



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CÁTIA LIE YOKOYAMA

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Rhizobium tropici* CIAT899 EM RESPOSTA AO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO

CÁTIA LIE YOKOYAMA

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Rhizobium tropici* CIAT899 EM RESPOSTA AO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Genética de Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Yokoyama, Catia Lie.

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Rhizobium tropici* CIAT899 EM RESPOSTA AO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO / Catia Lie Yokoyama. - Londrina, 2018.

100 f. : il.

Orientador: Elisete Pains Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. *Rhizobium tropici* - Tese. 2. L-triptofano - Tese. 3. NanoLC-MS/MS - Tese. 4. Proteômica - Tese. I. Pains Rodrigues, Elisete. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

CÁTIA LIE YOKOYAMA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Rhizobium tropici*
CIAT899 EM RESPOSTA AO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Genética de Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Elisete Pains
Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof. Dr. Fabrício Martins Lopes
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 28 de março de 2018

DEDICATÓRIA

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, à minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim e por serem sempre meu porto seguro diante das dificuldades ao longo deste percurso.

AGRADECIMENTOS

A coordenação do Programa Genética e Biologia Molecular;

A CAPES, pelo suporte financeiro à pesquisa;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT);

Aos professores do Departamento de Biologia geral e do Programa de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina pelo aprendizado e contribuições ao meu crescimento pessoal e profissional;

À minha orientadora Dra. Elisete Pains Rodrigues por gentilmente ter me ajudado, guiado e acreditado em mim ao longo deste trabalho. Em todos os momentos me aconselhou e desejou o melhor para o meu futuro e sempre se dispôs a me ensinar em qualquer circunstância. Muito obrigada!

À Dra. Adriana Paes Leme e as técnicas Bianca Pauletti e Romênia Domingues do Laboratório Nacional de Biociências (CNPq/LNBio) pela ajuda e disponibilidade na análise proteômica;

Ao prof. Dr. Paulo Costa Carvalho do Instituto Carlos Chagas - Fiocruz (PR) e ao Dr. Diogo Lima pela paciência e ajuda na utilização do software PatternLab;

À Dra. Marcia Vidal da Embrapa Agrobiologia pelo fornecimento de reagentes;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM), Ana Camila, Amanda, Douglas, Luana, Jessica, Ilmara e Gilberto pelos ensinamentos, auxílio e amizade;

Aos amigos da UEL e laboratórios vizinhos, Carla, Ana Paula, Fernanda, Moema, Same, Felipe, João, Jota, Renan, Marcelly e Luciane, que com certeza foram importantíssimos durante esta etapa;

Aos amigos Mayra, Felipe, Conrado, José, Luciane, Hugo Pires, Lais, Hugo Assis, Lucas, Benny, Marina, Thiago, pela amizade, alegria e companheirismo, que mesmo distantes fisicamente, foram essenciais durante esta caminhada;

Enfim, agradeço a todos os familiares, amigos e profissionais que de alguma forma se fizeram presentes e contribuíram para a conclusão deste trabalho.

A todos, OBRIGADA!

YOKOYAMA, Cátia Lie. **Análise proteômica diferencial de *Rhizobium tropici* CIAT899 em resposta ao aminoácido L-Triptofano.** 100 f. 2018. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Rhizobium tropici CIAT899 é uma bactéria simbiótica utilizada como inoculante comercial para o cultivo de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). A simbiose entre rizóbios e plantas leguminosas resulta na formação de nódulos radiculares, órgãos especializados na troca de nutrientes entre as bactérias e a raiz aprimorando os benefícios da fixação biológica de nitrogênio (FBN). O estabelecimento da simbiose e formação dos nódulos é um processo complexo e regulado por ambos os parceiros, sendo o fitormônio auxina (ácido indol-3-acético; AIA), um dos fatores envolvidos na regulação do processo de biogênese do nódulo. A ação do AIA já foi relatado atuação durante os estágios iniciais do processo de infecção, como o encurvamento do pêlo radicular, desenvolvimento do cordão de infecção, iniciação e diferenciação de nódulos. Este fitormônio também é produzido por bactérias, inclusive por *R. tropici* CIAT899, porém as vias de biossíntese e os fatores de regulação são ainda pouco estudadas. Entre os fatores conhecidos que regulam a produção de AIA em bactérias está o precursor das vias de biossíntese, o aminoácido L-triptofano (TRP). Além do TRP, a produção de auxinas também é regulada pela disponibilidade de amônia (NH_4^+), um fator que interfere tanto na biossíntese de auxinas quanto no estabelecimento da simbiose e nodulação de leguminosas. Devido à importância de AIA no estabelecimento de relações simbióticas entre rizóbios e leguminosas, o presente trabalho teve como objetivo analisar a produção de auxinas de CIAT899 na presença de TRP e amônia e comparar o proteoma de CIAT899 na presença e na ausência de TRP, visando identificar proteínas que sejam reguladas por este aminoácido. Para os ensaios experimentais, CIAT899 foi cultivada em meio YM em quatro condições biológicas (sem TRP; com TRP; com NH_4^+ ; com TRP e NH_4^+), com três repetições. A produção de auxinas foi avaliada por colorimetria com o reagente de Salkowski e o crescimento pela absorbância ($\text{DO}_{600\text{nm}}$). Para análise proteômica, as proteínas foram extraídas e digeridas com tripsina e os peptídeos obtidos foram analisados por cromatografia líquida em nano escala, acoplado à espectrometria de massa (nanoLC-MS/MS). As proteínas foram identificadas pela comparação do proteoma contra o genoma de CIAT899, sendo as proteínas diferencialmente expressas identificadas pela análise de T-fold no programa PatternLab. As análises funcionais foram feitas com o auxílio das ferramentas Uniprot, KEGG Mapper e PATRIC. Os dados obtidos revelaram que a produção de auxinas em CIAT899 é estimulada pelo L-triptofano, produzindo 28,56 $\mu\text{g/mL}$ em 24 horas de cultivo enquanto a presença de amônia tem efeito negativo com reduções de até 61,2%. A amônia é o 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. Na análise diferencial, entre YM versus YM+TRP, foram identificadas 617 proteínas totais, no qual 164 foram exclusivamente expressas na ausência de TRP, e 112 na presença de TRP. Na análise utilizando KEGG permitiu mapear mais de 90 vias metabólicas, onde a via com maior número de identificações foi relacionado à biossíntese de metabólitos

secundários. Na análise utilizando o GO foram identificadas principalmente proteínas relacionadas à atividade catalítica, biossíntese de compostos celulares, e processos metabólicos e celulares. A análise no TFold permitiu identificar 10 proteínas diferencialmente expressas que satisfazem ambos testes estatísticos (fold-change e *p-value*), 28 proteínas atenderam apenas o corte de *Fold change* e 8 proteínas que são consideradas diferencialmente expressas, mas apresentaram baixa abundância. Entre as proteínas diferencialmente expressas, destacam-se a fosfatase ácida, lactato desidrogenase, proteína periplásmica de ligação oligopeptídica, transportador ABC, proteína do locus B associada com invasão, succinoglucana ExoF, proteína da via de dissimilação da Fucose e três proteínas ribossomais 50S. Os principais processos que foram alterados em resposta ao aminoácido triptofano foram: metabolismo de sideróforo, biossíntese de polissacarídeos de superfície celular, atividade de quimiotaxia e motilidade e biossíntese e metabolismo de aminoácidos aromáticos por CIAT899. Estes resultados evidenciam que a biossíntese de AIA ocorre por vias metabólicas dependentes de TRP que são reguladas pela disponibilidade de amônia.

Palavras-chave: *Rhizobium tropici*. L-triptofano. nanoLC-MS/MS.

YOKOYAMA, Cátia Lie. **Differential proteomal analysis OF *Rhizobium tropici* CIAT899 in response to aminoacid L-Tryptophan.** 2018. 100 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Rhizobium tropici CIAT899 is a symbiotic bacteria used as a commercial inoculant for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The symbiosis between rhizobia and leguminous plants results in the formation of root nodules, organs that specialize in the exchange of nutrients between bacteria and root, enhancing the benefits of biological nitrogen fixation (BNF). The establishment of symbiosis and formation of nodules is a complex process regulated by both partners, being the phytohormone auxin (indole-3-acetic acid; IAA), one of the factors involved in the regulation of the biogenesis process of the nodule. The IAA has already been reported in the early stages of the infection process, such as root curving, infection thread development, nodule initiation and nodule differentiation. This phytohormone is also produced by bacteria including *R. tropici* CIAT899. However, the biosynthesis pathways and regulatory factors are still poorly understood. Among the known factors that regulate the production of IAA in bacteria, the precursor of the biosynthesis pathways, the amino acid L-tryptophan (TRP), is one of the most important. In addition to TRP, auxin production is also regulated by the availability of ammonia (NH_4^+), a factor that interferes with both auxins biosynthesis and the establishment of symbiosis and nodulation of legumes. Due to the importance of IAA in establishing symbiotic relationships between rhizobia and legumes, the present study aimed to analyze the production of auxins by CIAT899 in the presence of TRP and ammonia and to compare the proteome of CIAT899 in the presence and absence of TRP, aiming to identify proteins that are regulated by this aminoacid. For the experimental assays, CIAT899 was cultivated in YM medium in four biological conditions (without TRP, with TRP, with NH_4^+ , with TRP and NH_4^+), with three replicates. Auxin production was assayed by colorimetry with the Salkowski reagent and growth by absorbance ($\text{OD}_{600 \text{ nm}}$). For proteomic analysis, the proteins were extracted and digested with trypsin and the peptides obtained were analyzed by nano-scale liquid chromatography coupled to mass spectrometry (nanoLC-MS / MS). Proteins were identified by comparing the proteome against the genome of CIAT899, and the differentially expressed proteins were identified by the T-Fold analysis in the PatternLab software. The functional analyzes were done in the tools, Uniprot, KEGG Mapper and PATRIC. The data obtained showed that the production of auxins in CIAT899 is stimulated by L-tryptophan, producing $28.56 \mu\text{g} / \text{mL}$ in 24 hours of cultivation while the presence of ammonia has a negative effect with reductions up to 61.2%. Ammonia is the main product of FBN and acts as the main regulator in the final stages of symbiosis and in the reactions involved with FBN, reinforcing the importance of elucidating the role of IAA in these processes. In the differential analysis, between YM and YM + TRP, 617 total proteins were identified, in which 164 were exclusively expressed in the absence of TRP, and 112 in the presence of TRP. Analysis using KEGG allowed to map more than 90 metabolic pathways, in which the route with the highest number of identifications was the biosynthesis of secondary metabolites. In the GO analysis, proteins related to catalytic activity, part of the cell and metabolic and cellular

processes were identified. The analyzes in the TFold were identified 10 differentially expressed proteins that satisfy both statistical tests (fold-change and p-value), 28 proteins attended only the cut of Fold change and 8 proteins that are considered differentially expressed, but presented low abundance. In the analysis of differentially expressed proteins were include acid phosphatase, lactate dehydrogenase, oligopeptide binding periplasmic protein, ABC transporter, B locus associated protein with invasion, ExoF succinoglucan, fucose dissimilation pathway protein and three 50S ribosomal proteins. The main processes that were altered in response to the amino acid tryptophan were: siderophore metabolism, cell surface polysaccharide biosynthesis, chemotaxis and motile activity and biosynthesis and metabolism of aromatic amino acid by CIAT899. These results show that the biosynthesis of AIA occurs by metabolic pathways that are regulated by the availability of ammonia.

