ácido graxo na extremidade não redutora e o número e tipos dos grupos substituintes ligados à molécula. Eles desencadeiam uma série de respostas na planta, como: deformação dos pelos radiculares, despolarização da membrana plasmática, rápidas alterações na concentração de cálcio intracelular livre nos pelos radiculares, alteração no citoesqueleto dos pelos radiculares, formação dos cordões de pré-infecção nos pelos radiculares, indução da divisão celular do córtex nos sítios de nodulação, inibição do sistema gerador de espécies reativas de oxigênio (ROS), alteração do fluxo de auxina nas raízes (em

combinação com flavonoides), indução de genes da planta (nodulinas) no processo de pré-infecção, infecção, desenvolvimento dos nódulos e atuam em estágios posteriores do funcionamento dos nódulos na simbiose (BARTSEV *et al.*, 2004; COOPER, 2007).

Além dos genes envolvidos na síntese dos fatores Nod, o mecanismo de indução flavonoides/NodD/nod-box regula também genes envolvidos em diversos eventos importantes para o estabelecimento da simbiose como: proteínas do sistema de secreção tipo III (TTSS), síntese e modificação de polissacarídeos de superfície (EPSs) e produção de fitohormônios (COOPER, 2007; HASSAN; MATHESIUS, 2012). Kobayashi e colaboradores (2004) relataram a existência de um mecanismo regulatório que assegura que os diversos genes controlados por *nod*-boxes não sejam ativados simultaneamente na presença de flavonoides indutores, desta maneira a expressão de um gene simbiótico é sincronizado para coincidir com o requisito necessário para sua contribuição em uma determinada etapa da infecção da raiz ou desenvolvimento do nódulo. Do mesmo modo que os flavonoides regulam os processos iniciais de simbiose, a amônia (NH₄⁺) o principal metabólito encontrado em nódulos maduros, atua nos processos finais da simbiose normalmente de forma antagônica a ação dos flavonoides (PATRIARCA *et al.*, 2002).

Um fator importante no desenvolvimento da simbiose é a produção de auxinas. Muitos estudos indicam que a alteração nas concentrações de auxina e o balanço entre os fitormônios auxina e citocinina, são pré-requisitos para a organogênese dos nódulos (MATHESIUS, 2008; SUZAKI; ITO; KAWAGUCHI., 2013; CHAMPION *et al.*, 2015).

3.4. Auxina

O ácido indol-3-acético (AIA) considerado um fitormônio da classe das auxinas, é importante em praticamente todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal (WOODWARD; BARTEL, 2005). A auxina é uma molécula sinalizadora que desempenha um papel fundamental nas interações planta-microrganismo (DING; OLDROYD, 2009; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). Estima-se que a

produção de auxinas faça parte do metabolismo de até 80% das bactérias que vivem na rizosfera, denominadas rizobactérias (KHALID *et al.*, 2005).

A produção de auxinas por bactérias associativas altera as concentrações endógenas deste fitormônio, interferindo no desenvolvimento vegetal, conforme a sua concentração do fitormônio (PATTEN; GLICK, 1996). Em bactérias fitopatogênicas como *Agrobacterium* spp. e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, a auxina está envolvida na formação dos tumores e galhas em seus hospedeiros (JAMESON, 2000) e, em rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), como *Azospirillum* spp., a produção de auxinas estimula o desenvolvimento de raízes e conseqüentemente, melhora a absorção de nutrientes do solo (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Muitos estudos indicam que a alteração nas concentrações de auxina na planta hospedeira é um pré-requisito para a organogênese nodular (MATHESIUS, 2008). Embora as etapas iniciais da formação de nódulos possam ser induzidas somente pelos fatores de nodulação, a biossíntese de AIA pelos rizóbios pode ser importante em etapas mais avançadas da nodulação, como indicam estudos em que mutantes deficientes na biossíntese de AIA são debilitados na capacidade de fixação de nitrogênio, enquanto que um aumento da eficiência da nodulação foi observado por estirpes superprodutoras de AIA. No entanto, estas alterações variam dependendo do tipo de nodulação encontrada na planta (PII; CRIMI; CREMONESE, 2007).

As auxinas estão envolvidas em múltiplos processos como: divisão celular, diferenciação celular e formação do feixe vascular, sendo estes três processos também necessários para formação de nódulos. Alguns experimentos sugerem que os fatores de Nod interferem no transporte de auxinas (MATHESIUS, 2008). Um estudo feito por BOOT e colaboradores (1999) demonstrou que rizóbios inibem localmente o transporte acrópeto de auxina 24 horas após a inoculação. A expressão de um promotor induzido por auxina (GH3) foi reduzido de forma acrópeta a partir do local de inoculação, entre 12 e 24 horas após a inoculação com rizóbios ou adição de fatores de nodulação (MATHESIUS *et al.*, 1998). No entanto em *Lotus japonicus*, um legume com nodulação determinada, não foi observada a inibição de transportadores de auxinas embora um aumento da expressão de GH3 tenha

sido observado nos primórdios do nódulo, sugerindo que o acúmulo de auxina é necessário para o desenvolvimento inicial do nódulo (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Pelo menos cinco vias de biossíntese de auxina (figura 1) já foram descritas em bactérias: indol-3-acetamida (IAM), indol-3-ácido pirúvico (IPyA), indol-3-acetonitrila (IAN), triptamina (TAM) e oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) (PATTEN; GLICK, 1996; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

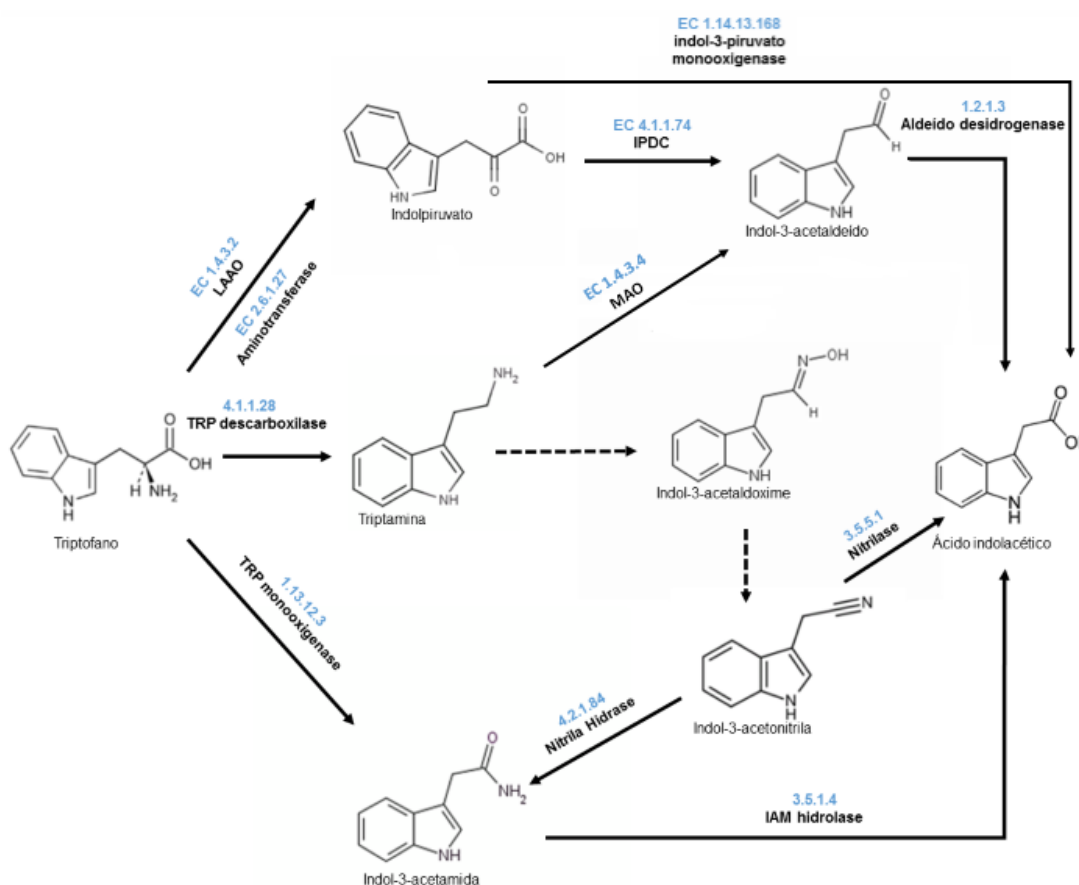


Figura 1- Rotas e enzimas envolvidas na biossíntese de AIA em bactérias.

A via indol-3-acetamida (IAM) é a via mais estudada em bactérias, mas sua ocorrência em *Arabidopsis thaliana* também já foi relatada (POLLMANN *et al.*, 2002). Nesta via, o triptofano é convertido em AIA em dois passos: primeiramente o triptofano é convertido em IAM pela enzima triptofano-2-monooxigenase (IaaM), codificada pelo gene *iaaM*. Em um segundo passo, IAM é convertido em AIA pela enzima IAM hidrolase (IaaH, codificada pelo gene *iaaH*). Os genes *iaaM* e *iaaH* já foram clonados e identificados em

muitas bactérias como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (CLARK *et al.*, 1993; MORRIS, 1995; SEKINE; WATANABE; SYONO, 1989; THEUNIS *et al.*, 2004).

A produção de AIA pela via IPyA já foi descrita em bactérias patogênicas, como *P. agglomerans*, e benéficas como as espécies de *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Rhizobium*, bem como em *Enterobacter cloacae*, e cianobactérias. Nesta rota, o triptofano é convertido em IPyA por uma aminotransferase pelo processo de transaminação, seguido pela descarboxilação do IPyA a indol-3-acetaldeído (IAAld) pela enzima indol-3-ácido pirúvico descarboxilase (IPDC), codificada pelo gene *ipdC*. Na última etapa o IAAld é oxidado em AIA pela IAAld desidrogenase codificada pelo gene *ialdH* (PATTEN; GLICK, 1996; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

Em plantas, o IPyA pode ser convertido diretamente em AIA por uma monooxigenase FMO (YUCCA2) (ZHAO *et al.* 2001) que catalisa a descarboxilação oxidativa do IPyA. Reação semelhante, catalisada pela enzima indolpiruvato:metilviologênica oxidoreductase (IMOR), foi observada na archaeobacteria termoacidofílica *Sulfolobus* sp. estirpe 7. Outro gene relacionado ao metabolismo de IPyA, é o gene IOR, que assim como o gene IMOR, catalisa uma reação de descarboxilação oxidativa, porém faz uso de uma ferredoxina para transformação de IPyA em indol-acetil-CoA. DONATI e colaboradores (2013) relataram uma indução deste gene em *B. japonicum* na presença de AIA, atribuindo a este gene uma função de regulação da produção de AIA, via degradação de IPyA em indol-acetil-CoA. PUYVELDE e colaboradores (2011), sugerem que o gene *ior* poderia realizar a conversão direta de IPyA em AIA, contudo não há evidências experimentais para esta hipótese.

A via triptamina (TAM) tem início com a atividade da enzima triptofano descarboxilase (TDC), codificada pelo gene *tdc*, que converte triptofano em triptamina. Posteriormente, a triptamina é convertida em IAAld, por uma reação de oxidação catalisada pela enzima amina oxidase, que é então, oxidada em AIA (PATTEN; GLICK, 1996). Esta via já foi identificada em *Bacillus cereus* e *Azospirillum* sp. por meio da identificação da atividade TDC e pela conversão de triptamina exógena em AIA, respectivamente (HARTMANN; SINGH; KLINGMÜLLER, 1983; PERLEY, J.; STOWE, 1966).

A biossíntese de AIA pela via indol-3-acetonitrila (IAN) tem sido muito estudada em plantas, mas sua ocorrência em bactérias também tem sido descrita. Nesta via, o mecanismo pelo qual o triptofano é convertido em IAN ainda é pouco conhecido, sendo consideradas para esta conversão, a via dos glucosinolatos indólicos (glucobrassicinas), a via indol-3-acetaldoxina (IAOx) e também uma rota independente de triptofano, através de indol-3-glicerol fosfato ou indol (NONGBRI *et al.*, 2012; BARTLING *et al.*, 1994). Por outro lado, as etapas envolvidas na conversão do IAN já são conhecidas. IAN pode ser convertido em AIA diretamente pela atividade da enzima nitrilase ou indiretamente pela enzima nitrila hidratase que converte IAN em IAM, o qual é posteriormente convertido em AIA pela IAM hidrolase, uma enzima comum à via da IAM. Em *Alcaligenes faecalis*, já foram detectadas produção de indol-3-acetonitrila e em *A. tumefaciens* e *Rhizobium* spp. foi detectada a atividade de nitrila hidratase e amidase, indicando a conversão de IAN para AIA (SEKINE; WATANABE; SYONO, 1989; VEGA-HERNÁNDEZ; LEÓN-BARRIOS; PÉREZ-GALDONA, 2002).

A atividade da enzima oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) só foi descrita em *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Nesta via metabólica, o triptofano é convertido diretamente em IAAlD que posteriormente, é oxidado a AIA (OBERHANSLI; DEFAGO; HAAS, 1991). Contudo, até o momento genes e enzimas envolvidos nesta via permanecem desconhecidos.

O grupo dos rizóbios é conhecido por possuir a capacidade de produzir AIA por diferentes vias metabólicas. Um ortólogo de *iaaH* (gene *bam*) já foi isolado de *B. japonicum*, e a capacidade de sintetizar AIA a partir de um análogo do IAM também foi demonstrada (SEKINE; WATANABE; SYONO, 1989). A presença da via de biossíntese de AIA por intermédio de IPyA e IAAlD, já foi relatada em *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium* spp. (MINAMISAWA *et al.*, 1996; THEUNIS *et al.*, 2004). Em *Sinorhizobium* NGR234 foi relatado que a expressão do locus *y4wEFG*, envolvido na via do IPyA, foi regulada por flavonoides envolvendo a proteína NodD e as regiões *nod-Box* (THEUNIS *et al.*, 2004). A presença de atividade das enzimas nitrila hidratase e amino transferases já foram relatadas em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* spp., sugerindo a biossíntese de AIA por intermédio de indol-3-acetonitrila (PÉREZ-GALDONA *et al.*, 1989; VEGA-HERNÁNDEZ; LEÓN-BARRIOS; PÉREZ-

GALDONA, 2002). Estes estudos mostram que a biossíntese de AIA em rizóbio é complexa podendo envolver diferentes rotas metabólicas. Os mecanismos regulatórios envolvidos nestas vias, contudo, são pouco estudados. Não há relatos dos mecanismos envolvidos na produção de AIA em *R. tropici* e *R. freirei* como citado anteriormente.

3.5. Tecnologias e ferramentas no estudo de vias metabólicas

3.5.1. RT-qPCR

Criada por HEIDI e colaboradores (1996), a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), acompanha o acúmulo do produto de PCR através de uma sonda fluorogênica que é incorporada durante a reação, permitindo assim a quantificação do material inicial através de uma curva padrão da quantidade de fluorescência emitida.