Keywords: *Rhizobium tropici*. L-tryptophan. nanoLC-MS / MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organogênese do nódulo em plantas leguminosas por indução de <i>Rhizobium</i> (Adaptado de Pearson Education, Inc. 2011).....	16
Figura 2. SDS – PAGE do extrato proteico de CIAT899. Amostras (1-3) YM sem triptofano; (4-6) YM com triptofano (100 µg/mL); marcador PageRuler™ Unstained Ladder (10-200 KDa). A- imagem original. B – negativo da imagem.....	49
Figura 3. Diagrama de Venn do proteoma de <i>R. tropici</i> CIAT899 cultivado na ausência (1) ou presença (2) de TRP.	50
Figura 4. Análise pelo TFold das proteínas de CIAT899 mutuamente expressas nas duas condições biológicas (sem TRP e com TRP).	51
Figura 5. Número de genes expressos e classificação nas respectivas funções, conforme análise no Gene Ontology (GO) referente ao proteoma de CIAT899 cultivado na ausência ou presença de triptofano.	54
Figura 6. Número de genes expressos e classificação nas respectivas categorias de componente celular conforme análise no Gene Ontology (GO) referente ao proteoma de CIAT899 cultivado na ausência ou presença de triptofano.	55
Figura 7. Número de genes expressos e classificação nas respectivas categorias de processos biológicos conforme análise por Gene Ontology (GO) referentes ao proteoma de CIAT899 cultivado na ausência ou presença de triptofano.	56
Figura 8. Distribuição do proteoma de CIAT899 conforme análise por KEGG pathway.....	59
Figura 9. Organização gênômica dos clusters A e B construídos por análise no software PATRIC, referente aos genes envolvidos com a biossíntese de sideróforos..	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do triptofano e/ou amônio no crescimento e produção de auxinas por <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899.....	47
Tabela 2. Análise pelo TFold das proteínas de CIAT899 mutuamente expressas nas duas condições biológicas (sem TRP e com TRP).....	51
Tabela 3. Número de genes expressos e classificação nas respectivas categorias de função molecular, componente celular e processos biológicos do proteoma de CIAT899 cultivado na ausência ou presença de triptofano, conforme análise pelo Gene Ontology (GO).....	56
Tabela 4. Distribuição do proteoma de CIAT899 expresso em cultivos adicionados ou não de L-triptofano mapeados por KEGG	60
Tabela 5. Proteínas de CIAT899 relacionadas com o metabolismo de exopolissacarídeos	65
Tabela 6. Proteínas de CIAT899 envolvidas no metabolismo de lipopolissacarídeos	65
Tabela 7. Proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 envolvidas na biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano)	66
Tabela 8. Proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 envolvidas no metabolismo de triptofano.	68
Tabela 9. Aminotransferases identificadas no proteoma de CIAT899.....	69
Tabela 10. Proteínas do cluster LDH identificadas no proteoma de CIAT899.....	70
Tabela 11. Proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 envolvidas na biossíntese de sideroforos	72
Tabela 12. Proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 envolvidas na biossíntese de flagelo.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE	Eletroforese bidimensional
AIA	Ácido indol-3-acético
BNL	Bactérias Nodulíferas de Leguminosa
D.O.	Densidade Ótica
FBN	Fixação Biológica do Nitrogênio
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FMA	Fungo Micorrízico Arbuscular
GOEx	<i>Gene Ontology Explorer</i>
IAAld	Indol-3-acetaldeído
IAM	Indol-3-acetamida
IAN	Indol-3-acetonitrila
IAOx	Indol-3-acetaldoxima
IPyA	Indol-3-ácido pirúvico
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LBD	<i>Ligand-Binding Domain</i>
m/z	Razão massa/carga
MS	Espectro de massa
MS1	Espectro do perfil de massas
MS2 ou MS/MS	Espectrômetro do perfil de massas de íons dissociados
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>
N	Nitrogênio
NF	<i>Nodulation Factor</i> (Fator Nod)
PSM	<i>Peptide Spectrum Matching</i>
rpm	Rotações por minuto
SEPro	<i>Search Engine Processor</i>
TAM	Triptamina (ou Indol-3-etanolamina)
LTQ	<i>Linear Trap Quadrupolo</i>
TRP	Triptofano
XIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
DDA	<i>Data Dependent Analysis</i>
ESI	Ionização por spray de elétrons
ETD	Dissociação por transferência de elétron

ppm

Parte por milhão

SDS

Sodium Dodecyl Sulfate

PAGE

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SUMÁRIO

1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1.	Simbiose rizóbio-leguminosa	14
1.1.1.	Estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa	15
1.1.2.	Diálogo molecular – flavonoides e fatores de nodulação	17
1.2.	Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)	19
1.3	<i>Rhizobium tropici</i>	21
1.4	Auxina	22
1.4.1.	Papel da auxina na simbiose rizóbio-leguminosa	24
1.4.2.	Biossíntese de auxina	25
1.4.3.	Regulação da biossíntese de auxina	28
1.5	Proteômica	29
1.5.1.	Espectrometria de massa para proteômica <i>shotgun</i>	31
1.5.2.	Software - PatternLab for Proteomics	34
2.	OBJETIVOS	36
2.1.	OBJETIVO GERAL	36
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3.	MANUSCRITO – ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 EM RESPOSTA AO AMINOÁCIDO L- TRIPTOFANO	37
	Resumo	39
	Introdução	39
	Material e Métodos	42
	Resultados e Discussão	46
	<i>Conclusão</i>	75
	<i>Referências</i>	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Simbiose rizóbio-leguminosa

Na simbiose entre rizóbio e plantas leguminosas, o rizóbio desencadeia a formação de um órgão especializado nas raízes da planta hospedeira, denominado nódulo. No interior dos nódulos, mediante processo de infecção, formas diferenciadas de rizóbios, chamadas de bacteroides, realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e disponibilizam a amônia produzida diretamente aos tecidos vegetais em troca de fotossintatos fornecidos pela planta (JONES et al., 2007).

A simbiose rizóbio-leguminosa é uma adaptação evolutiva relativamente recente, que ocorreu há aproximadamente 60 milhões de anos atrás, e que compartilha mecanismos comuns com a associação simbiótica entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e as raízes das plantas presentes em quase todo o reino vegetal (HARRISON, 2005; SPRENT, 2007; 2008). Esta relação evolutiva foi inferida com base em descobertas de genes que codificam fatores comuns para o estabelecimento de simbiose, presentes em rizóbios e micorrizas. Considerando que quase todas as plantas vasculares interagem com simbiontes micorrízicos, ainda não está claro porquê a simbiose com a finalidade de FBN é estritamente limitada às espécies de leguminosas, com exceção do gênero *Parasponia* pertencente à família Cannabaceae. O entendimento atual sobre o surgimento e evolução da nodulação em leguminosas indica que o primeiro evento de simbiose envolveu a invasão bacteriana nas raízes, através de aberturas na epiderme do hospedeiro onde emergem as raízes laterais (SPRENT, 2008). Subsequentemente, os mecanismos de interação evoluíram, provavelmente pelo processo de duplicação de genes, para alcançar uma simbiose altamente seletiva. Em particular, o surgimento de uma estrutura de infecção derivada do hospedeiro permite que este controle o processo de infecção bacteriana (GAGE, 2004).

Dentro da linhagem de rizóbios simbióticos, estimou-se que *Sinorhizobium* divergiu de *Bradyrhizobium* há aproximadamente 500 milhões de anos atrás (TURNER & YOUNG, 2000), período anterior ao aparecimento de espécies de leguminosas, que foi há aproximadamente 60 milhões de anos (SPRENT, 2008). Em adição, os rizóbios apresentam genomas grandes e multipartidos, característica semelhante a outras proteobactérias simbiontes (MACLEAN et al., 2007). A evolução

da capacidade simbiótica do rizóbio também envolveu eventos de transferência horizontal de genes, com base em várias observações. O material genético de rizóbio é composto pelo cromossomo e um ou mais plasmídeos (JUMAS-BILAK et al., 1998), que contribuem para um genoma evolutivamente dinâmico devido ao processo de transferência horizontal de genes. Além disso, os genes de rizóbios envolvidos na simbiose são frequentemente localizados dentro do cromossomo ou em plasmídeos. Genes de *Sinorhizobium meliloti* envolvidos na biossíntese de fatores de nodulação (*nod*, *nol*, *noe*) e fixação de nitrogênio (*nif* e *fix*) estão localizados no plasmídeo pSymA, enquanto outros genes necessários para a biossíntese de exopolissacarídeo (*exo*), que são importantes para interação planta-bactéria estão localizadas no plasmídeo pSymB (GALIBERT et al., 2001). A transferência horizontal desses elementos genômicos foi observada entre bactérias presentes na rizosfera e possui capacidade de converter um microrganismo não simbiote em um simbiote através de um único evento de transferência (SULLIVAN et al., 1995; SULLIVAN & RONSON, 1998; BARCELLOS et al., 2007). Além dos genes de simbiose, não há sintenia significativa compartilhada entre os plasmídeos ou cromossomos de várias espécies de rizóbios (WONG & GOLDING, 2003; BOUSSAU et al., 2004). Moulin e colaboradores (2001) observaram que certas β -proteobactérias também são capazes de estabelecer simbioses com leguminosas. Análises filogenéticas comparativas auxiliam o conceito de que os genes simbióticos transmitidos por plasmídeos (*nod* e *nif*) em *Burkholderia* (β -proteobactérias) são derivados de pelo menos um evento horizontal de transferência gênica (CHEN et al., 2003).

1.1.1. Estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa

O início da interação rizóbio-leguminosa é determinado pela excreção de compostos pelas raízes e/ou sementes da planta hospedeira (exdatos) que possuem uma grande variedade de moléculas em sua composição, dentre as quais os compostos flavonoides que podem atuar como fatores de compatibilidade espécie-específicos. Os flavonoides agem como sinais moleculares e são reconhecidos pelos rizóbios compatíveis presentes no solo, atuando como substâncias quimiotáticas, estimuladoras da multiplicação dos rizóbios e indutoras da expressão de genes bacterianos responsáveis pela síntese dos fatores de nodulação (fatores Nod - NF),

oligosacarídeos lipoquitínicos secretados pelos rizóbios (Figura 1A). Os fatores Nod quando reconhecidos pela planta e conduzem alterações morfológicas tais quais: o encurvamento dos pêlos radiculares, invaginação da parede celular e formação de um pré-cordão de infecção no interior do pêlo radicular (Figura 1B). Assim, o rizóbio aderido nos pêlos radiculares encurvados tem a capacidade de invadir o nódulo através de uma estrutura pertencente ao hospedeiro denominada cordão de infecção (Figura 1B). O cordão alcança o córtex, onde é formado o primórdio do nódulo (Figura 1C). Os rizóbios são liberados na extremidade interna do cordão de infecção por endocitose em uma célula cortical, sendo circundados por uma membrana no interior da qual se diferenciam em bacteroides, que são as formas capazes de fixar N_2 , e assim determinando a formação do nódulo maduro e ativo (Figura 1D) (SCHULTZE & KONDOROSI, 1998; BEATTIE, 2007; JONES et al., 2007; BOIVIN-MASSON, et al., 2009). Essa interação simbiótica requer um alto grau de compatibilidade entre o rizóbio e a planta hospedeira, pois a sinalização molecular, mediada especialmente pelos flavonoides e fatores Nod, é altamente específica e coordenada (BOIVIN- MASSON et al., 2009; BARRET & PARKER, 2006).

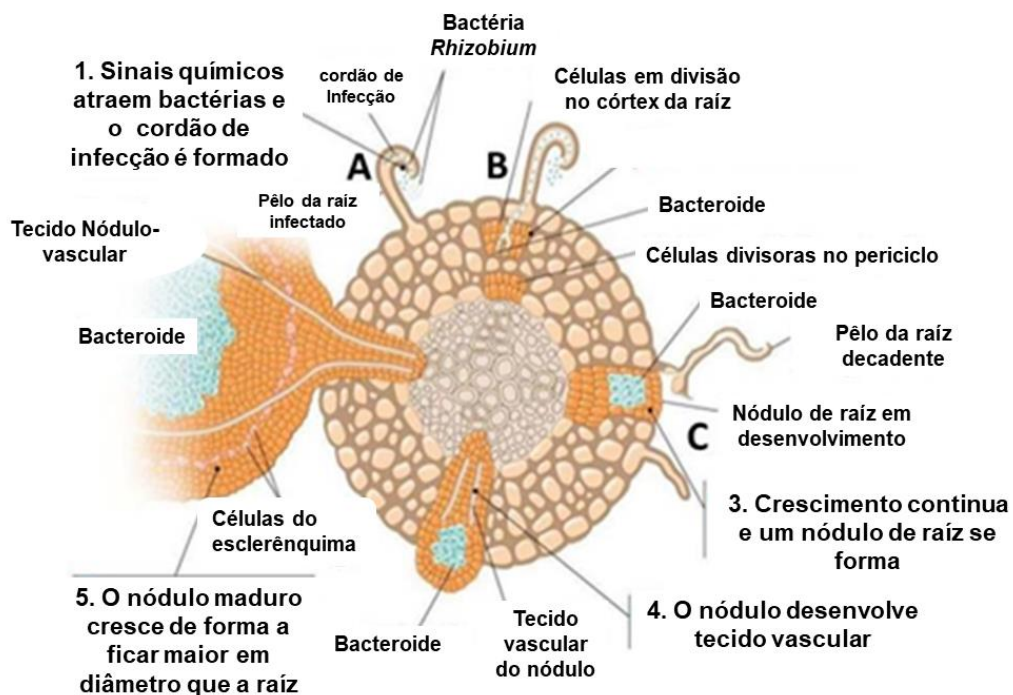


Figura 1. Organogênese do nódulo em plantas leguminosas por indução de *Rhizobium* (Adaptado de Pearson Education, Inc. 2011)

1.1.2. Diálogo molecular – flavonoides e fatores de nodulação

A capacidade de rizóbios formarem nódulos ou invadirem raízes/tecido radicial de hospedeiros é determinada por uma série de eventos de sinalização recíproca. Dénarié e colaboradores (1993) determinaram o termo “diálogo molecular” para descrever a troca de sinais químicos no qual o rizóbio é atraído pela planta levando a infecção dos pêlos radiculares e posterior formação de nódulos na raiz. Os principais sinais provenientes do hospedeiro são metabólitos secundários exsudados pelas raízes das plantas, como os flavonoides e isoflavonoides. (PERRET et al., 2000).

Os flavonoides secretados pela planta hospedeira interagem com as proteínas NodDs da bactéria. A proteína NodD é um regulador transcricional pertencente à família LysR e possui um domínio de ligação (*ligand-binding domain* - LBD) no N-terminal que reconhece os flavonoides. Sob a indução dos flavonoides, a proteína NodD se liga a regiões conservadas, os *nod-boxes*, localizados nas regiões promotoras de genes *nod* induzindo a expressão de genes envolvidos na biossíntese de fatores de nodulação (*Nodulation Factor* - NF). Havendo interação compatível, as raízes secretam mais flavonoides aumentando a capacidade de indução dos genes *nod* nos microssimbiontes (VAN BRUSSEL et al., 1990; CAPELA et al. 2005; COOPER, 2007).

Os isoflavonoides daidzeína e genisteína de *Glycine max* (soja) induzem a expressão dos genes *nod* e a biossíntese de NF em *Bradyrhizobium japonicum* mas não em *S. meliloti*, o qual é induzido pelo flavonoide luteolina (PECK et al., 2006). Já em *P. vulgaris* são encontrados diversos flavonoides exsudados pela raiz como a apigenina, coumestrol, daidzeína, genisteína e a naringenina, sendo a apigenina o flavonoide presente em maior concentração e com maior capacidade de indução de genes *nod* (BOLAÑOS-VÁSQUEZ; WERNER, 1997; ESTÉVEZ et al., 2009; DARDANELLI et al., 2012; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2016). Recentemente, Del Cerro e colaboradores (2017) relataram pela primeira vez que a proteína NodD (NodD2) de *Rhizobium tropici* CIAT899 está relacionada com a ativação transcricional dos genes de nodulação sob condições de estresse salino, de maneira independente de flavonoides.

Os fatores de nodulação funcionam como uma chave que abre a porta de seu hospedeiro para assim iniciar o processo de infecção (PERRET et al., 2000), no qual

deve existir um elevado grau de rigor na estrutura química do fator de nodulação para determinar se o hospedeiro permite a invasão bacteriana. Os fatores de nodulação também funcionam como um mitógeno e modificam o equilíbrio de hormônios da planta para desencadear a formação do primórdio que, em última etapa, dá origem ao tecido do nódulo maduro (FOUCHER & KONDOROSI, 2000; D'HAENZE & HOLSTERS, 2002; OLDROYD & DOWNIE, 2008). Fujishige e colaboradores (2008) revelaram que os fatores de nodulação também desempenham função no desenvolvimento de biofilme em *S. meliloti* de maneira independente do hospedeiro. Assim, o NF parece desempenhar um papel significativo em rizóbios tanto em vida livre como em simbiose.

A diversidade das estruturas dos NFs produzidas pelo rizóbio deriva da presença combinada de genes espécie-específicos e da variação alélica dos genes comuns de nodulação (PERRET et al., 2000). Os genes *nod* comuns (*nodA*, *B* e *C*), que são encontrados em quase todas as espécies de rizóbios, são responsáveis pela síntese do esqueleto de quitina do NF. Já os genes *nod* específicos conferem especificidade para a nodulação de um hospedeiro particular e estão envolvidos em várias modificações do esqueleto da quitina. A capacidade de sintetizar e secretar NF pode ser transferida para *Escherichia coli* pela introdução do conjunto de genes biossintéticos de NF, o que confere a *E. coli* a capacidade de provocar várias das respostas precoces no hospedeiro, relacionadas com o processo de nodulação (WAIS et al., 2002). Uma série de respostas fisiológicas são observadas quando bactérias ou NF purificado é aplicado às raízes (D'HAENZE & HOLSTERS., 2002). Essas respostas foram usadas para posicionar os genes do hospedeiro dentro de uma via de sinalização (OLDROYD & DOWNIE., 2008). Os fatores de nodulação purificados são efetivos para provocar a maioria das respostas do hospedeiro em concentrações nanomolares. As respostas epidérmicas da raiz primária incluem uma alcalinização do citosol e uma despolarização da membrana plasmática em poucos minutos após inoculação da raiz.

De fato, os fatores de nodulação podem se acumular dentro da membrana plasmática de células da raiz da planta hospedeira (GOEDHART et al., 2000), e parecem fornecer uma resposta direta, de modo que a extremidade do pelo da raiz cresce em direção ao local de maior concentração de NF (ESSELING et al., 2003). Na presença de outros compostos secretados pelas plantas (betaínas, xantonas, ácidos orgânicos, jasmonatos e compostos fenólicos simples) a interação tende a

ser mais efetiva, podendo atuar como indutores dos genes de nodulação de rizóbios (genes *nod*). Fitormônios (auxinas, citocininas e etileno), bem como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido nítrico (NO) também exercem papel na simbiose (JANCZAREK et al., 2015). As bactérias na rizosfera podem provocar aumentos quantitativos e mudanças qualitativas na exsudação de flavonoides. Saber exatamente qual flavonoide é compatível com uma determinada espécie bacteriana pode ser difícil de determinar, uma vez que as plantas secretam uma mistura complexa destes compostos.

1.2. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O nitrogênio (N) é um elemento fundamental para os organismos vivos, uma vez que constitui biomoléculas essenciais para todas as formas de vida. Entretanto, é escasso em formas que podem ser assimiladas por plantas, em ecossistemas marinhos e terrestres (FERGUSON, 1998; SMIL, 2004). Este elemento está abundantemente disponível na atmosfera terrestre sob a forma de gás nitrogênio (N_2), mas a maioria dos organismos é incapaz de metabolizar N_2 , pois este elemento é relativamente inerte (MACKAY & FRYZUK, 2004; JIA & QUADRELLI, 2014). Portanto, estes organismos dependem da disponibilidade de formas passíveis de assimilação para suas necessidades nutricionais (HAAG, et al., 2013). As formas disponíveis ou “combinadas” de N para a nutrição dos seres vivos incluem as combinações amoniacais (NH_4^+), nítricas (NO_2^- e NO_3^-) ou orgânicas ($R-NH_2$), que são metabolizadas visando a construção de biomassa (CHENG, 2008; CANFIELD, et al., 2010; THAMDRUP, 2012).

Como as formas assimiláveis N são continuamente sequestradas em sedimentos, tornando-os indisponíveis para o metabolismo, e porque eles também são continuamente convertidos em N_2 por processos combinados de nitrificação e desnitrificação, a vida só pode ser sustentada pela conversão de N_2 em NH_3 (amônia) (CHENG, 2008; THAMDRUP, 2012). Quando realizado por organismos vivos, este processo é conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN) (RAYMOND et al., 2004) e é um passo crítico no ciclo biogeoquímico do planeta (CHENG, 2008; GRUBER & GALLOWAY, 2008; CANFIELD et al., 2010). A fixação de N_2 ocorre de três formas diferentes: (i) através de processos geoquímicos (relâmpago) (GRUBER & GALLOWAY, 2008), (ii) industrialmente através do

processo Haber-Bosch (HABER, 1922; HABER 1923; SMIL, 2004) e (iii) biologicamente pela ação da enzima nitrogenase (BURK, 1934; BURK et al., 1934) que é encontrada apenas em alguns microrganismos, capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (DOS SANTOS et al., 2012; MCGLYNN et al., 2013).

No processo de fixação biológica de nitrogênio, o nitrogênio atmosférico é convertido em amônia devido à atividade do complexo enzimático nitrogenase. Este complexo enzimático é amplamente distribuído entre membros da ordem Rhizobiales e outras bactérias filogeneticamente diversas e denominadas coletivamente de diazotróficas. 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 ao N_2 e reduz o nitrogênio molecular à NH_3/NH_4^+ que pode ser assimilada por outros organismos (FERGUSON, 1998; IGARASHI, 2003; REED et al., 2011; HAAG et al., 2013).

Atualmente a fixação de nitrogênio simbiótica é muito importante do ponto de vista agrícola. O sistema biológico de fixação de nitrogênio mais relevante é a associação simbiótica entre leguminosas e bactérias pertencentes ao grupo rizóbio (HERRIDGE et al., 2008). A tecnologia de inoculação de bactérias de interesse biotecnológico na agricultura tem contribuído para reduzir o uso e o consequente impacto negativo que os fertilizantes químicos podem gerar em diversos ecossistemas, devido às más práticas de uso. A prática de inoculação com bactérias diazotróficas é importante para o manejo agrícola sustentável e para no meio ambiente. Os benefícios dos processos ecológicos desempenhados por estes microrganismos, por meio da fixação biológica de nitrogênio, do controle biológico, da promoção de crescimento vegetal e da solubilização de nutrientes, têm contribuído para aumentar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (MARTINS et al., 2003; HUNGRIA & CAMPO, 2007).

A fixação biológica do nitrogênio tem sido amplamente utilizada em substituição aos fertilizantes nitrogenados para produção de leguminosas devido à sua eficiência econômica em comparação aos fertilizantes minerais e importância no manejo agrícola sustentável (OUMA et al., 2016). As bactérias do gênero *Rhizobium* são fixadoras de nitrogênio e vivem livremente no solo ou em associação simbiótica com as raízes de leguminosas (MARTÍNEZ-ROMERO, 2003). Essas bactérias são utilizadas como biofertilizantes na produção de leguminosas, promovendo o

aumento do nitrogênio disponível por assimilação por meio da FBN em diferentes agroecossistemas, e conseqüentemente favorecendo o crescimento da planta (CHABOT et al., 1998). Os biofertilizantes possuem importância econômica para diversas culturas agrícolas, inclusive a cultura do feijão, uma vez que compreendem uma tecnologia alternativa, natural e de baixo custo para alcançar uma agricultura sustentável e que não altere a biodiversidade e estrutura do solo (RAHMANI et al., 2011). Além disso, a produção de culturas utilizando bioinoculantes pode ser mais barata e mais acessível aos pequenos produtores (SINGH et al., 2016).

1.3 *Rhizobium tropici*

A estirpe CIAT899 foi inicialmente isolada de nódulos de feijão-comum na Colômbia, sendo a cepa tipo de *Rhizobium tropici* (RIBEIRO et al., 2012). É uma bactéria gram negativa, aeróbica, não esporulante, pertencentes ao filo alfa-Proteobacteria (ZAKHIA & LAUJUDIE, 2001). Originalmente, *R. tropici* abrangia dois grupos fenotipicamente distintos, denominados tipo A e tipo B, até que uma nova espécie de *Rhizobium leucaenae* foi descrita e proposta como espécie-tipo para cepas de tipo A, com a cepa CFN299 selecionada como representante das espécies (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; RIBEIRO et al., 2012).