Os métodos mais comuns utilizados para análise de dados de PCR quantitativa em tempo real são os métodos de quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópias inicial do gene de interesse, normalmente relacionando a intensidade do sinal a uma curva padrão. Em estudos onde a determinação do número absoluto de cópias do gene de interesse é desnecessária, é utilizada a quantificação relativa. Nesta, a intensidade é comparada à intensidade de outro gene ou até o mesmo em condições/tempos diferentes, sendo assim relativo ao referencial (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.5.2. InterPro

O InterPro combina modelos preditivos de diversos bancos de dados em um único recurso pesquisável, reduzindo a redundância e ajudando os usuários a interpretar o resultado de suas análises. O mecanismo de busca e classificação faz uso de softwares mais simples como TMHMM (KROGH *et al.*, 2001), SignalP (PETERSEN *et al.*, 2011) e Phobius (KALL; KROGH; SONNHAMMER, 2004) que possuem algoritmos usados para dar a probabilidade de uma característica existir, e outros como Pfam (PUNTA *et al.*, 2011), TIGRFAMs (HAFT *et al.*, 2013), SMART (LETUNIC; DOOKS; BORK, 2012), PIRSF (WU *et al.*, 2004), PANTHER (MI *et al.*, 2013), HAMAP

(PEDRUZZI *et al.*, 2013), PROSITE (SIGRIST *et al.*, 2012), ProDom (BRU *et al.*, 2005), PRINTS (ATTWOOD, *et al.*, 2012), CATH-Gene3D (LEES *et al.*, 2012) e SUPERFAMILY (DE LIMA MORAIS *et al.* 2010) que efetuam buscas mais complexas contra múltiplos modelos usando uma variedade de algoritmos. Ao unificar estes bancos de dados, o InterPro produz uma poderosa ferramenta de diagnóstico e recursos integrados.

3.5.3. *MicroScope*

O MicroScope (VALLENET *et al.*, 2013) é uma plataforma integrada e dedicada à atualização metódica de anotação de genomas microbianos e às análises comparativas. A plataforma fornece dados de projetos genômicos concluídos e em andamento, com anotações automáticas e por especialistas, em conjunto com fontes de dados de experimentos de pós-genômicos (dados de transcriptômica e coleções de mutantes) permitindo que os usuários aperfeiçoem e melhorem suas compreensões das funções dos genes de interesse. O MicroScope ainda combina ferramentas e interfaces gráficas para análise de genomas e para realizar a curagem manual de anotações de genes em um contexto comparativo.

3.5.4. *Cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) e Espectrometria de massa (MS)*

A espectrometria de massa é uma técnica utilizada na identificação e quantificação de compostos químicos presente em uma amostra através da observação da relação massa/carga (m/z) e abundancia de íons. A espectrometria de massa funciona por meio da ionização de compostos químicos, através do bombardeamento com elétrons, para gerar moléculas carregadas ou fragmentadas. Estas moléculas são aceleradas e submetidas a um campo eletromagnético, onde moléculas com diferentes relações massa/carga são defletidas diferentemente e assim, são detectadas separadamente gerando o espectro de massa do composto ou mistura (SPARKMAN, 2000). Para análises de misturas é comum fazer uso de técnicas de separação *in tandem* para aumentar a resolução dos espectros de massa, sendo a cromatografia a gás e líquida as técnicas mais utilizadas em estudos biológicos (MICHOPoulos *et al.*, 2009; SCHAUER *et al.*, 2005). A

cromatografia líquida é uma técnica analítica utilizada para separar os componentes de uma mistura, para identificar e para quantificar cada um dos componentes. Cada componente na amostra interage de forma ligeiramente diferente com o material adsorvente, causando diferentes taxas de fluxo para os diferentes componentes e que leva à separação dos componentes à medida que fluem para fora da coluna (SNYDER *et al.*, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estirpes e condições de cultivo

Para realização dos experimentos foram utilizadas as estirpes de *R. freirei* PRF 81 (SEMIA 4080) e *R. tropici* CIAT 899 (SEMIA 4077), obtidas da coleção de cultura de bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal da Embrapa Soja (CNPSo, Brasil). As culturas foram mantidas em meio de cultivo sólido YM (VINCENT, 1970) com vermelho congo (0,025%) a 28 °C. Para os ensaios de quantificação de auxinas e análise da expressão gênica foi utilizado o meio líquido YM (VINCENT, 1970) com ou sem o aminoácido triptofano. No preparo do pré-inóculo, uma unidade formadora de colônia foi inoculada em 100 mL de meio YM e cultivada sob agitação orbital a 120 RPM e temperatura constante a 28 ± 2 °C por 24 horas. A densidade ótica (DO) foi avaliada por espectrofotometria a 600 nm de absorbância.

4.2. Análise da produção de auxinas pelas estirpes *R. tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81

A produção de auxinas e a determinação de metabólitos intermediários das vias de biossíntese de AIA das culturas de *R. tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81 foram avaliadas pela técnica de colorimetria (Salkowski) e pela análise por cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrofotometria de massa (UPLC-MS).

Para isto, 100 mL de meio YM foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo com a D.O._{600nm} de 0.5 e mantido a 28 ± 2 °C sob agitação orbital de

120 RPM. A produção de auxinas foi avaliada durante o crescimento em meio YM em três experimentos independentes:

- (1) YM com triptofano (100 µg/mL) e YM sem triptofano;
- (2) YM com triptofano (100 µg/mL) e YM com triptofano (100 µg/mL) e flavonóide apigenina (1 µg/mL ou 3,7 µM);
- (3) YM com triptofano (100 µg/mL), YM com triptofano (100 µg/mL) + (NH₄)₃PO₄ (1 g/L) e YM com triptofano (100 µg/mL) + KNO₃ (1 g/L).

4.2.1. *Análise colorimétrica (Salkowski)*

O crescimento e a produção de auxinas foram avaliados durante todo tempo de cultivo a intervalos regulares de 6 horas para o primeiro e segundo experimentos e 12 horas para o terceiro experimento durante 30, 54 e 48 horas respectivamente. A cada intervalo, uma alíquota de 2 mL de cultura foi coletada e a absorbância (D.O._{600nm}) foi avaliada. Após centrifugação a 14000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi misturado com o reagente de Salkowski (GORDON; WEBER, 1951; Anexo) na proporção 1:4 (v/v). Após reação por 30 minutos no escuro, a absorbância foi avaliada a A_{530nm}. Cada experimento foi realizado com três repetições biológicas. Para estimativa da quantidade de auxinas foi construída uma curva de calibração com concentrações de AIA de 1, 2, 10, 20, 40, 60, 80 µg/mL, o qual apresentou um coeficiente de determinação (R²) de 0,99.

4.2.2. *Análise por UPLC-MS*

Os sobrenadantes dos experimentos citados anteriormente foram utilizados para a extração dos metabólitos e análise por UPLC-MS, alíquotas de 20 mL de cada cultura foram coletadas após 24 horas de cultivo e, em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 9000 RPM para obtenção do extrato livre de células (ELC). O ELC foi acidificado com 1 volume de HCl 0,1 M e, em seguida, os metabólitos presentes no sobrenadante foram extraídos empregando o cartucho de extração em fase sólida (SPE) Strata-X® (200 mg/3 mL;

Phenomemex), conforme o seguinte procedimento: o cartucho foi ativado com 10 mL de metanol e equilibrado com 5 mL de HCl 0,05 M. Após o carregamento com 5 mL do ELC acidificado, o cartucho foi lavado com 10 mL de HCl 0,05M e, em seguida, os metabólitos foram eluídos com 3 mL de metanol.

Para análise por UPLC-MS foi utilizado um sistema LC20AD UPLC (Shimadzu, Japão) acoplado com um espectrofotômetro de massa do tipo triplo-quadruplo (Bruker, Alemanha), equipado com uma fonte de ionização tipo ESI, operando no modo de ionização positiva a uma voltagem de spray de 4500V. O extrato de metabólitos foi filtrado em uma membrana de nylon 0,45 μ M e uma alíquota de 10 μ L foi injetado em uma coluna KINETEX 5 μ M EVO C18 (100Å, 100 \times 2,1 mm, Phenomenex). A separação cromatográfica foi realizada a 40 °C, com um fluxo de 0.2 mL/min e uma fase móvel composta do solvente A (0.1% ácido acético em água) e solvente B (metanol), utilizando o seguinte programa: gradiente de 0.01-10 min de 20% a 95% B; 10.0 – 14.0 min de 95% de B, 14.0–15.0 min de 95% a 20% B e 15.0-20.0 min com 20% B.. Padrões dos compostos indólicos triptamina (TAM), ácido-3-indol acético (AIA), ácido-3-indol pirúvico (IPyA), antranilato (ANT), indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrila (IAN), indol-3-etanol (TOL), triptofano (TRP), indol-3-ácido láctico (ILA) foram analisados nas mesmas condições descritas, sendo injetado 10 μ L de cada padrão (20 μ g/mL) e 5 μ L de mistura destes padrões (20 μ g/mL). Para as análises dos espectros de massa, foi utilizado o software Compass DataAnalysis (Bruker) onde buscou-se detectar a presença dos metabólitos pelos valores de relação massa/carga (m/z). Os cromatogramas dos íons foram extraídos para cada valor de relação de massa/carga (m/z) dos padrões de compostos indólicos utilizados e a detecção de compostos, área do pico e sua intensidade foram determinados. As análises comparativas entre as estirpes nos diferentes tratamentos foram feitas com base na área total de cada cromatograma isolado.

4.3. Análise *in silico* dos genes envolvidos em vias de biossíntese de AIA

Para identificação de fases de leitura abertas (ORFs) que possivelmente estivessem relacionadas à biossíntese de AIA, sequências de aminoácidos de

enzimas já identificadas das vias de biossíntese de AIA foram obtidas do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; www.genome.jp/kegg/pathway.html) e utilizadas para análises de similaridade contra o banco de dados de *R. tropici* CIAT 899 (ID: 11072) e *R. freirei* (ID: 30541) PRF 81 (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012), fazendo uso do programa BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Na análise de busca por similaridade, foram preferencialmente utilizadas sequências de proteínas codificadas por genes cuja função tenha sido validada experimentalmente ou manualmente curada em trabalhos anteriores. Quando sequências validadas ou manualmente curadas não foram obtidas optou-se pelo uso das sequências anotadas automaticamente (não curadas) da espécie mais próxima filogeneticamente que apresentasse os mesmos domínios conservados.

As sequências de aminoácidos selecionadas foram comparadas com o banco de dados UNIPROT/SWISSPROT/TremBL (E-value cutoff de 0.0001; matriz de substituição BLOSUM80) e analisadas no software InterProScan (JONES *et al.* 2014) e classificadas de acordo com a presença ou ausência de domínios ou regiões conservadas. Genes que apresentavam uma anotação diferente do que as análises apontavam, foram modelados tridimensionalmente através do software I-TASSER (ZHANG, 2008) e comparados com modelos de proteínas com função já validada experimentalmente, fazendo uso do software CLICK (NGUYEN *et al.*, 2011).

Ainda, as sequências foram analisadas quanto ao seu contexto genômico de forma comparativa com espécies filogeneticamente próximas pela plataforma MicroScope (VALLENET *et al.*, 2012). Características como conservação da organização da região genômica, nível de conservação do gene em espécies próximas e presença ou ausência de elementos transponíveis foram analisados.

As informações geradas pelas análises *in silico* foram utilizadas na seleção de genes de biossíntese de AIA para os ensaios de análise de expressão

4.4. Seleção de iniciadores

Para as análises, sequências nucleotídicas no formato FASTA dos genes de identificados pela análise *in silico* dos genomas de *R. tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81 (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012) foram obtidas do banco de dados do NCBI e utilizadas para desenhar iniciadores específicos através do software Primer3 (UNTERGASSER *et al.*, 2012). As seguintes restrições foram aplicadas: (1) amplicon de tamanho entre 80-200 nt de comprimento; (2) tamanho do primer entre 18-23 nt de comprimento; (3) temperatura de anelamento (T_m) entre 60-63 °C; (4) diferença de T_m entre os primers forward e reverse menor que 2 °C; (5) conteúdo de GC entre 50-60%. Para analisar a qualidade dos primers foi utilizado o software Beacon Designer™ Free Edition (<http://www.premierbiosoft.com/qpcr/>) buscando-se a ocorrência de auto e heterodímeros. Primers que apresentavam pareamento nos últimos 3 ou mais nucleotídeos da extremidade 3' ou um valor de energia livre (ΔG) maior que -3,5 kcal/mol foram descartados. Por fim, as sequências selecionadas foram alinhadas ao genoma do respectivo organismo através do software primer-blast para verificar a especificidade dos iniciadores (THORNTON; BASU, 2011).

4.5. Análise da expressão por RT-qPCR

4.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

A expressão gênica de *R. tropici* CIAT 899 foi analisada sob duas condições experimentais: (1) cultivo em meio YM na presença de triptofano (100 µg/mL) e (2) cultivo em YM sem triptofano. Uma alíquota de 500 µL do pré-inóculo (DO_{600nm} igual a 0,5) foi inoculada em cada frasco contendo 100 mL de meio de cultivo, sendo utilizadas três repetições biológicas por experimento. As células foram cultivadas a 28 °C sob agitação de 120 RPM até atingirem uma DO_{600nm} de aproximadamente 0.5.

Para extração de RNA total, foi utilizado o kit SV Total RNA Isolation System (Promega), segundo as recomendações da fabricante com algumas modificações. A cultura (2 mL) foi centrifugada e o precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de solução contendo lisozima (30 mg/mL). Após

extração, a solução final contendo RNA (100 μ L) foi concentrada em SpeedVac para um volume de (30 μ L).

Para avaliação da pureza e quantificação, a solução contendo RNA foi avaliada por espectrofotometria em nanodrop por meio das relações DO_{230nm}/DO_{280nm} e DO_{230nm}/DO_{260nm} , respectivamente. As amostras também foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% para detecção de RNAm.

Para os extratos que apresentavam sinais de contaminação por DNA genômico, 1 μ g do RNA extraído foi tratado com DNase I (Invitrogen) em um volume final de 10 μ L, segundo recomendações do fabricante. Para a síntese dos cDNA foram utilizados aproximadamente 500 ng dos RNAs tratados, 50 μ M de *primer* randômico e 10 mM de dNTP, incubados por 5 min à 65°C e imediatamente no gelo por 1 minuto. A reação para síntese de DNAc foi preparada com 10X RT *buffer*, 25 mM de $MgCl_2$, 0,1 M de DTT, 40 U/ μ L de RNase Out e 200 U/ μ L de *SuperScript* III RT (Qiagen), segundo recomendações do fabricante.

4.5.2 RT-qPCR

As reações de PCR quantitativa foram realizadas em termociclador ABI 7500 Real Time System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), utilizando-se o Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen- Life Technologies), conforme recomendações do fabricante. Para cada gene estudado, uma curva de eficiência de amplificação foi feita, conforme recomendações da fabricante (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Para gerar esta curva foi feita uma série de diluições do cDNA, sendo a placa do experimento montada em triplicata tanto para o gene alvo quanto para o gene endógeno, o que permitirá verificar a eficiência de amplificação dos primers na reação. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram de 2 min a 50°C, 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Os dados de fluorescência foram coletados neste último passo (fase de extensão). Como referência endógena, em cada tratamento, foi utilizado o gene rRNA 16S (nº de acesso EU488752).

Para o cálculo da expressão relativa foram utilizados os valores médios do Ct (cycle threshold) de cada gene alvo e do gene referência, no tratamento e no controle. As análises estatísticas foram realizadas utilizando programa REST 2009 (Relative Expression Software Tool), com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) (PFAFFL, 2001; PFAFF; HORGAN; PEMPFLE, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de auxinas em função da fase de crescimento

No primeiro experimento buscou-se avaliar a capacidade das estirpes *R. tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81 em produzir auxinas, bem como a influência do triptofano no crescimento. Este experimento permitiu observar que a presença de triptofano na concentração testada não alterou o crescimento de CIAT 899 (Figura 2A), porém em PRF 81 foi possível notar um maior crescimento na presença de TRP após 12 horas de cultivo (Figura 2B). Esse período de indução (12 h de cultivo) coincide com o início da produção de grandes quantidades de AIA em CIAT 899 ($47,34 \mu\text{g/mL}^{-1}$), característica não observada em PRF 81 ($7,63 \mu\text{g/mL}^{-1}$) (Figura 2).

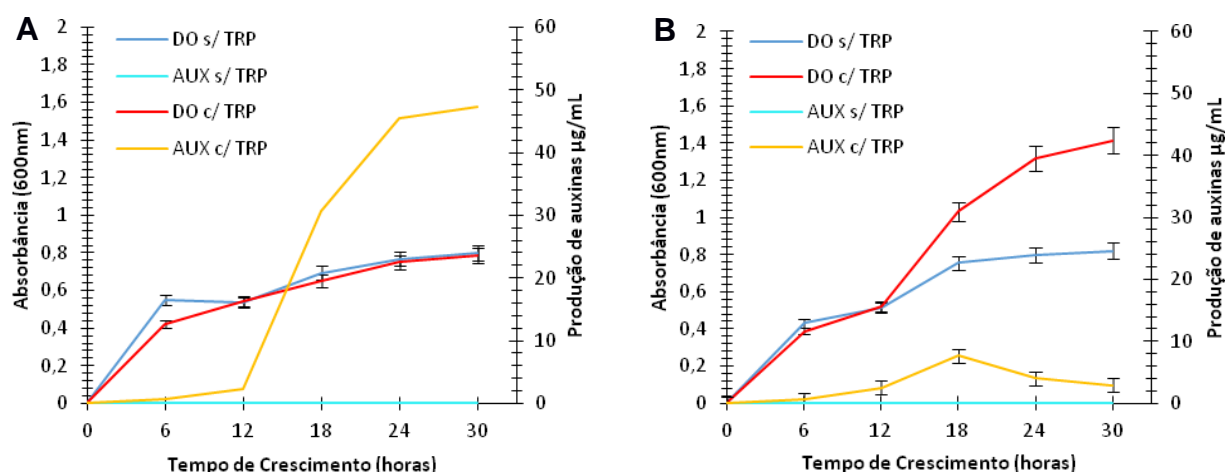


Figura 2 – Efeito do triptofano no crescimento e produção de auxinas em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) na presença de triptofano (TRP) em meio de cultivo YM. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.

O segundo experimento buscou avaliar o efeito do flavonoide apigenina na produção de auxinas pelas estirpes *R. tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81. O flavonoide apigenina apresentou efeito positivo na produção de auxinas somente na estirpe PRF 81 (Figura 3); contudo, os níveis de produção de auxinas em PRF 81 continuaram baixos. Este experimento corroborou com

os dados do primeiro experimento, confirmando assim a discrepância entre as espécies no que diz respeito ao metabolismo de triptofano e produção de auxinas.

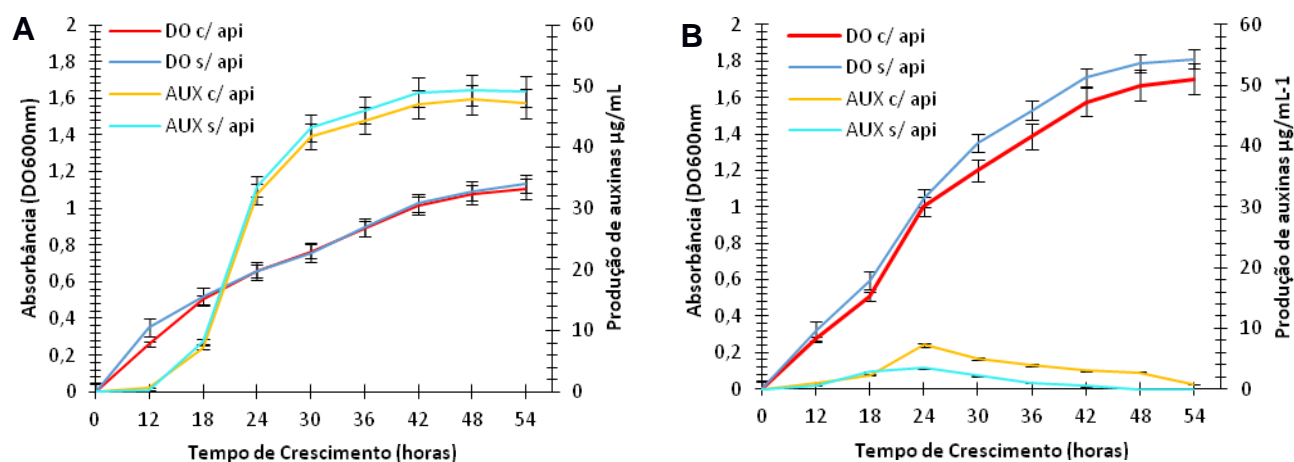


Figura 3 – Efeito da apigenina no crescimento e produção de auxinas em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) na presença de triptofano (TRP) em meio de cultivo YM. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.

No terceiro experimento, foi avaliado o efeito do nitrogênio na produção de auxinas e no crescimento das estirpes. Conforme figura 4, as fontes de nitrogênio testadas tiveram efeitos distintos nas estirpes CIAT 899 e PRF 81. Em meio suplementado com KNO_3 ambas as estirpes tiveram o seu crescimento estimulado, no entanto, a produção de auxinas em CIAT 899 foi estimulada e em PRF 81 reduzida quando comparada ao cultivo sem suplemento de N adicional. A presença de NH_4 no meio de cultivo apresentou efeitos distintos no crescimento das estirpes CIAT 899 e PRF 81, sendo que em CIAT 899 houve um estímulo menor ao tratamento com KNO_3 e em PRF 81 foi notado uma forte inibição de crescimento, contudo ambas as estirpes apresentaram uma forte inibição da síntese de auxinas na presença de NH_4^+ .

Estes resultados indicam que a biossíntese de auxinas nestas bactérias é regulada por amônia. Diversos estudos apontam diferentes respostas na produção de auxinas em rizobactérias utilizando-se diferentes fontes de N. A produção de auxinas em algumas espécies como *P. putida* é induzida na

presença de fontes de N inorgânicas, enquanto em outras como *Rhizobium* spp. a produção de auxinas é inibida na presença dos mesmos. Esta inibição poderia estar relacionada a mecanismos envolvidos no processo de simbiose rizóbio-leguminosa (TANNER; ANDERSON, 1964; BHARUCHA; PATEL; TRIVED, 2013).

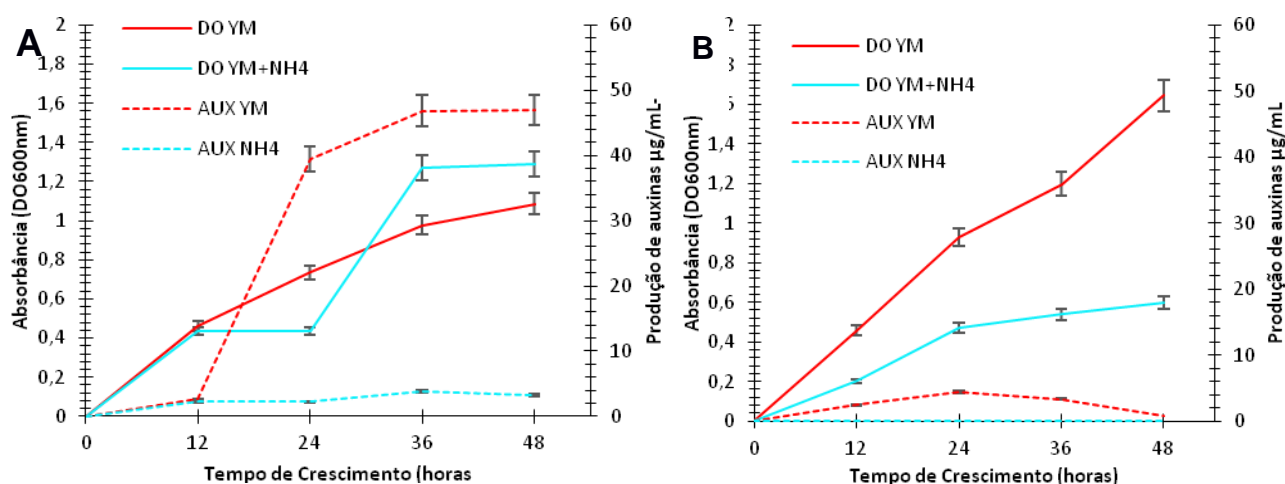


Figura 4 - Efeito do $(\text{NH}_4)_3\text{HPO}_4$ a (1 mg/mL) no crescimento e produção de auxinas em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) na presença de triptofano (TRP) em meio de cultivo YM. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.

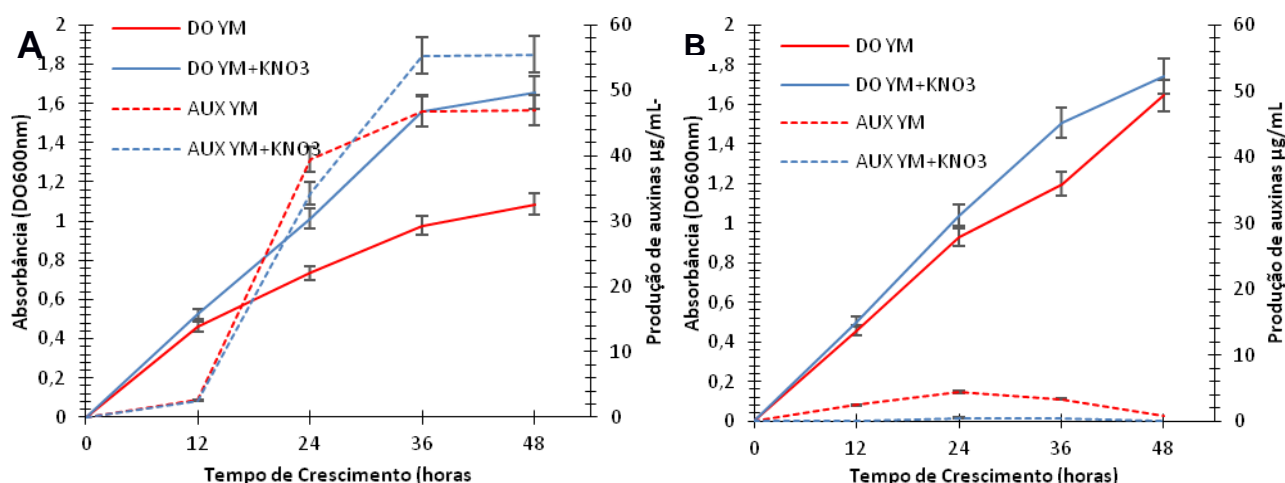


Figura 5 - Efeito do KNO_3 (1 mg/mL) no crescimento e produção de auxinas em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) na presença de triptofano (TRP) em meio de cultivo YM. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.

repetições biológicas \pm desvio padrão.

O papel e a importância da amônia NH_4^+ no processo de simbiose entre rizóbios e suas hospedeiras já foi profundamente estudado e discutido ao longo do tempo. Conforme demonstrado por Patriarca e colaboradores (2002) em uma ampla revisão, o metabolismo de NH_4^+ desempenha um papel chave na simbiose rizóbio-planta, contudo, os efeitos de NH_4^+ na biossíntese de auxina em bactérias não haviam sido analisados até o momento. ZHRAN (1999) demonstrou que quantidades excessivas de N afetam negativamente a capacidade de nodulação através da redução do número de sítios de infecção/número de infecções bem sucedidas nas raízes e pela inibição do crescimento e funcionalidade do nódulo. O NH_4NO_3 inibe fortemente a deformação dos pelos radiculares, iniciação da divisão das células corticais e formação do cordão de infecção (HEIDSTRA *et al.*, 1997). Estes efeitos negativos da NH_4^+ no processo de infecção e desenvolvimento do nódulo já foram atribuídos por DOHERTY e colaboradores (1988) à regulação negativa da síntese de exopolissacarídeos, contudo a regulação negativa de exopolissacarídeos relatada é mais provável estar relacionada à diminuição da relação C/N em função da adição grandes volumes de NH_4^+ como fonte de N, pois conforme demonstrado por vários estudos a proporção de C/N regula fortemente a produção de polissacarídeos (ENGELKES *et al.*, 1997; ROBERSON *et al.*, 1995; MIQUELETO *et al.*, 2010). Estas características (enrolamento dos pelos radiculares, formação do cordão de infecção e na iniciação e diferenciação do nódulo) estão diretamente relacionadas à produção de auxinas (PII; CRIMI; CREMONESE, 2007; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011) que, conforme demonstram os resultados, é fortemente inibida na presença de NH_4^+ assim como, os processos de infecção citados.