A cepa CIAT899 é um rizóbio promíscuo que pode apresentar simbiose com várias espécies das três subfamílias de leguminosas, com ênfase em *Leucaena spp* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991a; HUNGRIA et al., 2000). Várias leguminosas tropicais são os hospedeiros naturais de *R. tropici* e *R. leucaenae* (ACOSTA-DURÁN & MARTÍNEZ-ROMERO, 2002), e acredita-se que, esses rizóbios formaram nódulos com feijão-comum pela introdução desta em regiões tropicais (GRANGE et al., 2007). Os determinantes genéticos da ampla gama de hospedeiros de *R. tropici* são atualmente desconhecidos, embora a capacidade de certas cepas, como o CIAT899, para produzir uma ampla gama de fatores Nod (MORON et al., 2005) certamente contribui para este fenótipo. CIAT899 foi identificada como altamente eficaz na fixação de N₂ com genótipos de feijoeiro andino e mesoamericano, alta capacidade, competitiva, geneticamente estável e adaptado a condições tropicais estressantes, como solos ácidos e altas temperaturas (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; GRAHAM et al., 1994; HUNGRIA et al., 2000; PINTO et al., 2007). Essas propriedades resultaram na inclusão desta cepa em inoculantes comerciais no Brasil

(HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA et al., 2003) e em alguns países da África. A cepa CIAT899 é resistente a vários compostos antimicrobianos e metais pesados, em comparação com outros rizóbios com capacidade de nodulação em feijão, como *R. etli* e *R. leucaenae* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991b; RIBEIRO et al., 2012). As cepas de *R. tropici* também apresentam resistência aos pesticidas utilizados na agricultura, como os fungicidas Thiram e Captan, que podem diminuir a sobrevivência de bioinoculantes aplicados em sementes (BERNAL et al., 2004; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2008).

No início dos estudos taxonômicos de rizóbio, todas as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas eram classificadas no gênero *Rhizobium* (WANG et al., 2006), apresentando seis espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* e *R. japonicum*. Nesta classificação, os hospedeiros eram os fatores mais importantes na definição destas espécies, embora tenham sido descritas também características morfológicas e fisiológicas (FRED et al., 1932). Durante muito tempo, o inoculante brasileiro utilizado para a cultura de feijão foi obtido a partir de bactérias nodulíferas de leguminosa (BNL) das espécies *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* e *Rhizobium etli*. Algumas destas bactérias eram provenientes do exterior e foram avaliadas por instituições brasileiras de pesquisa (STRALIOTTO, 2002). Atualmente, sabe-se que as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* estão sujeitas a elevado grau de instabilidade genética, podendo perder sua eficiência simbiótica. Sendo assim, o uso de *R. tropici* como inoculante apresenta-se mais vantajoso em comparação a *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*.

1.4 Auxina

O fitormônio auxina foi o primeiro hormônio natural descoberto em plantas em 1930, sendo o ácido indol-3-acético (AIA) de ocorrência natural mais comum (TAIZ & ZEIGER, 2009). A manutenção adequada de níveis de auxina nas células vegetais é importante para regular todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta. Os níveis de auxina celular podem ser alterados pelo transporte de auxina, biossíntese de auxina e interconversão das formas modificadas de auxina. A auxina é sintetizada no meristema apical das plantas, podendo também ser produzida por bactérias em associação com vegetais, através de diferentes vias metabólicas,

sendo a principal a que utiliza o aminoácido L-triptofano como precursor (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Muitos estudos indicam que a alteração nas concentrações endógenas de auxina na planta constitui um pré-requisito para a organogênese nodular em leguminosas (MATHESIUS, 2008), indicando um importante papel deste hormônio na formação e desenvolvimento do nódulo. Estudos em *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* e *Glycine max* evidenciaram que as concentrações mais elevadas de AIA foram observadas no estágio inicial na formação do primórdio do nódulo (MATHESIUS et al. 1998, PACIOS-BRAS et al., 2003, VAN NOORDEN et al., 2007; TAKANASHI et al., 2011; SUZAKI et al., 2012; TURNER et al., 2013). A formação de raízes laterais é regulada pela auxina em cada estágio de seu crescimento (LAVENUS et al., 2013). Em *Arabidopsis thaliana*, oscilações na sinalização de auxina no meristema basal, que dá origem a medula e ao câmbio cortical, estão correlacionados com a emergência da raiz lateral (DE SMET et al., 2007). Além disso, a sinalização por auxina é necessária para iniciar a divisão celular nas células do periciclo, que originarão as raízes laterais (DE SMET et al., 2007; DUBROVSKY et al., 2008; LASKOWSKI et al., 2008). Tanto a iniciação como o surgimento subsequente de raízes laterais está associado ao aumento localizado na concentração de auxina, que dependem de transportadores de influxo de auxina membros da família AUX-LAX, sendo todas essas etapas importantes para a organogênese nodular (MARCHANT et al., 2002).

Modelos computacionais predizem que é provável que a auxina acumule no primórdio do nódulo através da regulação do transporte de auxina, em particular reduzindo sua exportação (Deinum et al., 2012). O transporte deste hormônio ocorre através do floema para os tecidos e através do transporte ativo de célula para célula (Peer et al., 2010). O principal fitormônio encontrado em plantas é o AIA, e é ativamente transportado para células por importadores de auxina da família das permease AUX1 (Auxin resistente 1), LAX (Like-AUX1) e PGP4, um membro da família MDR / PGP (Resistência a Multidroga/ P-glicoproteína). A exportação de AIA é mediada por membros das famílias PIN e PGP. A localização de proteínas PIN na membrana da célula determina a direção do transporte de auxina, podendo ser do lado basal, apical ou lateral da célula (FERGUSON & MATHESIUS, 2014).

1.4.1. Papel da auxina na simbiose rizóbio-leguminosa

Outro fator importante para a simbiose é a síntese de fitormônios, como as auxinas por rizóbio. Em geral, raízes com nódulos contêm mais auxina do que as raízes não noduladas (BADENOCHJONES et al., 1983; GHOSH & BASU, 2006). A atuação de AIA já foi relatado durante os estágios iniciais do processo de infecção, como o encurvamento do pelo radicular, desenvolvimento do cordão de infecção, iniciação de nódulos e diferenciação de nódulos (PII et al., 2007; MATHESIUS, 2008). Outros trabalhos indicam que mudanças nas concentrações de auxina e o balanço entre os fitormônios citocinina e auxina, são pré-requisitos para a organogênese dos nódulos (MATHESIUS, 2008; SUZAKI; et al., 2013; CHAMPION et al., 2015; LAPLAZE et al., 2015; KOHLEN et al., 2018).

O fitormônio auxina está envolvido em muitos processos de formação de nódulos por rizobio em plantas de leguminosas, como diferenciação de nódulos (acumulação de auxina), formação de feixe vascular e número de nódulos (transporte de auxina de longa distância). Como muitos rizobios são capazes de produzir AIA através de rotas diferentes, presume-se que a auxina produzida por bactérias pode alterar o equilíbrio de auxina endógeno da planta. Além disso, o rizóbio também pode influenciar indiretamente a homeostase das auxinas ao interferir com o transporte de auxina vegetal (MATHESIUS, 2008). Os nódulos induzidos por mutantes de *Rhizobium* que possuem baixa produção de AIA, apresentam menos AIA em relação a nodulos induzidos por estirpes selvagens (THEUNIS, 2005).

De maneira contrária, bacterióides mutantes de *B. Japonicum* superprodutores de AIA, produzem maiores quantidades de AIA (HUNTER, 1989). Também em *R. leguminosarum* bv. *viciae*, a introdução e a expressão da rota de biosíntese de AIA via IAM resultaram em nódulos radiculares de *Vicia hirsuta* contendo até 60 vezes mais AIA do que nódulos induzidos pela cepa selvagem, além da capacidade aumentada de fixação biológica de nitrogênio (CAMERINI et al., 2008). A superexpressão da mesma rota de biosíntese (via IAM) em *Sinorhizobium meliloti* resultou em maior tolerância a vários estresses; além disso, plantas de *M. truncatula* inoculadas com essa cepa apresentam maior concentração de AIA em nódulos e suas raízes apresentaram melhor resistência ao estresse salino (BIANCO & DEFEZ 2009). Ainda, a inoculação de *M. truncatula* com estirpe superprodutora de

AIA resultou em melhor crescimento da planta sob deficiência de fósforo, devido à liberação de ácidos orgânicos pela bactéria (BIANCO & DEFEZ 2010). Nos estudos de co-inoculação com *Azospirillum* e *Rhizobium*, observa-se uma nodulação mais precoce e mais rápida e maiores rendimentos das culturas. Além disso, o número de nódulos e a fixação biológica do nitrogênio são aumentados. *Azospirillum ipdC*, um mutante que produz apenas 10% do AIA produzido pela estirpe selvagem, não promoveu aumento na nodulação e na fixação de nitrogênio quando co-inoculada com rizóbio, indicando que a produção bacteriana de AIA é importante para a simbiose (REMANS et al., 2008). Uma ampla gama de alterações no padrão de expressão de proteínas pode ser observada em *M. truncatula* em resposta ao tratamento com auxina e inoculação com *S. meliloti*, provavelmente devido à regulação dessas proteínas por auxina nos estágios iniciais da nodulação (VAN NOORDEN et al., 2007).

Embora as etapas iniciais da formação de nódulos são induzidas apenas pelos fatores de nodulação, a biossíntese de AIA pelos rizóbios pode ser importante em etapas mais avançadas da nodulação, como mostram trabalhos nos quais mutantes deficientes na biossíntese de AIA são prejudicados na capacidade de fixação de nitrogênio, enquanto que um aumento da eficiência da nodulação foi observado por estirpes superprodutoras de AIA. Entretanto, estas alterações variam dependendo do tipo de nodulação encontrada na planta (PII et al., 2007).

1.4.2. Biossíntese de auxina

A auxina é sintetizada no meristema apical das plantas, podendo também ser produzida por bactérias em associação com vegetais, através de diferentes vias metabólicas, sendo a que utiliza o aminoácido L-triptofano como precursor considerada a principal. 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 adição de triptofano em culturas de rizobactérias resulta em maior produção de AIA por ser o principal precursor deste fitormônio. A biossíntese do triptofano ocorre a partir de corismato, envolvendo cinco reações catalisadas por enzimas codificadas por um número variável de genes dependendo do microrganismo (DOSSELAERE & VANDERLEYDEN, 2001; MERINO et al., 2008).

Pelo menos cinco vias de biossíntese de auxina a partir do triptofano já foram descritas em bactérias, que são: indol-3-acetamida (IAM), oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) indol-3-acetonitrila (IAN), triptamina (TAM) e indol-3-ácido pirúvico (IPyA), (PATTEN; GLICK, 1996; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; SPAEPEN, 2015). As vias de biossíntese de AIA foram identificadas utilizando vários métodos genéticos e bioquímicos. No entanto, nem todos os genes e enzimas foram caracterizados.

A rota indol-3-acetamida (IAM) é a via melhor caracterizada em bactérias. Nesta via, o triptofano é primeiro convertido para IAM pela enzima triptofano-2-monoxigenase. Posteriormente, o IAM é convertido para AIA por uma IAM hidrolase. Na bactéria fitopatogênica, *Pseudomonas savastanoi*, os genes que codificam para as duas enzimas foram clonados e caracterizados, sendo denominados *iaaM* para a triptofano-2-monoxigenase e *iaaH* e para a IAM hidrolase (MORRIS, 1986). Estudos com outras bactérias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum*, e espécies de *Rhizobium* também encontraram genes relacionados a esta via (MORRIS, 1986; SEKINE et al., 1989; THEUNIS et al., 2004). A rota IAM tem sido descrita como específica para bactérias, mas sua ocorrência em *A. thaliana* também já foi relatada e estudos têm proposto IAM como um dos compostos endógenos desta planta (POLLMANN et al., 2002; SPAEPEN et al., 2007).

A via de biossíntese da oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) foi descrita apenas em *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Nesta via, o triptofano é convertido diretamente em indol-3-acetaldeído (IAAld) que posteriormente é oxidado para AIA (OBERHANSLI et al, 1991). Ainda não há relatos de ocorrência desta via em plantas (SPAEPEN et al.,, 2007).