5.2. Análises de UPLC-MS

Uma mistura de nove compostos indólicos (TAM, ILA, IAM, TRP, IAN, ANT, AIA, TOL e IPyA), intermediários das vias de biossíntese de auxina e degradação de triptofano, foi utilizada para o desenvolvimento da metodologia

de separação cromatográfica por UPLC e para a obtenção dos respectivos espectros de massa/carga. Cada composto foi também injetado individualmente para confirmação dos resultados (Figura 6)

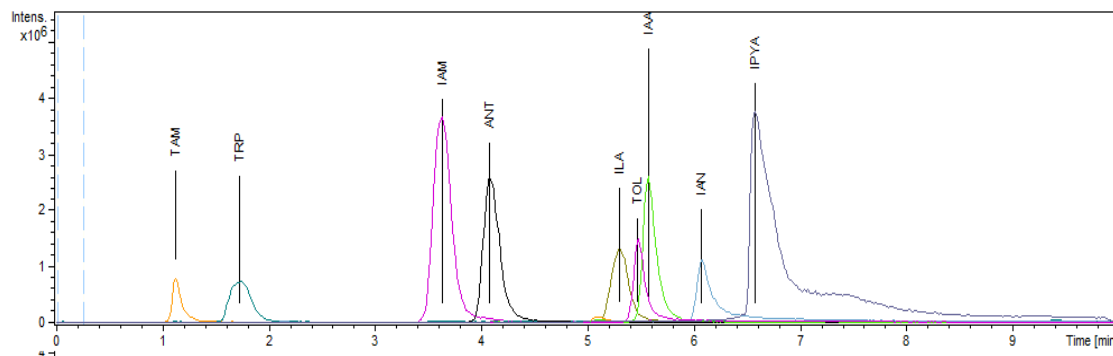


Figura 6 –Cromatograma dos padrões de compostos indólicos triptamina (TAM), indol-3-ácido láctico (ILA), indol-3-acetamida (IAM), triptofano (TRP), indol-3-acetonitrila (IAN), antranilato (ANT), indol-3-ácido acético (AIA), indol-3-etanol (TOL) e indol-3-ácido pirúvico (IPyA).

As análises de UPLC/MS dos extratos metanólicos revelaram diferenças qualitativas e quantitativas no perfil de metabólitos entre as estirpes CIAT 899 e PRF 81, confirmando os resultados obtidos pela análise colorimétrica com o reagente de Salkowski.

No extrato metanólico da estirpe CIAT 899 cultivada na presença de triptofano foram detectados os compostos indólicos ANT, ILA, AIA e IPYA, conforme a análise do tempo de retenção e da relação massa/carga dos padrões (Anexo) e, em buscas no banco de dados (MassBank). O aminoácido TRP utilizado como indutor foi metabolizado pela bactéria, como confirmado pela sua ausência no cromatograma (Figura7A). Interessantemente, o extrato obtido do cultivo de CIAT 899 em meio YM sem adição de triptofano foi possível detectar níveis baixos dos compostos AIA, IPyA e ILA.

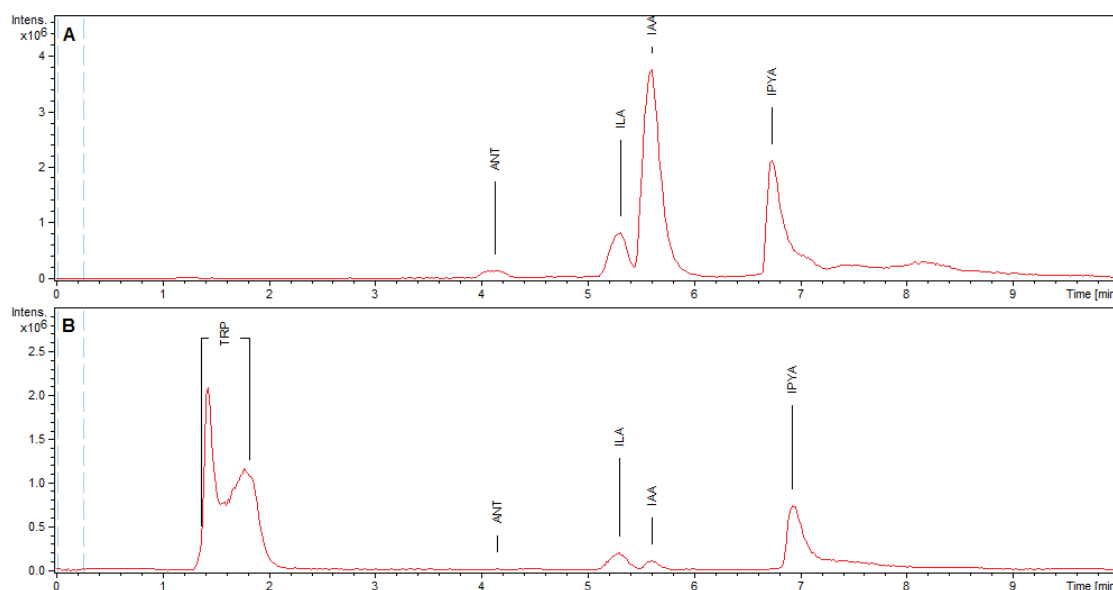


Figura 7 – Perfil metabólico de *Rhizobium tropici* CIAT 899 (A) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (B) obtido do cultivo na presença de triptofano gerado a partir da extração dos valores massa/carga (m/z) dos respectivos compostos.

Por outro lado, as análises de UPLC/MS do extrato metanólico de PRF 81 revelaram que o metabolismo do aminoácido triptofano ocorre de modo mais lento do que aquele observado em CIAT 899. No cromatograma de PRF 81 foram detectados os mesmos compostos (ANT, ILA, IAA e IPyA) encontrados no extrato de CIAT 899; contudo, estes compostos foram detectados em menor quantidade e, mesmo após 24 horas de crescimento, o extrato de PRF 81 continha elevados níveis do aminoácido TRP (Figura 7B).

Com base nestes resultados, é possível inferir que o IPyA é o principal intermediário da via de biossíntese de AIA em *R. tropici* CIAT 899 e *R. freirei* PRF 81, considerando que não foram detectados demais intermediários de outras rotas de biossíntese dependentes de TRP (TAM, IAM, IAN) nos extratos de ambas estirpes. Embora não existam estudos de caracterização de via de biossíntese de AIA em *Rhizobium*, alguns trabalhos com gêneros de vida semelhantes apontam grandes diferenças entre os perfis metabólicos. Theunis e colaboradores (2004) utilizando análises de GC-MS detectaram a presença de todos metabólitos envolvidos nas biossíntese e degradação das 4 vias de biossíntese de auxinas (IPyA, TAM, IAN, IAM, TOL, ILA e IAAld) em *Sinorhizobium* sp. NGR234, contudo a via predominante foi a via do IPyA. Vega-Hernandez e colaboradores (2002) caracterizaram enzimas envolvidas

na produção de AIA via IAM e via IAN por intermédio de IAM em *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76.

Nos tratamentos de *R. tropici* CIAT 899 suplementados com TRP e TRP + KNO³, houve uma redução em relação à biossíntese de compostos indólicos (8,85E+07 e 8,09E+07 respectivamente), contudo o perfil metabólico não apresentou variações. A análise comparativa dos cromatogramas obtido dos diferentes tratamentos de *R. tropici* CIAT 899 confirmou os dados obtidos por colorimetria. Quando cultivada na presença de NH₄⁺ foi observado uma forte redução de aproximadamente 77% na produção de IPyA, ILA e IAA, um acúmulo de triptofano e um aumento de aproximadamente 331% na produção de antranilato (de 1,93E+06 para 6,40E+06) (Figura 8). Em um estudo feito com mutantes de *Sinorhizobium meliloti* por BARSOMIAN e colaboradores (1992) foi observado que estirpes incapazes de sintetizar antranilato, eram incapazes de desenvolver nódulos funcionais, indicando que este composto esteja fortemente envolvido no estabelecimento final da simbiose, provavelmente envolvido no processo de diferenciação em bacteroides. Sendo assim, a alteração dos níveis de antranilato na presença de amônia, um dos principais reguladores da etapa final da simbiose rizóbio-legumina, se faz coerente.

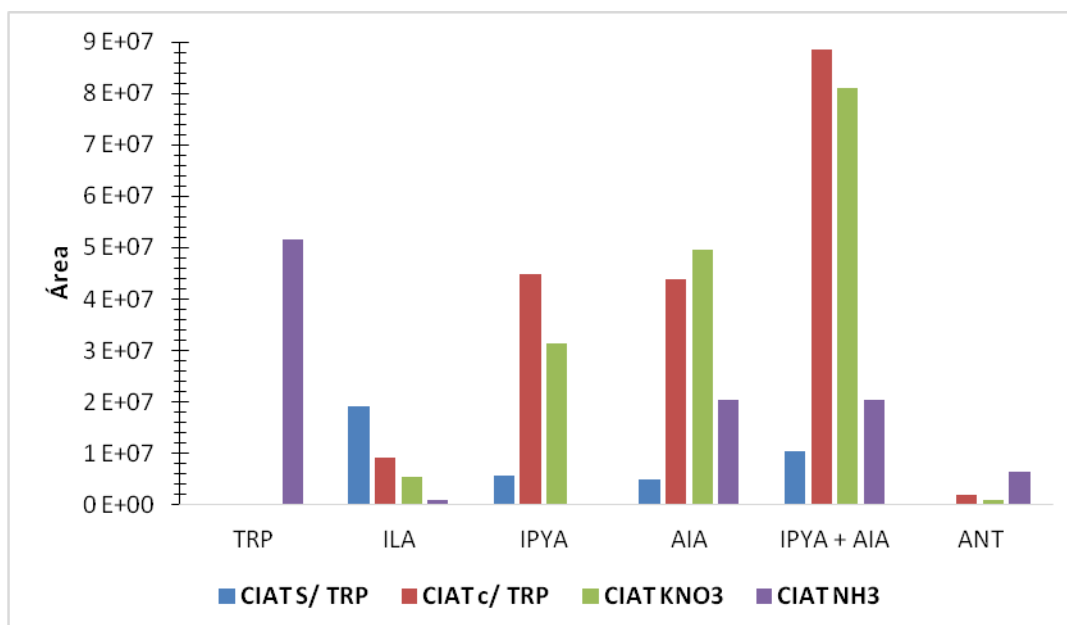


Figura 8 – Efeito de diferentes fontes de N no perfil metabólico de *Rhizobium tropici* CIAT 899 cultivado na presença triptofano.

Em *R. freirei*, assim como em *R. tropici* houve redução na biossíntese de AIA entre os tratamentos com TRP e TRP + KNO₃, em contraste com os ensaios colorimétricos em que não foi possível observar a presença de compostos indólicos no tratamento TRP + KNO₃. Nas análises de espectrometria de massa foi possível detectar estes compostos em função da maior sensibilidade do método. No tratamento TRP + NH₄⁺ não foi possível observar a presença de compostos indólicos, provavelmente devido à forte inibição na biossíntese de AIA como observado em *R. tropici* (Figura 9).

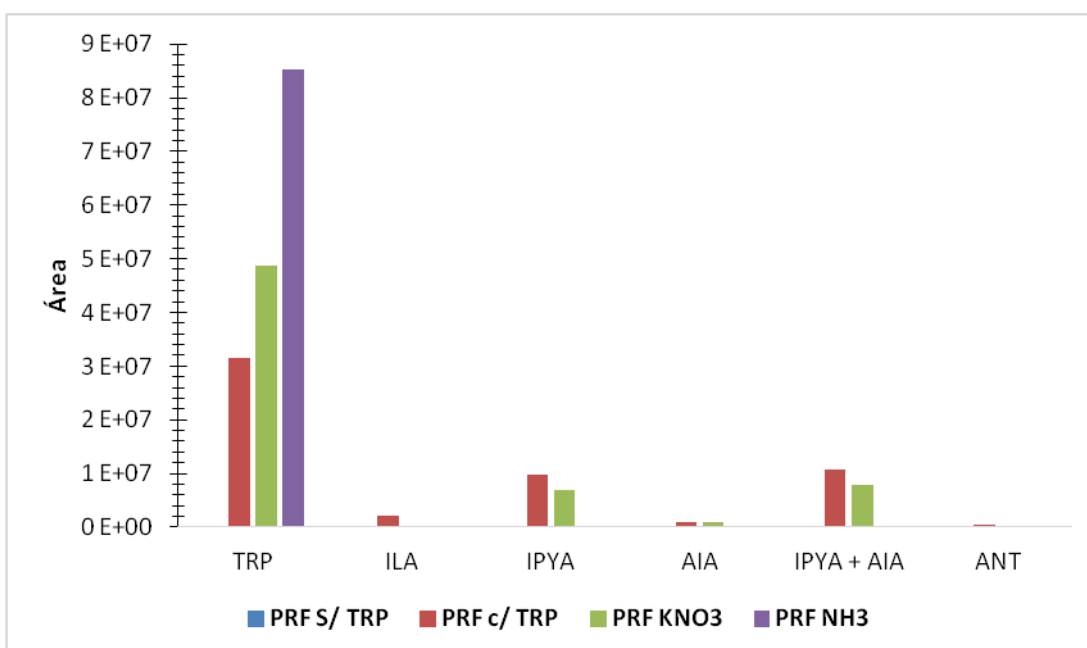


Figura 9 – Efeito de diferentes fontes de N no perfil metabólico de *Rhizobium freirei* PRF 81 na presença de triptofano.

Em relação à rota metabólica de biossíntese de AIA entre *R. tropici* e *R. freirei* não foi possível perceber diferenças. Ambas as espécies produzem AIA via IPyA, contudo, como observado nos ensaios colorimétricos, *R. freirei* produz uma quantidade muito menor de compostos indólicos do que *R. tropici* (Figura 8 e 9) esta diferença no perfil metabólico sugere mecanismos diferentes de regulação e/ou diferenças na eficiência na atividade das enzimas.

5.3. Identificação de genes envolvidos na biossíntese de AIA

Os genomas de *R. tropici* CIAT 899 (ID: 11072) e *R. freirei* PRF 81 (ID: 30541) foram analisados com ferramentas de bioinformática para determinação dos

possíveis genes envolvidos nas vias de biossíntese de AIA nestas bactérias. Embora as estirpes CIAT 899 e PRF 81 apresentem fenótipos discrepantes quanto a produção de auxinas, como evidenciado pelos resultados de colorimetria e UPLC-MS. Os resultados anteriormente apresentados sugerem fortemente que ambas produzem AIA pela via do IPyA, sendo a CIAT 899 mais eficiente na produção de AIA que a estirpe PRF 81, nas condições testadas.

Para determinar se há diferenças genômicas que expliquem os fenótipos observados foram realizadas análises comparativas *in silico* de genes envolvidos na via do IPyA dos genomas de CIAT 899 e PRF 81.

5.3.1. Análise genômica de genes envolvidos na via Indolpiruvato (IpyA)

A via IPyA é a principal rota de biossíntese encontrada em plantas, e também em diversas bactérias fitopatogênicas e BPCV como *Pseudomonas agglomerans*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter cloacae* entre outras (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). Nesta via, o triptofano pode ser metabolizado por uma aminotransferase (TAA, EC 2.6.1.27) ou uma L-aminoácido oxidase (LAO, EC 1.4.3.2) produzindo o indolpiruvato, que então, pode ser convertido em indolacetaldeído pela enzima-chave indolpiruvato descarboxilase (IPDC, EC 4.1.1.74), codificada pelo gene *ipdC* (PRINSEN *et al.*, 1993). O indolacetaldeído é finalmente convertido em AIA por uma aldeído desidrogenase (EC 1.2.3.7).

A análise *in silico* permitiu identificar no genoma de *R. tropici* e *R. freirei* diferentes ORFs com similaridade a genes da rota do IPyA de outras bactérias. A predição da função destes genes foi feita com base na análise da sequência de aminoácidos (Tabela 1).

Tabela 1 – Genes e enzimas codificadas em *R. tropici* e *R. freirei* potencialmente envolvidas na síntese de AIA.

<i>R. tropici</i>	<i>R. freirei</i>	Enzima	EC number
RTCIAT899_PB01965	RHSP_04391	L-aminoacido oxidase	1.4.3.2
RTCIAT899_PB00575	RHSP_08237	Histidinol aminotransferase (y4we)	2.6.1.27
RTCIAT899_PB00570	RHSP_08244	Indole-3-acetaldeido oxidase (y4wf)	1.2.3.7
RTCIAT899_CH14220	RHSP_24897	Indolpiruvato ferredoxin oxidoreductase	1.2.7.8

O gene-chave da via do IPyA, o *ipdC* é um dos genes mais estudados em bactérias. MALHOTRA e ORIVASTAVA (2008) nocautearam o gene *ipdC* de *Azospirillum brasilense* SM, que resultou um decréscimo de 50% na produção de AIA e de indol-3-acetaldeído bem como, uma redução de 50% na atividade da enzima Indol-piruvato descarboxilase. Contudo, os genomas de *R. tropici* e *R. freirei* não apresentaram nenhuma proteína com identidade considerável com IPDCs já caracterizadas de *A. brasilense* (MALHOTRA; SRIVASTAVA, 2008) e *E. cloacae* (KOGA *et al.*, 1991)

Foi identificado em ambos os genomas uma amino oxidase ([RTCIAT899_PB01965](#) e [RHSP_04391](#)) semelhante à L-aminoácido oxidase (LAO) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* ([GDI_2456](#), 54% de identidade e 97% de cobertura) e de *Rhodococcus opacus* (EHI40684, 33% de identidade e 98% de cobertura). Adjacente a este gene encontra-se um citocromo C, como observado no genoma de *G. diazotrophicus* (Figura 10).

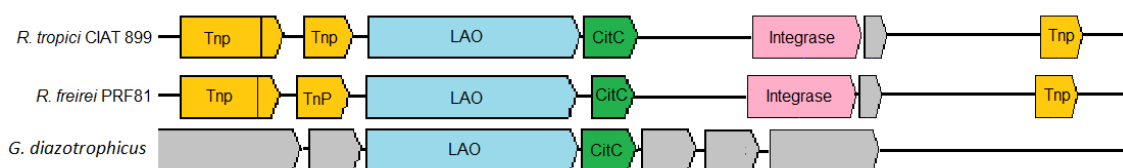


Figura 10 – Contexto genômico da L-aminoácido oxidase de *Rhizobium tropici* CIAT 899, *Rhizobium freirei* PRF 81 e *G. diazotrophicus* PA1 5. Legenda: Laranja – Transposon, azul – L-aminoácido oxidase e verde – Citocromo C.

Este gene estava anotado como uma possível triptofano 2-monooxigenase devido ao domínio conservado PF01593 (flavin containing amine oxidoreductase) que possui. Contudo, as estruturas de modelos tridimensionais foram comparadas e apresentaram uma sobreposição >90% (Figura 11), sugerindo sua função como uma LAO. O nocaute deste gene em

G. diazotrophicus reduziu em 95% a produção de auxinas e resultou no acúmulo de triptofano no meio de cultivo (RODRIGUES, 2008).



Figura 11 - Sobreposição dos modelos tridimensionais da LAO encontrada em *Rhizobium tropici* CIAT 899 (roxo) com o modelo da LAO de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (branco).

Adicionalmente, os genes *y4we* e *y4wf*, relatados por THEUNIS e colaboradores (2004) como genes envolvidos na produção de AIA via IPyA em *Sinorhizobium* sp NGR234, foram encontrados no genoma de ambas as estirpes e apresentaram a mesma organização genômica da estirpe NGR234 (Figura 12). Em *Sinorhizobium* NGR234, estes genes são regulados por flavonoides (THEUNIS *et al.*, 2004).

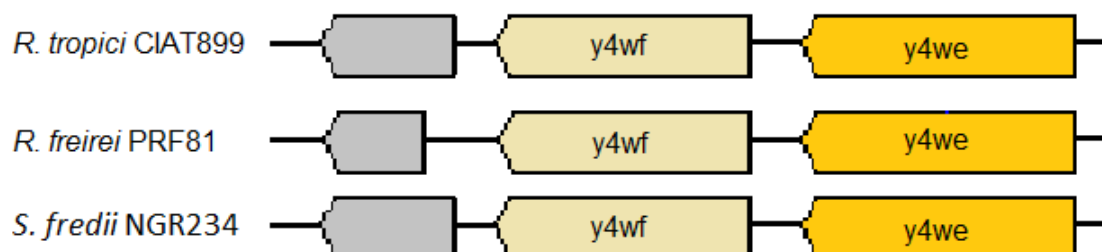


Figura 12 – Contexto genômico dos genes *y4we* e *y4wf* de *Rhizobium tropici* CIAT 899, *Rhizobium freirei* PRF 81 e *S. fredii* NGR234. Legenda: Cinza – proteínas hipotéticas, bege – Indole-3-acetaldehyde oxidase e laranja –

histidinol aminotransferase.

Nos genomas de CIAT 899 e PRF 81 também foram identificados dois genes contíguos (*iorA* e *iorB*), que codificam subunidades da enzima indolpiruvato ferredoxina oxidoreductase (IOR, EC 1.2.7.8). Esta proteína atua no metabolismo de AIA catalisando a conversão do IPyA em indol-3-acetil-CoA. Estudos anteriores reportaram a indução da expressão dos genes *iorA* e *iorB* por AIA (DONATI *et al.* 2013).

Embora ainda não tenha sido descrito a ocorrência da conversão direta de IPyA em AIA em bactérias (exceto em Archaea), *R. tropici* e *R. freirei* apresentam genes com os mesmos domínios encontrados no gene YUC2 que codifica a monooxigenase FMO (YUCCA2) de *Arabidopsis thaliana*, assim como genes com sequência de aminoácidos similar a proteína indolpiruvato:metilviologênica oxidoreductase (IMOR) de *Sulfolobus* sp 7, proteínas que tem função validade na conversão direta de IPYA em AIA.

5.3.2. Análise expressão (RT-qPCR)

Com base nas análises *in silico* e nos resultados de UPLC/MS, foram selecionados para a análise de RT-qPCR os genes *lao* (RTCIAT899_PB01965), *yw4E* (RTCIAT899_PB00575) e *iorA* (RTCIAT899_CH14220) (Tabela 1 e 2), por apresentarem uma alta cobertura e identidade com genes cuja atividades relacionadas a biossíntese de AIA via IPyA já foram validadas experimentalmente.

Tabela 2 – Sequências dos iniciadores utilizados nas análises de expressão por RT-qPCR.

Gene	Sequência	Tamanho amplicon
<i>Lao</i>	F 5' CCGCTGAGCCTTTCCGAAAT 3' R 5' GGTCGTCCACTTCCTTGCTG 3'	145 bp
<i>iorA</i>	F 5' CCTGCTTGGTGGTGCTTACA 3' R 5' GGATAGGCGACGTTGAGGAC 3'	111 bp
<i>y4wE</i>	F 5' TGGGGCTAATCTACAGGGCT 3' F 5' GGCTAGTTTGCGGTTGAACG 3'	86 bp
16S	F 5' CAAGGCGACGATCCATAGCT 3' F 5' AGGAGTTTGGGCCGTGTCT 3'	74 bp

Os genes *lao*, *y4wE* e *iorA* de CIAT 899 foram regulados positivamente na presença de triptofano por um fator de 1,33x, 1,45x e 2,21x, respectivamente (Figura 13 e Tabela 3).

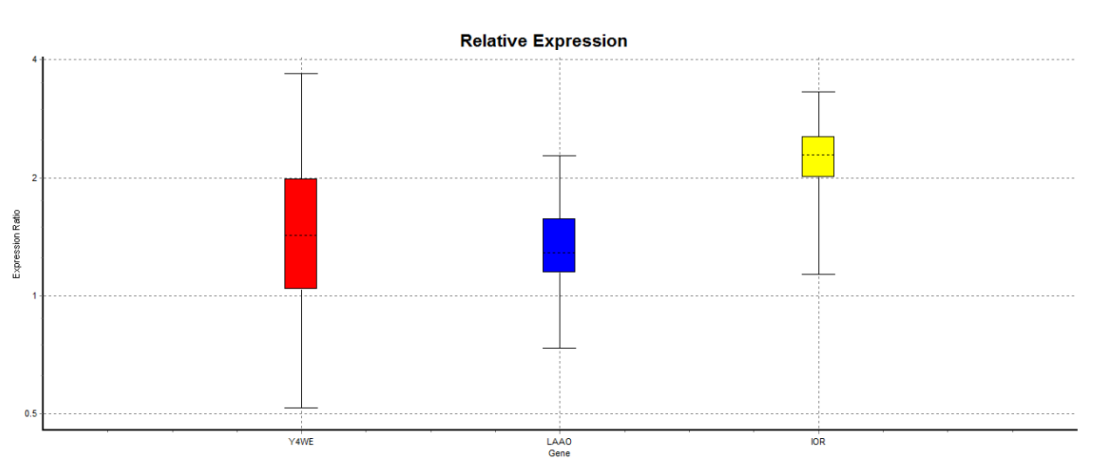


Figura 13 – Níveis de expressão dos genes relacionados à biossíntese de AIA via IPyA em *R. tropici* CIAT 899 após crescimento para fase exponencial (DO_{600nm} 0.5) na presença de triptofano. A expressão relativa foi determinada pelo software REST2009. Dados representam a média de três repetições biológicas \pm desvio padrão.

Tabela 3 – Análise estatística resultante da avaliação da expressão dos genes relacionados a biossíntese de AIA via IPyA em *R. tropici* CIAT 899 após

crescimento para fase exponencial (DO_{600nm} 0.5) na presença de triptofano. As análises estatísticas foram determinadas pelo software REST2009, utilizando 3 replicatas biológicas com 3 replicatas técnicas cada.

Genes	Tipo	Eficiência de Reação	Expressão Relativa	Desv. Padrão	95% C.I.	P-valor(H_1)	Resultado
16S	REF	0,93	1				
Y4WE	ALVO	0,9	1,453	0.901 - 2.546	0.615 - 3.397	0,008	UP
LAAO	ALVO	0,9	1,331	1.063 - 1.759	0.790 - 2.111	0,001	UP
IOR	ALVO	0,93	2,211	1.810 - 2.706	1.327 - 3.058	0,000	UP

Y4WE é regulado positivamente no grupo amostral (em comparação ao grupo controle) por um fator de 1.453.

O grupo amostral Y4WE é diferente do grupo controle. $P(H_1)=0.008$

LAAO é regulado positivamente no grupo amostral (em comparação ao grupo controle) por um fator de 1.331.

O grupo amostral LAAO é diferente do grupo controle. $P(H_1)=0.001$

IOR é regulado positivamente no grupo amostral (em comparação ao grupo controle) por um fator de 2.211.

O grupo amostral IOR é diferente do grupo controle $P(H_1)=0.000$

A indução destes genes pelo precursor da biossíntese de AIA, o triptofano, é um importante dado que aponta uma possível função destes no metabolismo deste aminoácido, e seu papel na biossíntese de AIA em *R. tropici* CIAT 899.

As análises *in silico* de CIAT 899 e PRF 81 não revelaram diferenças em algum possível gene da biossíntese de auxina pela via do IPyA, como a ausência de algum gene ou alterações de contexto genômico em uma das espécies que pudessem explicar a diferença de produção de AIA observada pelos resultados de colorimetria e UPLC-MS (Figuras 10 e 12). A realização futura da análise por RT-qPCR destes genes na estirpe PRF 81 poderá auxiliar no entendimento da biossíntese de AIA nesta bactéria.

O acúmulo do aminoácido triptofano no meio de cultivo, como observado nas análises UPLC/MS do extrato de PRF 81, sugerem que a diferença na produção de auxinas pode estar associada às diferenças no processo de captação de triptofano exógeno e não diretamente nos genes da via de biossíntese de auxina. Partindo desta hipótese, foram feitas buscas por genes relacionados à captação de triptofano, seguindo a mesma metodologia aplicada para os genes relacionados à biossíntese de AIA. Os genes *mtr*, *TnaB* e *aroP*

de *Escherichia coli* codificam proteínas transportadoras responsáveis pela captação de triptofano exógeno, sendo os dois primeiros genes específicos para captação de triptofano e o último para captação de aminoácidos aromáticos (ZHAO *et al.*, 2012). Em *R. tropici* e *R. freirei* não foi encontrada nenhuma proteína com domínios conservados iguais aos produtos dos genes *mtr* e *TnaB*, no entanto é possível encontrar duas proteínas em *R. tropici* (RTCIAT899_PB01115 e RTCIAT899_PC03520) e uma em *R. freirei* (RHSP_04018) com 40% de identidade e o mesmo domínio SLC12A encontrado no produto do gene *aroP* de *E. coli*. Os modelos tridimensionais destes genes encontrados apresentam sobreposição maior que 95% quando sobrepostos ao modelo tridimensional de *E. coli* (Figura 14). É possível que a existência de dois transportadores em *R. tropici* e apenas um em *R. freirei* esteja relacionado a diferença de fenótipo observada entre estas estirpes. Estudos futuros são necessários, portanto, para esclarecer estas diferenças entre as duas estirpes.