A rota da triptamina (TAM) ocorre tanto em plantas como em bactérias. Nas plantas, inicia-se com a descarboxilação do triptofano para produzir triptamina pela atividade da enzima triptofano descarboxilase (TDC), codificada pelo gene *tdc*. Posteriormente, a triptamina é convertida em indol-3-acetaldeído (IAAld) que é então oxidado a AIA por uma reação de oxidação catalisada pela enzima amina oxidase (PATTEN & GLICK, 1996; TAIZ & ZEIGER, 2009). Nas bactérias, a via TAM foi identificada em *Bacillus cereus* pela atividade de descarboxilase no triptofano (PERLEY & STOWE, 1966) e em *Azospirillum brasilense* por detecção da conversão de triptamina exógena para AIA (HARTMANN et al., 1983).

A rota indol-3-acetonitrila (IAN) tem sido muito estudada em plantas, mas sua ocorrência em bactérias também já foi relatada. Nesta via, o mecanismo de conversão de triptofano a IAN ainda não foi elucidado, mas são 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 (BARTLING et al., 1994; NONGBRI et al., 2012). Por outro lado, as etapas envolvidas na conversão do IAN em AIA já são conhecidas, podendo ocorrer 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 foi detectada a 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 em AIA (SEKINE et al., 1989; VEGA-HERNÁNDEZ et al., 2002; TAIZ & ZEIGER, 2009). Nas plantas, esta rota parece ser importante em três famílias: Brassicaceae, Poaceae e Musaceae. Todavia, genes e atividade de nitrilase têm sido identificados nas famílias Cucurbitaceae, Solanaceae, Fabaceae e Rosaceae (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A rota indol-3-piruvato (IPyA) é sugerida como a principal via de biossíntese de AIA em plantas, no qual 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:metilviologenica oxidoreductase (IMOR), foi observada na arqueobactéria 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 a indução deste gene em *B. japonicum* na presença de AIA, atribuindo uma função de regulação da produção de AIA via degradação de IPyA em indol-acetil-CoA. Van 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. Em bactéria, a via IPyA tem sido descrita em vários gêneros de bactérias como *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e na bactéria fitopatogênica *Pantoea agglomerans* (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). A primeira etapa desta via é a conversão do triptofano em IPyA por

uma aminotransferase pelo processo de transaminação, em seguida IPyA é descarboxilado a indol-3-acetaldeído (AIAld) pela indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC). Na última etapa, AIAld é oxidado a AIA pela IAAld desidrogenase codificada pelo gene *ialdH* (BRANDL & LINDOW, 1996; PATTEN; GLICK., 1996; SPAEPEN; VANDERLEYDEN., 2011).

Recentemente, Imada e colaboradores (2017) verificaram que o indol-3-piruvato é o principal intermediário de biossíntese de AIA em *R. tropici* CIAT899. Os genes *y4wE*, *lao* e *iorA* foram identificados pela análise do genoma de *R. tropici* *in silico* sendo regulados positivamente pelo triptofano, indicando um possível papel desses genes na biossíntese AIA na estirpe CIAT899,

1.4.3. Regulação da biossíntese de auxina

Enquanto os relatos sobre a biossíntese de AIA nas bactérias são numerosos, a regulação da biossíntese deste fitormônio é documentada somente em algumas bactérias. O caso mais bem documentado pelo qual o efeito de fatores ambientais está ligado, embora parcialmente, aos elementos genéticos é *A. brasilense*, um membro do grupo de Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RBCP). *A. brasilense* sintetiza AIA a partir do triptofano por três vias distintas: IPyA, TAM e IAN (CARRENO-LOPEZ et al. 2000; SPAEPEN et al., 2007). Duas aminotransferases, AAT1 e AAT2, foram caracterizados e são codificadas respectivamente pelos genes *hisC1* e *hisC2* (PEDRAZA et al., 2004; CASTRO-GUERRERO et al., 2012). A enzima chave desta via é a indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC), que é codificada pelo gene *ipdC* (CARRENO-LOPEZ et al., 2000; SPAEPEN et al., 2007). O gene chave na produção de AIA por *A. brasilense* Sp245, *ipdC*, é estritamente regulado. A produção AIA em *A. brasilense* Sp245 aumenta durante seu crescimento, com a maior produção na fase estacionária. O aumento da produção de AIA é precedido por um aumento da expressão do gene *ipdC*. A expressão do gene *ipdC* é ainda aumentada pela adição de AIA ao meio de cultura, indicando uma regulação por retroalimentação positiva pelo produto final AIA pela via IPyA. Outras auxinas, como o ácido naftaleno acético e o ácido fenilacético também induzem a expressão do gene *ipdC* (VANDE BROEK et al., 1999, SOMERS et al., 2005). O gene *ipdC* de *A. brasilense* Sp245 foi o primeiro gene bacteriano descrito por ser regulado por auxinas.

Em *Pseudomonas putida* GR12-2 e *Pseudomonas agglomerans*, a expressão de *ipdC* é regulada por RpoS (BRANDL et al., 2001; PATTEN & GLICK 2002). RpoS é conhecido por regular a transcrição de genes em resposta a condições de estresse. Em *Pseudomonas chlororaphis*, o sistema de dois componentes GacS / GacA atuam como um regulador negativo da biossíntese AIA dependente de triptofano (HAAS & KEEL 2003, KANG et al., 2006). O sistema GacS / GacA controla a expressão de muitos genes, que são induzidos durante a fase estacionária de crescimento.

Em *Enterobacter cloacae* UW5, um gene TyrR box putativo, semelhante à sequência de reconhecimento de TyrR, foi encontrada na região promotora do gene *ipdC*. TyrR é uma proteína reguladora envolvida no transporte e metabolismo de aminoácidos aromáticos. O TyrR está diretamente envolvido na indução da expressão do gene *ipdC* em *E. cloacae* em resposta a triptofano, fenilalanina e tirosina, sugerindo uma função mais ampla de indol-3-piruvato descarboxilases (RYU & PATTEN 2008).

Em *Xanthomonas axonopodis*, a produção de AIA é aumentada na presença de extrato de folha da planta hospedeira *Citrus sinensis* (COSTACURTA et al., 1998). Em *P. agglomerans*, a expressão do gene *ipdC* é aumentada quando a bactéria é cultivada em superfícies vegetais, mas os compostos específicos envolvidos ainda são desconhecidos (BRANDL & LINDOW, 1997).

Em *Rhizobium* sp. NGR234, moléculas de flavonóides podem induzir a produção de AIA e os reguladores de transcrição NodD1 e NodD2, em combinação com nod-box NB15 à montante do operon de biossíntese AIA (THEUNIS et al., 2004). Até o momento pouco se sabe sobre regulação de biossíntese de AIA por *Rhizobium*, mas estudos recentes mostram que a síntese de AIA por CIAT 899 é fortemente inibida por amônio. Imada et al (2017) verificaram que os níveis de AIA em meio YM complementando com Trp e amônio foram muito menores que os níveis de AIA em meio YM complementado apenas com Trp. Além disso, a diminuição de AIA em culturas cultivadas na presença de NH_4^+ reforça o efeito inibitório dessa forma combinada de N no estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa.

1.5 Proteômica

Com os avanços das técnicas na área da genômica funcional, foi possível sequenciar completamente o genoma de vários organismos devido os significados

avanços no desenvolvimento, integração e automatização de várias técnicas e equipamentos. Entretanto, a obtenção da sequência de nucleotídeos do genoma de um organismo representa apenas a primeira etapa para a realização de diversos estudos a respeito do entendimento da regulação da expressão gênica (SANTOS et al., 2004). . Trabalhos de transcriptômica são importantes fornecedores de informações sobre a constituição genética transcrita de um organismo em uma determinada condição, mas ela não reflete diretamente o produto final da expressão dos genes, sendo que podem ocorrer modificações estruturais das proteínas após a transcrição e que podem resultar em classes protéicas que desempenham diferentes funções (GYGI et al., 1999; CHEN & HARMON, 2006).

A proteômica tem como objetivo obter uma visão global e integrada do maior número de proteínas expressas em uma determinada condição, ao invés de estudar proteínas individualmente (SANTUCCI et al., 2015). Em geral, a proteômica permite estudos da expressão diferencial de proteínas, das modificações pós-traducionais, das interações proteína-proteína, e das função desempenhadas por determinadas proteínas em um evento biológico específico (DIAS et al., 2010). Ao contrário do genoma, o proteoma de um organismo é extremamente dinâmico, pois são alterados diferencialmente em resposta a uma variável, como condições abióticas adversas, condições patológicas, diferenciação entre cepas/estirpes, alguma substância presente no meio, estágio do ciclo de crescimento, entre outros. Através de uma abordagem comparativa, é possível identificar proteínas diferencialmente expressas na condição estudada, permitindo a elucidação de questões relevantes sobre os mecanismos genéticos e bioquímicos das quais são participantes (CORDWELL et al., 2001). Para estudos em proteômica é fundamental obter amostras de qualidade, portanto o processo de extração deve ser padronizado e otimizado para obter alta reprodutibilidade dos resultados, evitar perdas de parcelas de amostras, entre outros. Considerando que um proteoma deve refletir as condições fisiológicas, é essencial que todos os parâmetros experimentais sejam rigorosamente controlados e cada variável seja analisada em separado (GÖRG et al., 2004). A proteômica obteve sucesso com o desenvolvimento de tecnologias capazes de realizar a análise de misturas complexas, como extratos de proteínas totais de um organismo (RABILLOUD, 2002).

A integração de dados provenientes da expressão e regulação do proteoma, possibilita uma visão integrada e sistemática que viabiliza uma compreensão e o

entendimento mais detalhado sobre a organização e funcionamento do sistema biológico. A pretensão de conhecer os genes, mRNAs, metabólitos e proteínas da célula, em determinadas condições, constitui um dos maiores desafios das ciências biológicas. Com os avanços nas técnicas de proteômica e nas análises por espectrometria de massas, a proteômica tem se tornado uma estratégia alternativa no estabelecimento de marcadores bioquímicos e uma das mais utilizadas para análises metabólicas e de expressão gênica (SHEORAN et al., 2005; PAWLOWSKI, 2007).

1.5.1. Espectrometria de massa para proteômica *shotgun*

A proteômica baseada em espectrometria de massas evoluiu de forma muito expressiva, uma vez que é possível a identificação de mais de 4000 proteínas em uma única corrida, sem fracionamento, em um gradiente de 4 horas (NAGARAJ et al., 2012). Na identificação de proteínas, as proteínas do extrato total são pré-fracionadas por eletroforese e então digeridas e análise é feita por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, denominada proteômica por eletroforese bidimensional (2-DE). De acordo com o intuito da pesquisa e das técnicas disponíveis, algumas modificações nas etapas de processamento podem ser modificadas (LIU et al., 2002; YATES et al., 2009; MALLICK & KUSTER, 2010; ZHANG et al., 2013). Embora a proteômica por 2-DE tenha trazido importantes contribuições para área, essa técnica limita-se em sensibilidade, faixa dinâmica e reprodutibilidade (KOOMEN, et al., 2008).

A proteômica *shotgun* pode ser representada por várias terminologias, incluindo Shotgun-MS, cromatografia líquida em *tandem* (LC-MS/MS) e tecnologia multidimensional de identificação de proteínas (MudPIT). A proteômica *shotgun* foi originalmente projetada como uma abordagem direta (sem gel/MS) para evitar as desvantagens da proteômica 2-DE (LINK et al., 1999; PENG & GYGI, 2001), embora o uso de técnicas baseadas em gel podem ser combinadas com shotgun-MS.

A abordagem de uma análise *shotgun* é digerir todo o proteoma de interesse usando enzimas específicas e posteriormente identificar os péptidos resultantes por MS. Dado que a etapa de digestão aumenta a complexidade do proteoma, é necessário uma ou mais etapas de pré fracionamento do peptídeo antes das análises por MS/MS para melhorar a cobertura do proteoma. No fluxo de trabalho

geral de *shotgun*-MS, uma das etapas de fracionamento consiste em cromatografia líquida ou outros métodos de cromatografia que são acoplados ao espectrômetro de massa para separação de peptídeos (LINK et al., 1999). O estudo de proteínas requer ferramentas analíticas com alta seletividade e resolução (POMASTOWSKI & BUSZEWSKI, 2014). Para a identificação de proteínas, existem vários algoritmos comumente usados que permitem a atribuição automatizada de espectros MS/MS, combinando dados adquiridos com espectros previstos nos bancos de dados de sequências de proteínas em genomas já sequenciados.

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão/massa carga (m/z). Basicamente, este instrumento é composto por uma fonte ionizante, analisador(es) e detector(es). Durante a operação, primeiramente, o analito é ionizado na fonte e acelerado por ação de um campo elétrico. Que transforma a sua energia potencial elétrica em energia cinética. Na segunda etapa, o(s) analisador(es) separa(m) íons de acordo com sua razão m/z para obtenção do perfil de massas (MS1), ou selecionam íons com m/z previamente escolhidos e os submetem à fragmentação em um processo denominado “espectrometria de massa em tandem” (MS2 ou MS/MS). O detector juntamente com o computador compõem a etapa final do processo, registrando e amplificando a corrente iônica oriunda do analito e representando o sinal do espectro de massa a ser interpretado pelo operador ou por programas de bioinformática. O espectro de massas é representado graficamente, empregando a abscissa para quantificar a intensidade da corrente iônica e a ordenada evidenciando a razão massa/carga dos íons (FENN et al., 1989).

Inicialmente, a proteômica baseada em espectrometria de massas era essencialmente qualitativa. Um típico experimento proteômico resultava em uma lista de proteínas identificadas, sem nenhuma informação a respeito da abundância ou distribuição. Hoje, o grande desafio da proteômica é torná-la uma disciplina quantitativa, ou seja, capaz de evidenciar alterações em abundância de proteínas em diferentes condições ou ao longo do tempo. Desta forma, a proteômica quantitativa possibilita o estudo da alteração de inúmeros sistemas biológicos, tanto em termos de expressão, quanto de modificações pós-traducionais e interações com outras proteínas de um sistema biológico.

Existem duas estratégias para comparar abundância de proteínas entre amostras, utilizando dados de espectrometria de massas: (i) Contagem espectral

(*spectral counting*) e (ii) Intensidade do peptídeo. A primeira se baseia no princípio de que quanto mais abundante a proteína está na amostra, maior será número de vezes que determinado(s) peptídeo(s) dessa proteína será selecionado e fragmentado, portanto maior será o número de espectros desse peptídeo (MANN & KELLEHER, 2008). Embora essa abordagem seja largamente utilizada, a acurácia na quantificação de proteínas pouco abundantes, ou seja, com baixas contagens de espectros, é reduzida. Se uma proteína é identificada em diferentes amostras com apenas uma contagem de espectro, por exemplo, ela será considerada igualmente abundante entre as amostras, porém as intensidades desse peptídeo podem ser diferentes (SCHULZE & USADEL, 2010). Além disso, peptídeos gerados pela clivagem proteolítica possuem diferentes propriedades físico-químicas (tamanho, carga, hidrofobicidade) e capacidade de ionização, as quais influenciam a detectabilidade e intensidade de sinal na análise por espectrometria de massas (ONG & MANN, 2005). Portanto, a comparação entre diferentes peptídeos de uma mesma proteína limita a acurácia na quantificação.

Alguns programas de análise de dados proteômicos atribuem como dado quantitativo a intensidade do peptídeo, a qual é obtida pela área sobre a curva de um cromatograma de íons extraídos (XIC). Essa abordagem possui maior acurácia na quantificação em comparação com uma contagem espectral quando se relaciona a intensidade de um mesmo peptídeo entre as amostras. Porém, a presença de interferentes na amostra (detergente ou proteínas muito abundantes), a não reprodutibilidade da corrida cromatográfica e o método estocástico de análise dependente dos dados acarretam erros e variabilidade no processo, limitando a quantificação (ONG & MANN, 2005).

A proteômica *shotgun* é aplicada, sobretudo em estudos nos quais busca-se conhecer as proteínas que estão com a expressão alterada sob determinado estímulo ou condição e, dessa forma, levantar hipóteses quanto aos mecanismos moleculares por trás dos processos biológicos ou respostas fenotípicas das células. Tendo em vista que não se sabe a priori as proteínas que irão ser identificadas, a estratégia de proteômica baseada em descoberta (*discovery-based proteomics*) é aplicada neste caso. Nesta abordagem, o foco está na identificação e quantificação relativa de um maior número possível de proteínas ou modificações pós-traducionais em um sistema biológico (MARX, 2013).

Em um experimento de proteômica baseada em descoberta, o espectrômetro é operado principalmente em um modo de aquisição dependente dos dados (*data-dependent acquisition*, DDA), no qual se utiliza a informação de um espectro de varredura (*full MS scan*) para selecionar os íons para fragmentação em um segundo experimento de espectrometria de massas sequencial. Dentre os tipos de aquisição por DDA, o mais utilizado é o método de aquisição em ciclos contínuos de *full MS scans* seguidos de isolamento dos íons mais abundantes para subsequentes fragmentações (*MS/MS scans*), gerando o que chamamos de “seleção aleatória ou estocástica dos íons”. Após a obtenção das *m/z* dos fragmentos e da informação da massa do precursor, a proteína pode ser identificada, utilizando uma busca contra um banco de dados (DOMON, 2010).

Uma vez que os espectros de MS e MS/MS são gerados no equipamento analítico, como explicado anteriormente, softwares de busca devem ser utilizados para identificar as proteínas em bancos de dados. A etapa inicial do processamento de dados de MS é a detecção do pico, que envolve a diferenciação entre sinal e ruído e extração precisa das massas de cada pico no espectro, utilizando para isso características como intensidade, padrão isotópico e tempo de retenção de precursores e fragmentos. Em seguida, essa lista de massas é submetida a algoritmos de busca, cujo objetivo final é a identificação da sequência de peptídeo que melhor correlaciona ao espectro observado (SADYGOV et al., 2004).

1.5.2. Software - PatternLab for Proteomics

O PatternLab for *Proteomics* é um ambiente computacional integrado para análise de dados proteômicos *shotgun* (CARVALHO et al., 2016). O PatternLab contém módulos para formatar bases de dados de sequências, realização de *peptide spectrum matching* (PSM), filtragem e organização estatística de dados proteômicos *shotgun* extraindo informações quantitativas de dados marcados quimicamente e não marcados quimicamente (*label-free*) realizando estatísticas de proteômica diferencial, exibindo resultados em vários formatos gráficos, fazendo semelhança de estudos desenvolvidos com dados de sequenciamento de novo, análise de experimentos em *time-course* e auxilia na compreensão dos dados biológico utilizando o Gene Ontology (CARVALHO et al., 2016). Na análise por TFold cada proteína é mapeada no gráfico (representada como um ponto) de acordo com seu

\log_2 (*fold change*) no eixo de ordenadas e seu $-\log_2$ (*p*-valor) no eixo das abcissas, que indica a probabilidade do *fold-change* observado ser resultado do acaso. As mudanças de *fold-change* referem-se às razões dos valores médios de quantificação relativa obtida para cada condição biológica. Consequentemente, os pontos em vermelho são proteínas que não satisfazem o corte de *fold-change* e corte de FDR *q-value*. Os pontos em verde são proteínas que satisfazem o limite de *fold-change*, mas não o *q-value*. Pontos em laranja são proteínas que satisfazem ambos corte de *fold-change* e o *q-value*, porém sendo proteínas de baixa abundância. Finalmente, os pontos azuis são proteínas que satisfazem ambos filtros estatísticos (corte de *fold-change* e FDR *q-value*) (CARVALHO et al. 2012)

O PatternLab é um software livremente disponível no qual Carvalho e colaboradores (2016) constantemente o atualizam de acordo com as necessidades dos usuários. Desde o seu lançamento em 2008, o PatternLab esta em contínua melhora e expansão. A primeira versão foi limitada a trabalhar com contagem espectral, e ofereceu estratégias para identificar proteínas diferencialmente expressas, mas todos os módulos desde então foram substituídos por versões mais sofisticadas. Tais atualizações importantes deram origem ao primeiro protocolo principal do software em 2010 (CARVALHO et al., 2010). Graças ao fluxo contínuo de sugestões de seus vários usuários, os módulos continuaram evoluindo e surgiram novos módulos, como o *Search Engine Processor* (SEPro) para filtrar e organizar dados de proteômica *shotgun* e um módulo para XICs. Recentemente, Zhang e colaboradores (2017) avaliaram os principais softwares para análise de dados proteômicos através de avaliação geral denominada *Null-Test* para o algoritmo de identificação de peptídeos em proteômica *shotgun*. O método *Null-Test* baseado na comparação aleatória pode ser utilizado para verificar se o algoritmo tem uma tendência a cometer um erro ou tem potenciais erros, falhas e etc. e validar a confiabilidade do algoritmo de identificação. O PatternLab teve um bom desempenho no *Null-Test* ao comparado com os outros quatros softwares (Mascot, Morpheus, pFind, e MaxQuant) muito utilizados em análise proteômica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo comparar o proteoma de *R. tropici* CIAT899 cultivada na presença ou ausência do aminoácido L-triptofano visando identificar proteínas diferencialmente expressas em resposta ao L-triptofano e ampliar a compreensão sobre o papel deste aminoácido na fisiologia e metabolismo de *R. tropici*, bem como na biossíntese de ácido indol-3-acético (AIA), um fitormônio importante para a simbiose e nodulação de plantas leguminosas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do triptofano e de amônio na produção de auxinas (compostos indólicos) e no crescimento de CIAT899;
- Extrair, analisar e identificar proteínas expressas por CIAT899 cultivado na presença ou ausência de triptofano por cromatografia líquida em nano escala acoplada à espectrometria de massa (nanoLC-MS/MS);
- Comparar o proteoma de CIAT899 cultivado na presença ou ausência de triptofano.
- Identificar proteínas diferencialmente expressas de CIAT899 em resposta ao triptofano.

3. MANUSCRITO

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Rhizobium tropici* CIAT899 EM RESPOSTA AO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO

Manuscrito a ser submetido à publicação em periódico Internacional

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *Rhizobium tropici* CIAT899 EM RESPOSTA AO AMINOÁCIDO L-TRIPTOFANO

Cátia Lie Yokoyama ^a, Mariangela Hungria ^b, Elisete Pains Rodrigues ^a

^a Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, PR-445, Km 380, Campus Universitário, PO Box 6001, CP 86.051-970, Londrina, PR, Brasil

^b Laboratório de Biotecnologia do Solo, Embrapa Soja, PO Box 231, CP 86.001-970, Londrina, PR, Brasil

Autora correspondente:

Elisete Pains Rodrigues, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina/PR, Brasil. Phone: +55 (43)3371-4417; e-mail: bioliza@gmail.com

RESUMO

A simbiose entre rizóbio-leguminosa resulta na formação de nódulos radiculares, maximizando os benefícios da fixação biológica de nitrogênio (FBN). O estabelecimento da simbiose e formação dos nódulos é um processo complexo e regulado por ambos os parceiros, sendo o fitormônio auxina (AIA), um dos fatores envolvidos na regulação da biogênese do nódulo. Devido à importância de AIA no estabelecimento de relações simbióticas entre rizóbios e leguminosas, o presente trabalho teve como objetivo analisar a produção de auxinas de CIAT899 na presença de TRP e amônia e comparar o proteoma de CIAT899 na presença e na ausência de TRP, visando identificar proteínas que sejam reguladas por este aminoácido. Para os ensaios experimentais, CIAT899 foi cultivada em meio YM em quatro condições biológicas (sem TRP; com TRP; com NH_4^+ ; com TRP e NH_4^+), com três repetições. A produção de auxinas foi avaliada com o reagente de Salkowski e o crescimento por absorbância. Para análise proteômica, as proteínas foram analisadas por nanoLC-MS/MS. Os dados obtidos revelaram que a produção de auxinas em CIAT899 é estimulada pelo L-triptofano. Na análise diferencial, entre YM versus YM+TRP, foram identificadas 617 proteínas totais, no qual 164 foram exclusivamente expressas na ausência de TRP, e 112 na presença de TRP. Análise utilizando KEGG permitiu mapear mais de 90 vias metabólicas, no qual a via com maior número de identificações foi a biossíntese de metabólitos secundários. Na análise utilizando no GO foi identificado principalmente proteínas relacionadas à atividade catalítica, parte da célula e processos metabólicos e celulares. As análises no TFold foram identificadas 10 proteínas diferencialmente expressas que satisfazem ambos testes estatísticos (fold-change e p-value), 28 proteínas atenderam apenas o corte de fold-change e 8 proteínas que são consideradas diferencialmente expressas, mas com baixa abundância. Os principais processos que foram alterados em resposta ao aminoácido triptofano foram: metabolismo de sideróforo, biossíntese de polissacarídeos de superfície celular, atividade de locomoção e biossíntese e metabolismo de aminoácidos aromáticos. Os resultados indicam que triptofano e/ou AIA atuam modulando a expressão de um grande conjunto de genes, muitos aparentemente sem envolvimento direto com o processo de FBN ou de simbiose.