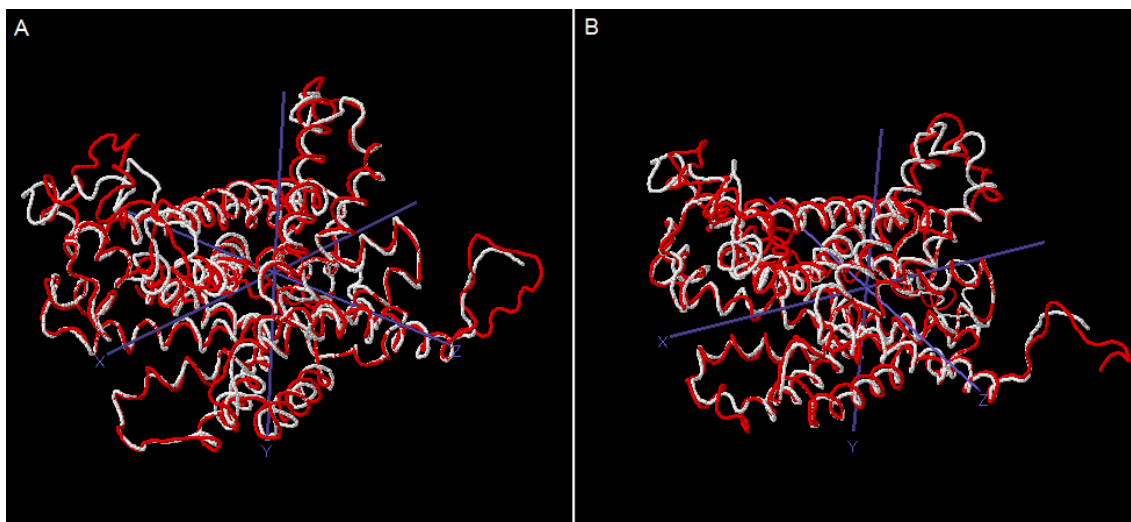


Figura 14 – Sobreposição dos modelos tridimensionais dos transportadores encontrados em *R. tropici* RTCIAT 899_PB01115 (A) e RTCIAT 899_PC03520 (B) (Vermelho) com o modelo do transportador *aroP* de *E. coli* (branco)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A amônia, é o principal regulador das etapas finais de simbiose, neste trabalho demonstramos que a biossíntese de AIA é reduzida em resposta a este composto, assim como relatado por outros estudos que apontam uma queda no nível de produção de AIA no processo final de diferenciação dos nódulos. O AIA desempenha importante função nas etapas finais de nodulação, mas também desempenha principalmente funções nas etapas iniciais do processo de nodulação. Tendo isto em mente experimentos futuros poderão ser realizados com reguladores dos processos iniciais de nodulação, como flavonoides e exsudatos radiculares, visando fornecer o outro lado dos mecanismos de regulação da produção de AIA e sua importância no processo de nodulação. Ainda, com a finalidade de determinar o impacto da produção de AIA no processo de nodulação, ensaios biológicos de nodulação poderão ser feitos futuramente.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que *R. tropici* e *R. freirei*, espécies filogeneticamente muito próximas, possuem um fenótipo contrastante em relação a biossíntese de auxinas. *R. tropici* apresenta uma capacidade de produção muito maior de produção de auxinas, chegando a produzir dez vezes mais que *R. freirei* quando comparados em seus respectivos picos de produção nas condições testadas neste trabalho. Contudo, a rota de biossíntese nas duas espécies é a mesma e ambas produzem AIA por meio de IPyA como evidenciado nas análises de UPLC-MS. Ainda, a forte inibição da produção de auxinas na presença de NH_4^+ , principal regulador das etapas finais de simbiose, e baixa inibição na presença de KNO_3^- reforçam a importância deste fitormônio no processo de simbiose. Os genes *LAO* e o *y4we*, genes que codificam proteínas relacionadas com a conversão de TRP em IPyA, foram induzidos na presença de triptofano, precursor e indutor da produção de AIA, e reforçam e corroboram com os dados obtidos por UPLC-MS apontando a via do IPyA como a principal via de biossíntese de AIA em *R. tropici* e *R. freirei*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
2. AMARGER, Noëlle; MACHERET, Valérie; LAGUERRE, Gisèle. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 996-1006, 1997.
3. ATTWOOD, Teresa K. *et al.* The PRINTS database: a fine-grained protein sequence annotation and analysis resource—its status in 2012. **Database**, v. 2012, p. bas019, 2012.
4. ASHELFORD, Kevin E.; DAY, Martin J.; FRY, John C. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 285-289, 2003.
5. BARTLING, Dieter *et al.* Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 13, p. 6021-6025, 1994.
6. BARTSEV, Alexander V. *et al.* NopL, an effector protein of *Rhizobium sp.* NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. **Plant Physiology**, v. 134, n. 2, p. 871-879, 2004.
7. BARSOMIAN, G. D. *et al.* *Rhizobium meliloti* mutants unable to synthesize anthranilate display a novel symbiotic phenotype. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4416-4426, 1992.
8. BHARUCHA, Umang; PATEL, Kamlesh; TRIVEDI, Ujjval B. Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). **Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 215-221, 2013.
9. BEATTIE, G. A. Plant-associated: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: GNANAMANICKAM, S. S. **Plant-Associated Bacteria**. 1. ed. Dordrecht: Springer, p. 1-56, 2007.
10. BERINGER, J. E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of general microbiology**, v. 84, n. 1, p. 188-198, 1974.

11. BOLANOS-VASQUEZ, M. C.; WERNER, D. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on *nod* gene-inducing flavonoids in root exudate of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI (USA)**, 1997.
12. BOOT, Kees JM *et al.* Lipochitin oligosaccharides from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* reduce auxin transport capacity in *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 12, n. 10, p. 839-844, 1999.
13. BRASIL. Companhia Nacional do Abastecimento. **Análise conjuntural de 2015**. 2013. <http://www.conab.gov.br/>.
14. BRU, Catherine *et al.* The ProDom database of protein domain families: more emphasis on 3D. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl 1, p. D212-D215, 2005.
15. BRUNINGS, Asha M.; GABRIEL, Dean W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.
16. CHAMPION, Antony *et al.* Inhibition of auxin signaling in *Frankia*-infected cells in *Casuarina glauca* nodules leads to increased nodulation. **Plant physiology**, p. pp. 114.255307, 2015.
17. CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988.
18. CHUEIRE, LM de O. *et al.* Classificacao taxonomica, baseada na caracterizacao molecular, das estirpes de rizobio recomendadas para a culturas da soja e do feijoeiro. **Embrapa Soja. Boletim de Pesquisa**, 2000.
19. CHURCH, Deanna M. *et al.* Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. **PLoS biology**, v. 7, n. 5, p. e1000112, 2009.
20. CLARK, Ellen *et al.* Cloning and characterization of *iaaM* and *iaaH* from *Erwinia herbicola* pathovar *gypsophila*. **Phytopathology**, v. 83, n. 2, p. 234-240, 1993.
21. COOPER, J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1355-1365, 2007.
22. DALL'AGNOL, Rebeca Fuzinatto *et al.* *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International journal**

- of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt 11, p. 4167-4173, 2013.
23. DARDANELLI, Marta Susana et al. Changes in flavonoids secreted by *Phaseolus vulgaris* roots in the presence of salt and the plant growth-promoting rhizobacterium *Chryseobacterium balustinum*. **Applied Soil Ecology**, v. 57, p. 31-38, 2012.
24. DE-BASHAN, Luz E.; HERNANDEZ, Juan-Pablo; BASHAN, Yoav. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 171-189, 2012.
25. DE LUCA, Vincenzo; MARINEAU, Claude; BRISSON, Normand. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 8, p. 2582-2586, 1989.
26. DENARIE, Jean et al. *Rhizobium* and legume nodulation: A molecular dialogue. In: **New horizons in nitrogen fixation**. Springer Netherlands, 1993. p. 19-30.
27. DENISON, R. Ford. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. **The American Naturalist**, v. 156, n. 6, p. 567-576, 2000.
28. DENISON, R. Ford; KIERS, E. Toby. Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic?. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 13, p. 1235-1239, 2004.
29. DING, Yiliang; OLDROYD, Giles ED. Positioning the nodule, the hormone dictum. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 2, p. 89-93, 2009.
30. DOHERTY, D. et al. *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 9, p. 4249-4256, 1988.
31. DONATI, Andrew J. et al. Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76559, 2013.
32. DRAUZ, Karlheinz; WALDMANN, Herbert (Ed.). **Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive handbook**. John Wiley & Sons, 1995.
33. DUCA, Daiana et al. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85-125, 2014.

34. ENGELKES, C. A.; NUCLO, R. L.; FRAVEL, D. R. Effect of carbon, nitrogen, and C: N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. **Phytopathology**, v. 87, n. 5, p. 500-505, 1997.
35. ERNSTSEN, A. *et al.* Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*. **Planta**, v. 171, n. 3, p. 422-428, 1987.
36. ESTÉVEZ, Jana *et al.* Different and new *Nod* factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899 following Na⁺ stress. **FEMS microbiology letters**, v. 293, n. 2, p. 220-231, 2009.
37. FARRELL JR, R. E. **RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization**, 2 ed. Academic Press, San Diego, p. 533, 1998.
38. FERGUSON, Brett J. *et al.* Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 61-76, 2010.
39. FERGUSON, Stuart J. Nitrogen cycle enzymology. **Current opinion in chemical biology**, v. 2, n. 2, p. 182-193, 1998.
40. FIGUEIREDO, M. V. B. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1187-1193, 2008.
41. FISHER, Robert F.; LONG, Sharon R. Interactions of NodD at the *nod* box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. **Journal of molecular biology**, v. 233, n. 3, p. 336-348, 1993.
42. FOLEY, Jonathan A. *et al.* Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v. 478, n. 7369, p. 337-342, 2011.
43. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED STATES. 2013.
44. GAGNON, Hubert; IBRAHIM, Ragai K. Aldonic acids: a novel family of *nod* gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 11, n. 10, p. 988-998, 1998.
45. GODDIJN, Oscar JM *et al.* Overexpression of a tryptophan decarboxylase cDNA in *Catharanthus roseus* crown gall calluses results in increased tryptamine levels but not in increased terpenoid indole alkaloid production. **Transgenic research**, v. 4, n. 5, p. 315-323, 1995.

46. GORDON, Solon A.; WEBER, Robert P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192, 1951.
47. GRUNEWALD, Wim *et al.* Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. **The Plant Cell Online**, v. 21, n. 9, p. 2553-2562, 2009.
48. GUASCH-VIDAL, B. *et al.* High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT 899 in the absence of flavonoid inducers. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 4, p. 451-460, 2013.
49. HAFT, Daniel H. *et al.* TIGRFAMs and genome properties in 2013. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D387-D395, 2013.
50. HARTMANN, A.; SINGH, Mahavir; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 916-923, 1983.
51. HASSAN, Samira; MATHESIUS, Ulrike. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 9, p. 3429-3444, 2012.
52. HEID, Christian A. *et al.* Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
53. HEIDSTRA, Renze *et al.* *Nod* factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH₄NO₃ inhibition on root hair deformation. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 10, n. 2, p. 215-220, 1997.
54. HIRSCH, A. Plant-microbe symbioses: a continuum from commensalism to parasitism. **Symbiosis**, v. 37, 2004.
55. HOWDEN, A. J. M. *et al.* *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a hydrolyses indole-3-acetonitrile to the plant hormone indole-3-acetic acid. **Molecular plant pathology**, v. 10, n. 6, p. 857–65, nov. 2009.
56. HUNGRIA, M. *et al.* Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, 2000.
57. HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, n. 2, p. 88–93, 1 dez. 2003.

58. IGARASHI, R. Y. Nitrogen Fixation: The Mechanism of the Mo-Dependent Nitrogenase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 351–384, 2003.
59. BRASIL, Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. 2011. <http://www.ibge.gov.br/>.
60. BRASIL, Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística 2013. <http://www.ibge.gov.br/>.
61. JAMESON, P. E. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. **Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2-3, p. 369-380, 2000.
62. JONES, Kathryn M. et al. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 8, p. 619-633, 2007.
63. JONES, Philip et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236-1240, 2014.
64. JORDAN, D. C. NOTES: transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.
65. KHALID, Azeem et al. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. **Soil Research**, v. 42, n. 8, p. 921-926, 2005.
66. KÄLL, Lukas; KROGH, Anders; SONNHAMMER, Erik LL. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **Journal of molecular biology**, v. 338, n. 5, p. 1027-1036, 2004.
67. KATO, Yasuo et al. Novel heme-containing lyase, phenylacetaldoxime dehydratase from *Bacillus* sp. strain OxB-1: purification, characterization, and molecular cloning of the gene. **Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 800-809, 2000.
68. KLOEPPER, Joseph W. et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, n. 5776, p. 885-886, 1980.
69. KOBAYASHI, Hajime et al. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular microbiology**, v. 51, n. 2, p. 335-347, 2004.

70. KOBAYASHI, Michihiko *et al.* Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 3, p. 714-718, 1995.
71. KOGA, Jinichiro; ADACHI, Takashi; HIDAKA, Hidemasa. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 226, n. 1-2, p. 10-16, 1991.
72. KRISHNAN, H. B.; BENNETT, J.O. *Rhizobium*-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation In: GNANAMANICKAM, S. S. **Plant-Associated Bacteria**. 1. ed. Dordrecht: Springer, p. 57-194, 2007
73. KROGH, Anders *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.
74. KUYKENDALL, L. D. *et al.* Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 501-505, 1992.
75. LAGUERRE, Gisele *et al.* Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2029-2036, 1996.
76. LEES, Jonathan *et al.* Gene3D: a domain-based resource for comparative genomics, functional annotation and protein network analysis. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D465-D471, 2012.
77. LETUNIC, Ivica; DOERKS, Tobias; BORK, Peer. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D302-D305, 2012.
78. LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
79. MALHOTRA, Mandira; SRIVASTAVA, Sheela. An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid

- biosynthesis and plant growth promotion. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 4, p. 425-433, 2008.
80. MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza *et al.* *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp.* trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 3, p. 417-426, 1991.
81. MATHESIUS, Ulrike. Goldacre paper: Auxin: at the root of nodule development?. **Functional Plant Biology**, v. 35, n. 8, p. 651-668, 2008.
82. MATHESIUS, Ulrike *et al.* 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.
83. MI, Huaiyu; MURUGANUJAN, Anushya; THOMAS, Paul D. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D377-D386, 2013.
84. MICHOPoulos, Filippou *et al.* UPLC-MS-based analysis of human plasma for metabolomics using solvent precipitation or solid phase extraction. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 4, p. 2114-2121, 2009.
85. MINAMISAWA, Kiwamu *et al.* Indolepyruvate pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. **Plant and cell physiology**, v. 37, n. 4, p. 449-453, 1996.
86. MIQUELETO, A. P. *et al.* Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. **Bioresource technology**, v. 101, n. 4, p. 1324-1330, 2010.
87. DE LIMA MORAIS, David A. *et al.* SUPERFAMILY 1.75 including a domain-centric gene ontology method. **Nucleic acids research**, p. gkq1130, 2010.
88. MORRIS, Roy O. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. In: **Plant Hormones**. Springer Netherlands, 1995. p. 318-339.
89. NGUYEN, M. N.; TAN, Kuan Pern; MADHUSUDHAN, Mallur S. CLICK—topology-independent comparison of biomolecular 3D structures. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl 2, p. W24-W28, 2011.
90. NONGBRI, Pyniarlang L. *et al.* Indole-3-acetaldoxime-derived compounds restrict root colonization in the beneficial interaction between Arabidopsis roots and the endophyte Piriformospora indica. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 9, p. 1186-1197, 2012.