Palavras-chave: Rizóbio; proteômica shotgun e compostos aromáticos

INTRODUÇÃO

A simbiose entre bactérias do grupo rizóbio e plantas leguminosas resulta na formação de estruturas especializadas na planta hospedeira, os nódulos radiculares. A formação dos nódulos é fundamental para o fornecimento de nitrogênio via fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas e, portanto, essencial para o crescimento e desenvolvimento saudável da planta. A formação de nódulos inicia com a troca de sinais moleculares entre a planta e o rizóbio, que responde aos exsudatos liberados pela planta, principalmente flavonoides, produzindo os fatores de nodulação (fator Nod) que induzem o encurvamento dos pelos além de outras modificações radiculares que resultam na infecção e formação dos nódulos. Nos nódulos, os rizóbios se diferenciam em bacteroides, realizam a FBN e transferem o N fixado para a planta hospedeira (BEATTIE, 2006). *R. tropici* CIAT899 (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991) é nativa das regiões tropicais da América do Sul e se caracteriza pela sua tolerância a temperaturas elevadas (40° C) e à acidez, condições comuns encontradas nos solos brasileiros. Além disso, CIAT899 apresenta maior estabilidade genética em comparação com outras espécies do gênero *Rhizobium*, mantendo suas propriedades simbióticas mesmo sob estresse (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991). No Brasil, a estirpe CIAT899 é recomendada para uso agrícola como inoculantes comerciais para cultura do feijão e sua utilização tem resultado em aumentos médios na produção de 414 kg ha⁻¹ (MOSTASSO et al., 2002; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2003;).

Um fator essencial no estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa é o fitormônio auxina, sendo o ácido indol-3-acético (AIA) o mais importante. Em plantas, o AIA é fundamental ao crescimento vegetal e regula diversos processos fisiológicos do desenvolvimento da planta. Muitos estudos indicam que mudanças nas concentrações de AIA e o balanço entre AIA e o fitormônio citocinina, são pré-requisitos para a organogênese dos nódulos (MATHESIUS, 2008; SUZAKI et al., 2013; CHAMPION et al., 2015; LAPLAZE et al., 2015; KOHLEN et al., 2018).

Além das plantas, diversas espécies de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) são conhecidas por produzir auxinas, sendo o AIA uma molécula sinalizadora importante nas interações planta-bactéria (DE BILLY et al., 2001; WOODWARD & BARTEL, 2005; SPAEPEN et al., 2007; DING & OLDROYD, 2009; SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011). A produção de auxinas é descrita em várias

espécies de rizóbio, como *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Rhizobium phaseoli*, *Mesorhizobium ciceri* e *Rhizobium tropici* CIAT899 (WANI et al., 2007; ETESAMI et al., 2009; ZAHIR et al., 2010; IMADA et al., 2017).

A biossíntese de AIA é bastante estudada em alguns grupos de bactérias, onde alguns genes e intermediários das vias de biossíntese têm sido caracterizados (PATTEN & GLICK, 1996; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). São conhecidas até o momento cinco vias de biossíntese a partir do aminoácido precursor, o L-triptofano (TRP), as quais são nomeadas pelos seus intermediários como indol-3-acetamida (IAM), indol-3-acetonitrila (IAN), triptamina (TAM), indol-3-ácido pirúvico (IPyA) e oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) (PATTEN & GLICK, 1996; SPAEPEN et al., 2007; KOCHAR et al., 2011).

A biossíntese de AIA via IPyA é uma das mais comuns em bactérias e tem sido descrita em diversas espécies dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter* sp., *E. Pantoea* (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; SPAEPEN & VANDERLEYDEN, 2011; SPAEPEN, 2014). Recentemente, Imada e colaboradores (2017) verificaram que o IPyA é o principal intermediário de biossíntese de AIA em *R. tropici* CIAT899 e que a produção deste fitormônio é estimulada por triptofano e reduzida na presença de amônia. Neste mesmo trabalho, os genes *y4wE*, *lao* e *iorA*, identificados *in silico* no genoma de *R. tropici* CIAT899, foram regulados positivamente pelo triptofano, sendo a caracterização funcional ainda requerida para confirmação do papel destes genes na biossíntese AIA

Além do seu papel como precursor na biossíntese de AIA, o triptofano é o precursor de uma variedade de metabólitos secundários, tais como rebecamicina, pirrolnitrina, ciclomarina, bacilamida, streptonigrina, notatiacina, entre outros compostos, os quais apresentam uma grande variedade de propriedades como antibióticos, anti-inflamatórios, herbicidas, antifúngicos, anticancerígenos entre outros (ALKHALAF & RYAN, 2015). Além disso, o triptofano tem funções mais básicas, sendo um aminoácido essencial na biossíntese de proteínas e como fonte de nitrogênio.

Além do seu papel na biossíntese de auxinas (IMADA et al., 2017), muito pouco se conhece sobre o metabolismo e a função desempenhada pelo triptofano em *R. tropici* e em outras espécies de *Rhizobium* sp. Visando ampliar a compreensão sobre o papel deste aminoácido na fisiologia de *R. tropici*, bem como na biossíntese

de ácido indol-3-acético (AIA), este trabalho teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente expressas em resposta ao triptofano por meio da análise proteômica *shotgun* da estirpe CIAT899 fornecendo deste modo, informações sobre esta bactéria simbiótica de grande importância econômica e ambiental como biofertilizantes para cultura do feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpe e condições de cultivo

Para realização dos experimentos foi utilizada a estirpe de *R. tropici* CIAT 899 (SEMIA 4077) obtida da coleção de cultura de bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal da Embrapa Soja (CNPQSO, Brasil). A estirpe foi armazenada em glicerol:meio YM (1:1) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantida em placas de meio sólido YM (VINCENT, 1970). Para o preparo do pré-inóculo, 100 μL da cultura criopreservada foram inoculados em 10 mL de meio YM líquido e cultivado por 24h sob agitação orbital de 120 rpm e temperatura constante a $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Avaliação do crescimento e produção de auxinas

Para os ensaios de quantificação de auxinas, 1 mL do pré-inóculo ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de 0,4) foi inoculado em 120 mL de meio líquido YM com ou sem suplementação de L-triptofano ($100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. As bactérias foram cultivadas a $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação orbital de 120 rpm por 48 horas. O crescimento e a produção de auxinas foram monitorados a intervalos regulares de 12 h por até 48 horas. A cada intervalo, uma alíquota de 2 mL de cultura foi coletada e o crescimento foi avaliado por absorbância ($\text{D.O.}_{600\text{ nm}}$). A cultura foi centrifugada (12000 g por 10 minutos) e o sobrenadante obtido foi homogeneizado com o reagente de Salkowski (30 mL de ácido sulfúrico; 50 mL de água destilada; 1 mL de cloreto de ferro 0,5 M) (GORDON & WEBER, 1951) na proporção 1: 4 (v/v) de sobrenadante/reagente. Após reação por 30 minutos no escuro, a absorbância foi avaliada a 530 nm. Para estimativa da quantidade de compostos indólicos no sobrenadante dos cultivos, foi construída uma curva de calibração com concentrações crescentes de AIA sintético (SIGMA) de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$, o qual apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,99. Os ensaios foram realizados com três repetições biológicas (crescimento) e as análises colorimétricas com três repetições técnicas. As análises estatísticas

foram realizadas com o programa SAS-Agri, que é uma sistema para a análise e separação de médias em experimentos (CANTERI et al., 2001) utilizando o teste de Scott-Knott e $p \leq 0,05$ no qual as médias de crescimento e produção de AIA foram analisadas para identificar se o crescimento e produção de AIA foram estatisticamente significativos..

Análise proteômica de *R. tropici* CIAT899

Extração das proteínas e SDS-PAGE

Para análise proteômica, CIAT899 foi cultivado nas condições descritas acima em meio líquido YM com ou sem suplementação de L-triptofano ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com três repetições biológicas por tratamento. Após crescimento por 24 horas, 120 mL da cultura foi centrifugada em ultracentrifuga (10.000 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 minutos) e o precipitado obtido foi ressuspenso em $1,2 \text{ mL}$ de Tris-NaCl (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 100 mM de NaCl). Alíquotas de $400 \mu\text{L}$ da suspensão celular foram transferidas para microtubos (2 mL) e centrifugadas a 10000 g a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O precipitado celular foi armazenado em ultrafreezer ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) até a realização das análises.

Para extração das proteínas totais, o precipitado celular foi ressuspenso em tampão de lise contendo 8 M de ureia, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de NaCl e inibidor de protease (1:100) (GE Healthcare). As células foram lisadas por *freezing-thawing* (congelamento – descongelamento) com 40 ciclos de congelamento em N líquido e descongelamento a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme descrito por BATISTA et al. (2010). O sobrenadante foi separado do material particulado por meio de centrifugação a 12000 g a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 80 min. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando microplaca no qual $2 \mu\text{L}$ de amostra foi diluída em $98 \mu\text{L}$ de água ultra-pura e reagida com $100 \mu\text{L}$ do reagente de Bradford, utilizando uma curva de calibração de albumina (concentração) com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,99 e absorbância avaliada a 595 nm .

A qualidade da extração das proteínas foi avaliada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% (GORDON, 1995). Para este fim, $10 \mu\text{g}$ do extrato protéico obtido foram misturados com $5 \mu\text{L}$ de tampão de amostra ($4\times$ Tris-HCl pH 6,8; 20% glicerol; 4% SDS; $0,2 \text{ M}$ DTT; 0,2% bromofenol) e, em seguida, aplicados no gel de poliacrilamida. O marcador utilizado foi PageRuler™ Unstained Ladder (10 – 200

kDa) Thermo Fisher Scientific, USA. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (1X), a 50V, por 3-4 horas, em seguida foi fixado em solução de metanol (50%); ácido acético (10%); água (40%), por 30 min e corado em solução de coomassie blue R-250 (2 g/L) por 30 min. Após descoloração em solução de descorante de metanol (5%); ácido acético (7%); água (88%) por 24 h, o gel foi visualizado e fotografado.

Preparação das amostras e espectrometria de massa

Alíquotas dos extratos protéicos (100 µg) foram reduzidas com 5 mM de DTT (ditiotreitól) por 25 minutos a 56°C, alquiladas com iodoacetamida (14 mM) por 30 min (no escuro a temperatura ambiente) e digeridas com 2 µg tripsina (Promega) durante 16 h a 37 °C, conforme descrito por Villén e Gygi (2008). Após a digestão, as amostras foram acidificadas com ácido fórmico (concentração final de 1%) para interromper a proteólise e, em seguida, foram concentradas a vácuo a 40 °C (Concentrator Plus, Eppendorf). As amostras assim tratadas foram armazenadas a -80 °C para posterior análise no Laboratório de Nacional de Biociências (LNBio, Campinas-SP).