91. OBERHÄNSLI, Thomas; DÉFAGO, Geneviève; HAAS, Dieter. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. **Journal of general microbiology**, v. 137, n. 10, p. 2273-2279, 1991.
92. DE OLIVEIRA, Ademar P. *et al.* Rendimento de feijão-caupi em função de doses e formas de aplicação de nitrogênio. **Hortic. bras**, v. 21, n. 1, 2003.
93. ORMEÑO-ORRILLO, Ernesto *et al.* Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 735, 2012.
94. PARANÁ, SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, 2012. <http://www.agricultura.pr.gov.br/>.
95. PATRIARCA, Eduardo J.; TATÈ, Rosarita; IACCARINO, Maurizio. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 203-222, 2002.
96. PATTEN, Cheryl L.; BLAKNEY, Andrew JC; COULSON, Thomas JD. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. **Critical reviews in microbiology**, v. 39, n. 4, p. 395-415, 2013.
97. PATTEN, Cheryl L.; GLICK, Bernard R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.
98. PECK, Melicent C.; FISHER, Robert F.; LONG, Sharon R. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5417-5427, 2006.
99. PEDRUZZI, Ivo *et al.* HAMAP in 2013, new developments in the protein family classification and annotation system. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D584-D589, 2013.
100. PEREZ-GALDONA, R. *et al.* Aromatic amino acid aminotransferases in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Their role in indoleacetic acid synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 573-579, 1989.
101. PERLEY, J. E.; STOWE, B. B. The production of tryptamine from tryptophan by *Bacillus cereus* (KVT). **Biochem. J**, v. 100, p. 169-174, 1966.
102. PERLEY, James E.; STOWE, Bruce B. On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. **Plant physiology**, v. 41, n. 2, p. 234-237, 1966.

103. PETERSEN, Thomas Nordahl *et al.* SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, v. 8, n. 10, p. 785-786, 2011.
104. PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
105. PFAFFL, Michael W.; HORGAN, Graham W.; DEMPFLER, Leo. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002.
106. PII, Youry *et al.* Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 21, 2007.
107. POLLMANN, Stephan *et al.* Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 216, n. 1, p. 155-161, 2002.
108. PRATAP, Aditya; KUMAR, Jitendra. **Biology and breeding of food legumes**. CABI, 2011.
109. PRINSEN, E. *et al.* *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 6, p. 609-609, 1993.
110. PUEPPKE, Steven G.; BROUGHTON, William J. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 4, p. 293-318, 1999.
111. PUNTA, Marco *et al.* The Pfam protein families database. **Nucleic acids research**, p. gkr1065, 2011.
112. VAN PUYVELDE, Sandra *et al.* Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. *Microbial ecology*, v. 61, n. 4, p. 723-728, 2011. QUITTENDEN, Laura J. *et al.* Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. **Plant physiology**, v. 151, n. 3, p. 1130-1138, 2009.
113. RELIĆ, B. *et al.* *Nod* factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. **Molecular microbiology**, v. 13, n. 1, p. 171-179, 1994.
114. RIBEIRO, Renan Augusto *et al.* Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

- reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in microbiology**, v. 160, n. 4, p. 297-306, 2009.
115. ROBERSON, Emily B. *et al.* Nutritional management of microbial polysaccharide production and aggregation in an agricultural soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 59, n. 6, p. 1587-1594, 1995.
116. RODRIGUES, E. P. Isolamento e caracterização de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos na produção de auxinas. 2008. **Tese (Biotecnologia Vegetal)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.
117. SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sci Med Res**, v. 21, p. 1-30, 2011.
118. SCHAUER, Nicolas *et al.* GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **FEBS letters**, v. 579, n. 6, p. 1332-1337, 2005.
119. SEKINE, M.; WATANABE, K.; SYONO, K. Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1718-1724, 1989.
120. SESSITSCH, A. *et al.* Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 323-378, 2002.
121. SIGRIST, Christian JA *et al.* New and continuing developments at PROSITE. **Nucleic acids research**, p. gks1067, 2012.
122. SPAEPEN, Stijn. Plant Hormones Produced by Microbes. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Springer International Publishing, p. 247-256. 2015.
123. SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. **Introduction to modern liquid chromatography**. John Wiley & Sons, 2011.
124. SPAEPEN, Stijn *et al.* Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. **FEMS microbiology letters**, v. 291, n. 2, p. 195-200, 2009.
125. SPAEPEN, Stijn; VANDERLEYDEN, Jos. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 2011.

126. SPAEPEN, Stijn; VANDERLEYDEN, Jos; REMANS, Roseline. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.
127. SPARKMAN, O. David. Mass spectrometry desk reference. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 12, p. 1144, 2000.
128. SUZAKI, Takuya; ITO, Momoyo; KAWAGUCHI, Masayoshi. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. **Frontiers in plant science**, v. 4, 2013.
129. TANNER, J. W.; ANDERSON, I. C. External effect of combined nitrogen on nodulation. **Plant physiology**, v. 39, n. 6, p. 1039, 1964.
130. THEUNIS, Mart *et al.* Flavonoids, NodD1, NodD2, and *nod*-box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 17, n. 10, p. 1153-1161, 2004.
131. THORNTON, Brenda; BASU, Chhandak. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145-154, 2011.
132. UNTERGASSER, Andreas *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012.
133. VALLENET, David *et al.* MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. **Nucleic acids research**, p. gks1194, 2012.
134. VAN BRUSSEL, A. A. *et al.* A biovar-specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudate of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 9, p. 5394-5401, 1990.
135. VAN PUYVELDE, Sandra *et al.* Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. **Microbial ecology**, v. 61, n. 4, p. 723-728, 2011.
136. VARGAS, Milton AT; MENDES, Ieda C.; HUNGRIA, Mariangela. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrados soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 32, n. 3, p. 228-233, 2000.

137. VEGA-HERNANDEZ, Maria C.; LEÓN-BARRIOS, Milagros; PÉREZ-GALDONA, Ricardo. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 665-668, 2002.
138. VESSEY, J. Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.
139. VINCENT, James Matthew *et al.* A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, 1970.
140. WEIDNER, Stefan *et al.* Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with leaves of the seagrass *Halophila stipulacea* by a culture-independent small-subunit rRNA gene approach. **Microbial ecology**, v. 39, n. 1, p. 22-31, 2000.
141. WEST, Stuart A. *et al.* Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen?. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1492, p. 685-694, 2002.
142. WILLEMS, Anne. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1-2, p. 3-14, 2006.
143. WOODWARD, Andrew W.; BARTEL, Bonnie. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of botany**, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005.
144. WU, Cathy H. *et al.* PIRSF: family classification system at the Protein Information Resource. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl 1, p. D112-D114, 2004.
145. XIE, Baoen *et al.* Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. **FEMS microbiology letters**, v. 248, n. 1, p. 57-63, 2005.
146. XIE, Sheng-Xue *et al.* A gene cluster responsible for alkylaldoxime metabolism coexisting with nitrile hydratase and amidase in *Rhodococcus globerulus* A-4. **Biochemistry**, v. 42, n. 41, p. 12056-12066, 2003.
147. YANG, Ching-Hong *et al.* Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 7, p. 3889-3894, 2001.
148. XU, Zi-Rong; HU, Cai-Hong; WANG, Ming-Qi. Effects of fructooligosaccharide on conversion of L-tryptophan to skatole and indole by

- mixed populations of pig fecal bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 48, n. 2, p. 83-89, 2002.
149. ZAHNAN, Hamdi Hussein. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, n. 4, p. 968-989, 1999.
150. ZHANG, Yang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 40, 2008.
151. ZHAO, Yunde *et al.* A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. **Science**, v. 291, n. 5502, p. 306-309, 2001.
152. ZHU, Dunming *et al.* A new nitrilase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110: Gene cloning, biochemical characterization and substrate specificity. **Journal of biotechnology**, v. 133, n. 3, p. 327-333, 2008.

9. ANEXOS

8.1 - Meios de cultivos e soluções utilizadas

1 – MEIO YM

Manitol	4 g/L
Extrato de Levedura	0,4 g/L
Fosfato de Potássio	0,5 g/L
Sulfato de Magnésio	0,2 g/L
Cloreto de Sódio	0,1 g/L

2 – Reagente de Salwkoski

Ácido Sulfúrico	30 mL
Água destilada	50 mL
Cloreto de ferro 0,5M	1 mL

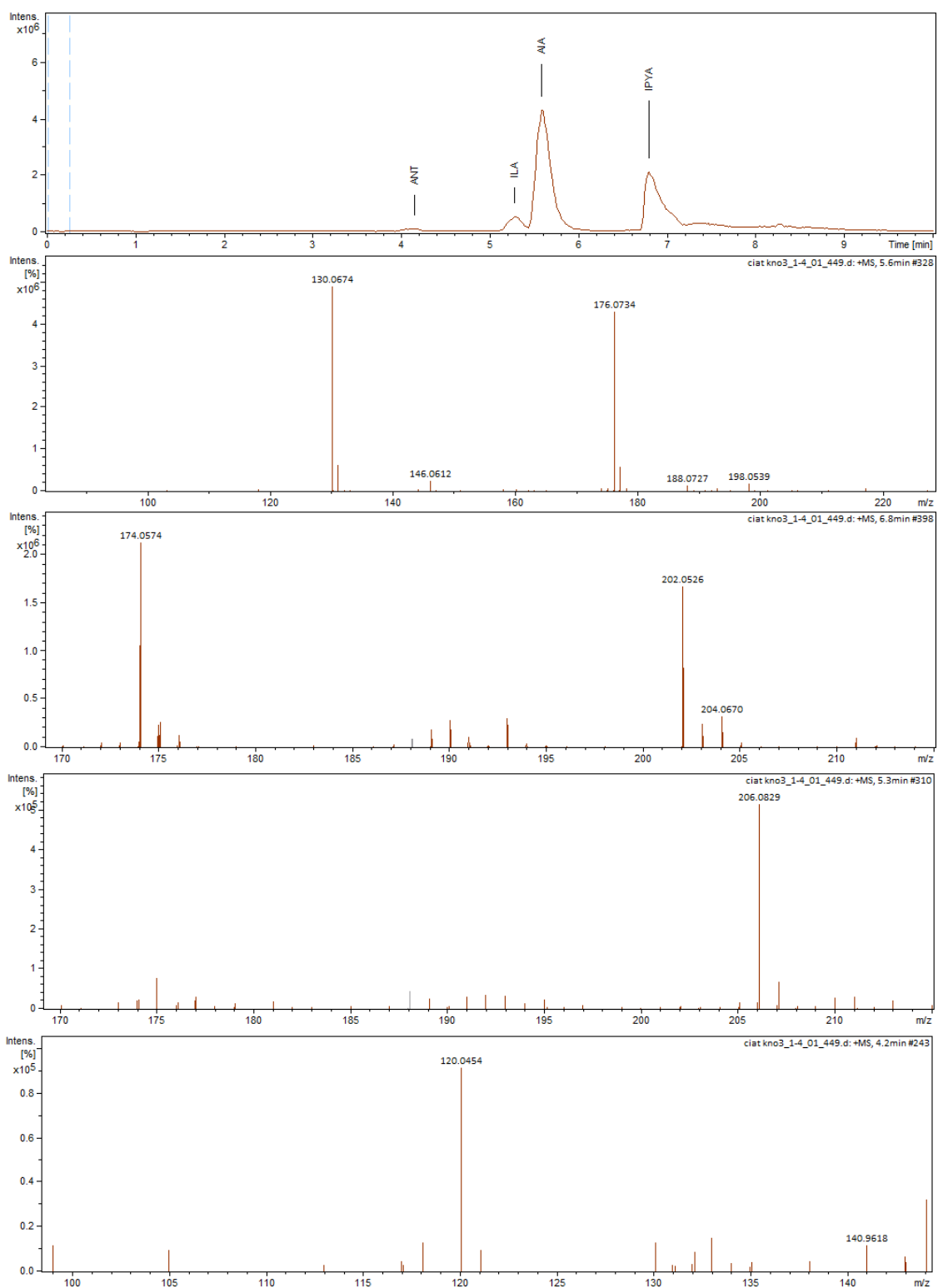
3 – Solução de L-Triptofano (10 mg.ml-1)

L-triptofano	1 g
Água destilada	100 mL

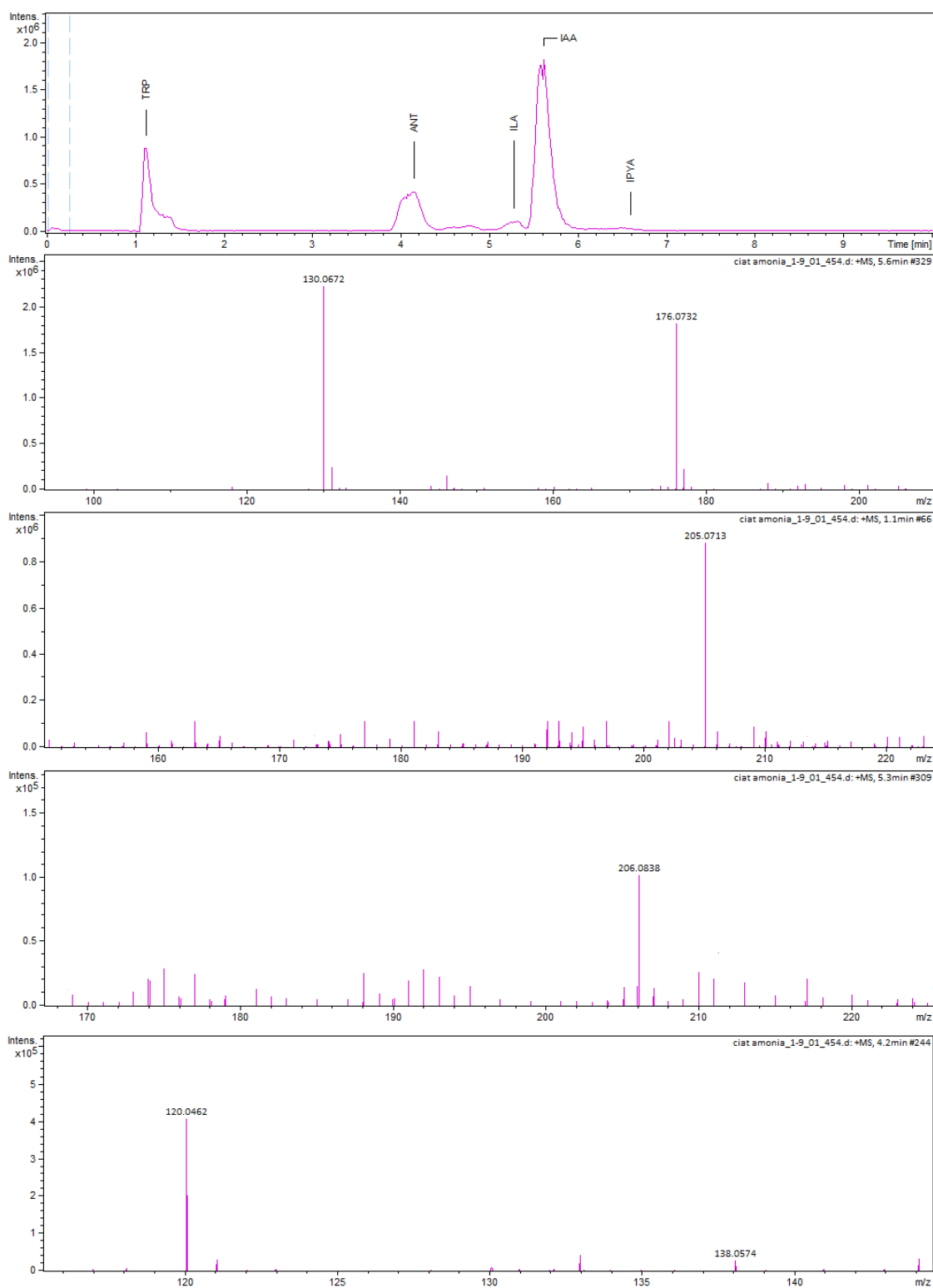
O L-triptofano deve ser dissolvido em 10 ml de água adicionando-se aos poucos uma solução de NaOH até a completa dissolução. Após completar o volume para 100 ml de água destilada e esterilizar por filtração (0,22 µm). Guardar em geladeira. Adicionar 1 ml da solução estoque para cada 100 ml de meio de cultura.

		PRF S/ TRP	PRF c/ TRP	PRF KNO3	PRF NH3	CIAT S/ TRP	CIAT c/ TRP	CIAT KNO3	CIAT NH3	m/z
TRP	Área	0,00E+00	3,15E+07	4,88E+07	8,54E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,15E+07	205.099 ± 0.005
	Intensidade	0,00E+00	3,25E+06	4,62E+06	7,21E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,54E+06	
ILA	Área	0,00E+00	2,16E+06	2,78E+05	0,00E+00	1,92E+07	9,14E+06	5,41E+06	8,99E+05	206.085 ± 0.005
	Intensidade	0,00E+00	2,01E+05	4,05E+04	0,00E+00	1,68E+05	8,29E+05	5,20E+05	1,06E+05	
IPYA	Área	0,00E+00	9,78E+06	6,86E+06	0,00E+00	5,57E+06	4,48E+07	3,15E+07	1,06E+05	174.058 ± 0.005
	Intensidade	0,00E+00	7,37E+05	5,81E+05	0,00E+00	7,35E+04	3,23E+06	2,42E+06	1,44E+05	
AIA	Área	0,00E+00	9,07E+05	1,04E+06	0,00E+00	1,04E+07	4,38E+07	4,95E+07	2,03E+07	176.054 ± 0.005
	Intensidade	0,00E+00	1,16E+05	1,32E+05	0,00E+00	6,50E+04	3,75E+06	4,33E+06	1,82E+06	
AIA + IPYA	Área	0,00E+00	1,07E+07	7,90E+06	0,00E+00	1,60E+07	8,85E+07	8,09E+07	3,09E+07	-
	Intensidade	0,00E+00	8,53E+05	7,13E+05	0,00E+00	1,39E+05	6,98E+06	6,75E+06	1,96E+06	-
ANT	Área	0,00E+00	4,44E+05	3,13E+05	0,00E+00	0,00E+00	1,93E+06	1,01E+06	6,40E+06	120.046 ± 0.005
	Intensidade	0,00E+00	1,47E+04	8,65E+03	0,00E+00	0,00E+00	1,42E+05	9,08E+04	4,14E+05	

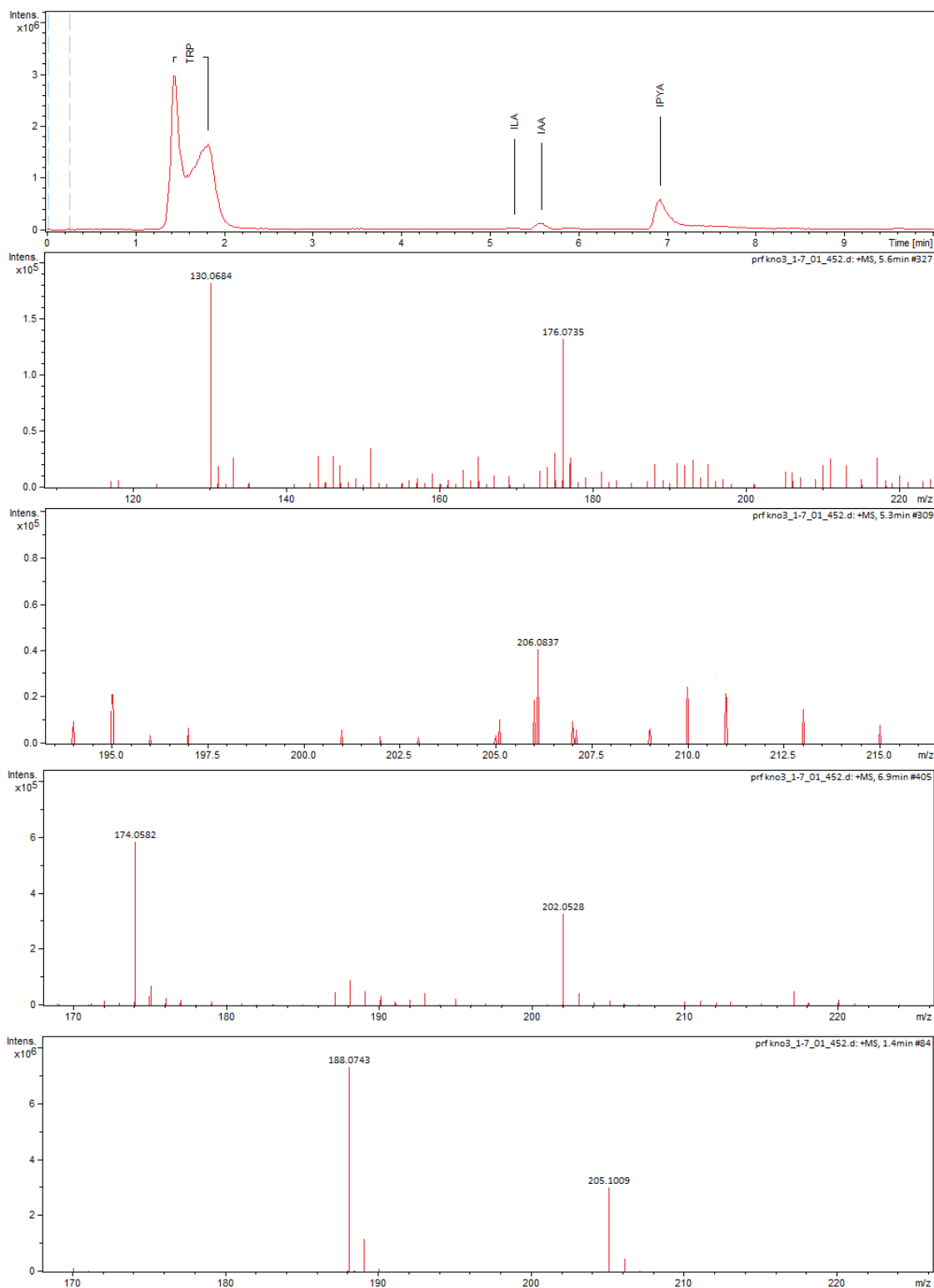
ANEXO A – Área e intensidade do pico do cromatograma dos compostos detectados nos diferentes tratamentos, extraídos a partir dos respectivos valores de relação carga-massa.



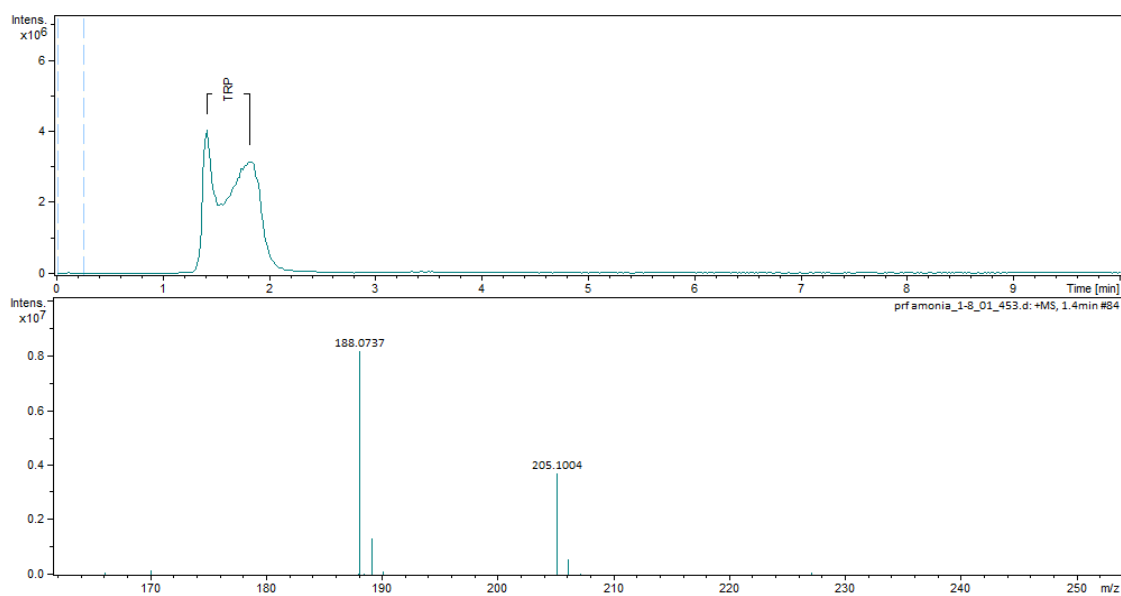
ANEXO II – Cromatograma e espectros de massa do extrato metanólico de CIAT 899 na presença de triptofano e KNO₃.



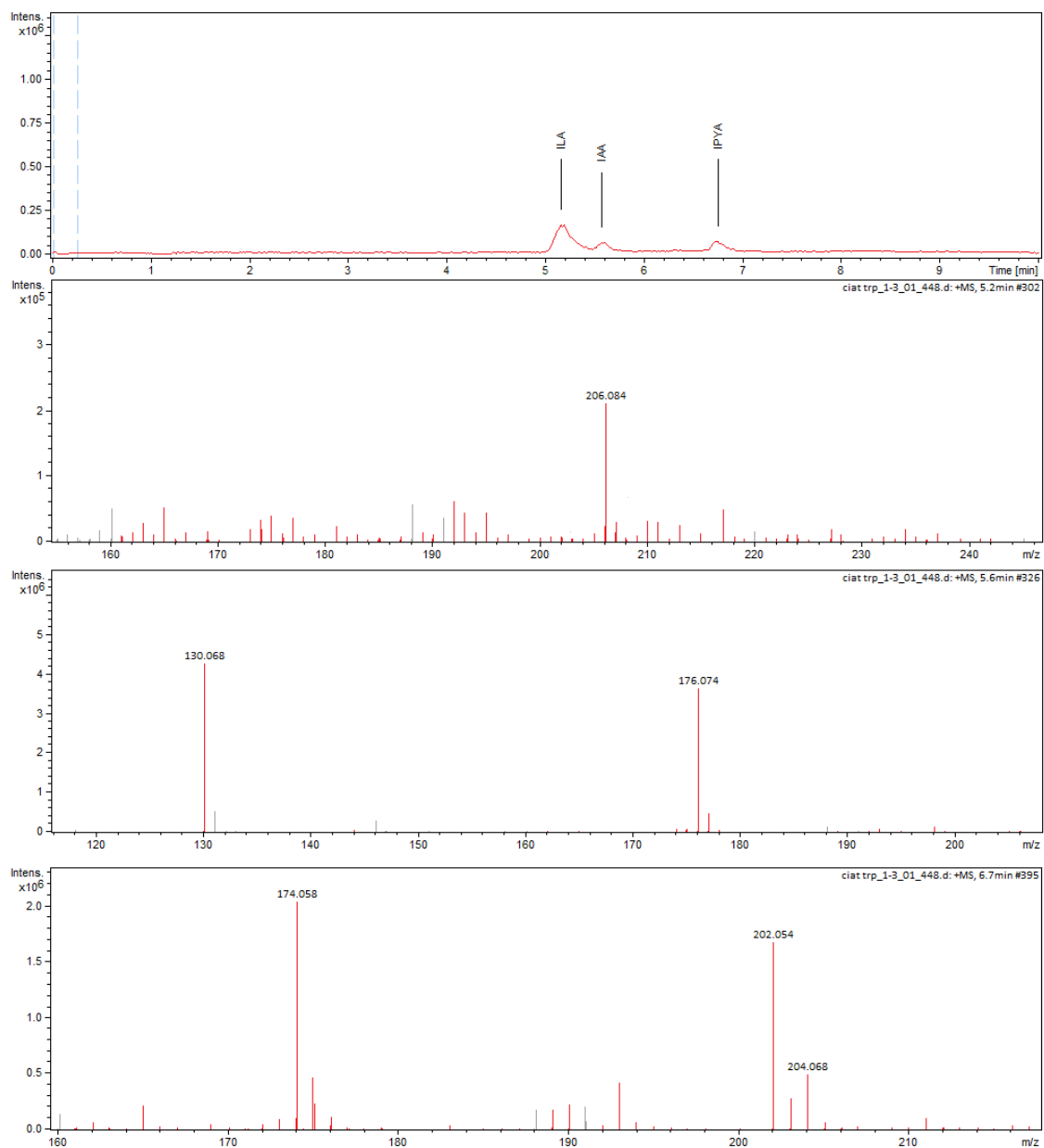
ANEXO III – Cromatograma e espectros de massa do extrato metanólico de CIAT 899 na presença de triptofano e NH₄.



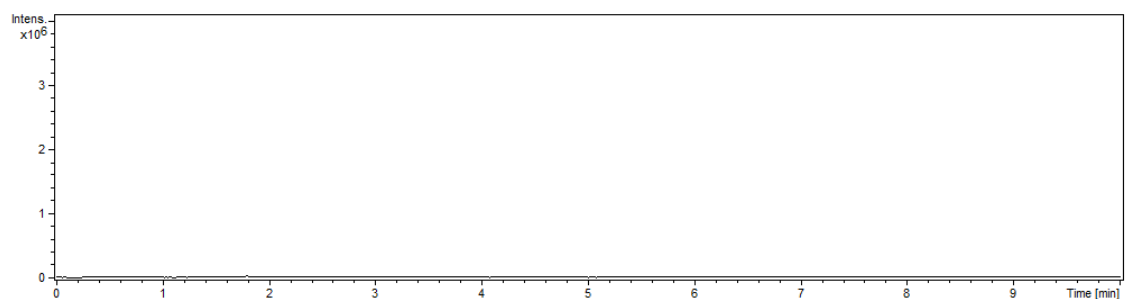
ANEXO IV – Cromatograma e espectros de massa do extrato metanólico de PRF 81 na presença de triptofano e KNO₃.



ANEXO V – Cromatograma e espectros de massa do extrato metanólico de PRF 81 na presença de triptofano e NH₄.



ANEXO VI – Cromatograma e espectros de massa do extrato metanólico de CIAT 899 na ausência de triptofano.



ANEXO VII – Cromatograma e espectros de massa do extrato metanólico de PRF 81 na ausência de triptofano.