Para análise por espectrometria de massa, os extratos protéicos digeridos foram ressuspensos em ácido fórmico a 1% até atingir o pH 2, dessalinizados em resina C18 (*stage tips*), conforme Ishihama et al. (2007), e concentrados a vácuo (Speed Vacuum; Thermo Fisher Scientific) e reconstituídos em 22,5 µL de ácido fórmico 0,1% (RAPPSILBER et al., 2007). Alíquotas de 2 µL da mistura de peptídeos, correspondendo a uma concentração de 1 µg de proteína, foram analisadas no espectrômetro de massa LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) habilitado para ETD (Dissociação por Transferência de Elétron) e acoplado ao nano LC-MS/MS pelo sistema EASY-nLC (Proxeon Biosystem). Os peptídeos foram separados em uma coluna analítica PicoFrit (20 cm x ID75 µm, 5 µm de diâmetro, New Objective) utilizando um gradiente de acetonitrila (2-30%) em ácido fórmico 0,1%, com uma taxa de fluxo de 300 nL/min por 30 min. A voltagem do *nanoelectrospray* foi configurada para 2,2 kV e a temperatura da fonte a 275 °C. Aquisição dos espectros foi realizada no modo *data dependent acquisition* (DDA). Os espectros de MS foram adquiridos no modo *full scan* (m/z 300-1600) em um analisador Orbitrap após acumulação a um valor alvo de 1×10^6 . A resolução no Orbitrap foi ajustada para $r = 60,000$ e os 20 íons peptídicos mais intensos com estados de carga ≥ 2 foram

isolados sequencialmente a um valor alvo de 5.000 e fragmentados na armadilha de íons linear (*Linear Ion Trap* – LIT) usando baixa energia de dissociação induzida por colisão (CID), com energia de colisão normalizada a 35%. O limite de sinal (*threshold*) para desencadear um evento de MS/MS foi definido para 1.000 contagens. A exclusão dinâmica foi ativada com uma lista de tamanho de exclusão de 500, duração de exclusão de 60 s e uma contagem de repetição de 1. Foi utilizada uma ativação $q = 0,25$ e tempo de ativação de 10 ms (KAWAHARA et al., 2014). As funções de *scan* do espectrômetro de massas e os gradientes dos solventes no nLC foram controlados pelo software Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific). A fim de prevenir viés durante a análise por espectrometria de massas, a ordem de corrida das amostras foi preparada por randomização (OBERG & VITEK, 2009) para os diferentes tratamentos biológicos com auxílio de software R.

Análise de dados

A identificação das proteínas expressas e a análise diferencial foram realizadas com as ferramentas e parâmetros estabelecidos na plataforma *PatternLab for Proteomics* versão 4.0.0.74 (CARVALHO et al., 2016). Para a identificação das proteínas, os arquivos .RAW foram analisados usando ferramenta de busca Comet que seleciona os candidatos mais prováveis, através da abordagem PSM (*peptide-spectrum match*) o qual compara os espectros teóricos (obtidos a partir do banco de dados) e os espectros experimentais oriundos do espectrômetro de massas. O banco de dados foi gerado usando a abordagem “*target decoy*” e foi composto de sequências de proteínas de *R. tropici* CIAT899 obtidas do UniProt (“<http://www.uniprot.org/proteomes/>”) acessado em Novembro de 2017, incluindo também sequências de 127 contaminantes comuns a espectrometria de massa (e.g. queratinas). Os parâmetros de busca consistiram em peptídeos aceitos até com 2 clivagens perdidas (“*missed cleavage*”), carbamidometilação de cisteína; 40 ppm de tolerância de massa para o precursor e 1,005 Da de tolerância para os íons fragmento.

A validação dos PSMs foi realizada pela ferramenta *Search Engine Processor* (SEPro) (CARVALHO et al., 2012). Desta forma, as identificações foram agrupadas em quatro grupos distintos, de acordo com a carga do precursor e o estado triptico. Para cada grupo, os valores de XCorr, DeltaCN, DeltaPPM e picos correspondentes foram usados para criar um discriminador Bayesiano e as identificações foram

relatadas em uma ordem crescente dos valores discriminantes. Este procedimento foi realizado de forma independente em cada subconjunto de dados, estabelecendo um valor de corte (*i.e.* FDR < 1%) para que a lista final de identificações tivesse até 1% de falso positivos.

A quantificação das proteínas identificadas satisfazendo um FDR < 0.01 foi realizado por XIC (*Extracted Ion Chromatogram*) (CARVALHO et al., 2016). Esta abordagem considerou apenas proteínas identificadas com ao menos um peptídeo único (ou seja, peptídeos que mapeiam para uma única sequência no banco de dados). Consideramos apenas peptídeos quantificados com 6 ou mais leituras, ao nível de MS1 de intensidade, durante a extração do cromatograma de íons. A seleção de proteínas representativas de cada condição biológica foi realizada pelo diagrama de Venn que indica as proteínas exclusivamente expressas em cada condição biológica, e pelo módulo do TFold que realiza um teste t ($p \leq 0,05$; *fold-change* variável) das proteínas mutuamente expressas e identifica as proteínas diferencialmente expressas.

Para a análise funcional das proteínas identificadas, os códigos das proteínas identificadas foram submetidos ao uniprot (<http://www.uniprot.org/uploadlists/>) para classificação pelo Gene Ontology (GO) conforme a anotação da proteína (componente celular, processo biológico ou função molecular). Para a análise de vias metabólicas, foi utilizado o módulo KEGG Mapper (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html) o qual mostra todas as vias metabólicas identificadas no genoma do seu organismo de interesse. Para a análise de organização genômica foi utilizado o programa PATRIC versão 3.5.8 (<https://www.patricbrc.org/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de auxinas por R. tropici CIAT899

Neste experimento buscou-se avaliar a influência do triptofano e amônio no crescimento e na produção de auxinas (compostos indólicos) de *R. tropici* CIAT899. Esta análise permitiu observar que o crescimento de CIAT899 cultivado na presença de triptofano não diferiu estatisticamente nas primeiras 24 h de cultivo no

experimento 1 e em 48 h de cultivo do experimento 2, entretanto, analisando o cultivo em 24 h e 36 h do experimento 2, houve uma queda no crescimento na presença de triptofano (Tabela 1). A produção de auxinas foi estimulada pelo triptofano, sendo a concentração crescente com o tempo de crescimento evidenciando um acúmulo no meio de cultivo (Tabela 1), como foi observado anteriormente (IMADA et al., 2017).

Imada e colaboradores (2017) quantificaram compostos indólicos em CIAT 899 nas mesmas condições de cultivo deste trabalho, por UPLC-MS e identificaram os compostos AIA, ácido indol-3-lático (ILA), ácido indol -3-pirúvico (IPyA) e antranilato (ANT). O aminoácido triptofano é precursor da biossíntese de AIA sendo a produção estimulada em diversas bactérias, incluindo em espécies de *Rhizobium*, como, *Rhizobium undicola* (GHOSH et al., 2015), *Rhizobium tropici* (IMADA et al., 2017), que sintetizam AIA por rotas dependentes de TRP, como indol-3-acetamida (IAM), IPyA, indol-3-acetonitrila (IAN) e ANT, (SPAEPEN, 2015).

Em relação ao crescimento na presença de NH_4^+ , em ambos experimentos e diferentes horas de crescimento, o amônio induziu o crescimento de CIAT899, como já visto por Imada e colaboradores (2017). A influência de NH_4^+ no processo de simbiose entre rizóbio-leguminoso já foi estudado e discutido ao longo do tempo. Conforme demonstrado por Patriarca e colaboradores (2002) em uma ampla revisão, o metabolismo de amônio desempenha um papel importante na simbiose rizóbio-planta, e os efeitos de amônio na biossíntese de auxina em bactérias já foi relatados para *R. tropici* CIAT899 (IMADA et al., 2017).

Tabela 1. Efeito do triptofano e/ou amônio no crescimento e produção de auxinas por *Rhizobium tropici* CIAT 899.

Cultivo*		Tratamentos	DO _{600 nm}	AIA (µg/mL)		AIA/DO	%
Experimento 1	24 h	YM+TRP	0,91 b	28,56	a	31,26	a 100,0
		YM+TRP+ NH_4^+	1,30 a	22,98	b	17,66	b 56,5
		YM+ NH_4^+	1,34 a	0,05	c	0,04	c 0,1
		YM	0,92 b	0,05	c	0,06	c 0,2

Experimento 2	24 h	YM+TRP	0,91	d	36,18	a	39,58	a	100,0
		YM+TRP+NH ₄ ⁺	1,33	b	21,60	b	16,21	b	41,0
		YM+NH ₄ ⁺	1,44	a	0,05	c	0,04	c	0,1
		YM	1,05	c	0,05	c	0,05	c	0,1
	36 h	YM+TRP	1,19	d	50,73	a	42,52	a	100,0
		YM+TRP+NH ₄ ⁺	1,95	a	47,87	b	24,56	b	57,8
		YM+NH ₄ ⁺	1,68	b	0,81	c	0,48	c	1,1
		YM	1,30	c	0,12	c	0,09	c	0,2
	48 h	YM+TRP	1,25	c	60,95	a	48,58	a	100,0
		YM+TRP+NH ₄ ⁺	2,34	a	44,03	b	18,84	b	38,8
		YM+NH ₄ ⁺	1,84	b	0,05	c	0,03	c	0,1
		YM	1,37	c	0,89	c	0,65	c	1,3

*Experimento 1 - cultivo por 24 h a 120 rpm; experimento 2 - cultivo por até 48 h a 120 rpm. Dados representam a média de três repetições biológicas (experimento 1) ou técnicas (experimento 2). Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Scott – Knott ($p \leq 0,05$)

ZAHARAN (1999) demonstrou que concentrações 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 NH₄NO₃ inibe a deformação dos pelos radiculares, iniciação da divisão das células corticais e formação do cordão de infecção, conseqüentemente interferindo na formação do nódulo (HEIDSTRA et al., 1997). Os processos de desenvolvimento de nódulo (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 NH₄⁺ assim como, os processos de infecção citados (IMADA, 2017).

Gel Unidirecional SDS-PAGE

Quantificação de proteínas e SDS-PAGE

A extração de proteínas totais de CIAT899 pela técnica de *freezing-thawing* foi eficiente e permitiu obter extratos proteicos com concentrações similares nos dois tratamentos e entre as repetições biológicas ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A análise deste extrato por SDS-PAGE permitiu verificar perfil proteico similar de CIAT899 em ambos os tratamentos e também entre as repetições biológicas, com proteínas de 10-200 KDa (Figura 1).

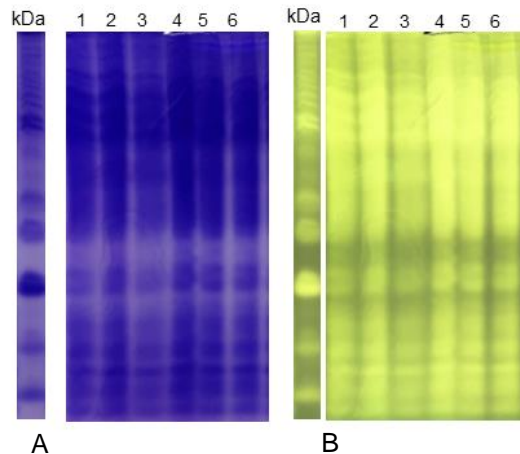


Figura 2. SDS – PAGE do extrato proteico de CIAT899. Amostras (1-3) YM sem triptofano; (4-6) YM com triptofano ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$); marcador PageRuler™ Unstained Ladder (10-200 KDa). **A**- imagem original. **B** – negativo da imagem

Análise proteômica diferencial de R. tropici CIAT899

A análise do proteoma de CIAT899 nas duas condições biológicas (ausência ou presença de triptofano) contra o genoma ([GCA_000330885.1; ENA/EMBL](#)) permitiu identificar 617 proteínas expressas, sendo 341 proteínas encontradas nas duas condições biológicas, 164 proteínas exclusivas do proteoma obtido na ausência de triptofano e 112 exclusivas do tratamento com triptofano (Figura 3; Tabela suplementar)

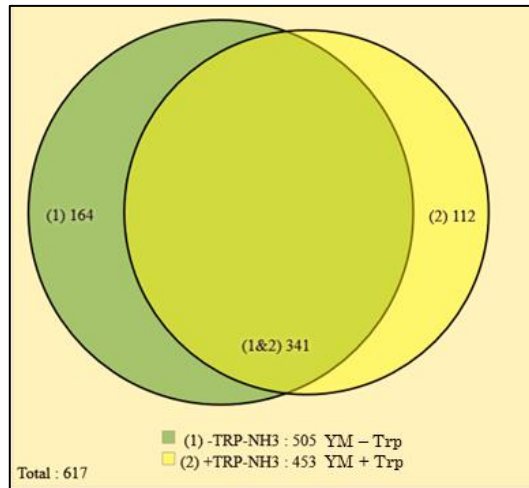


Figura 3. Diagrama de Venn do proteoma de *R. tropici* CIAT899 cultivado na ausência (1) ou presença (2) de TRP.

As 341 proteínas mutualmente expressas (Figura 3) foram analisadas com a ferramenta TFold do PatternLab (CARVALHO et al., 2012) para identificação das proteínas diferencialmente expressas. Destas, 295 proteínas (86,5%) não apresentaram diferença na expressão entre as duas condições biológicas (pontos vermelhos). 28 proteínas (8,2%) tenderam somente o *fold change* (pontos verdes) e 18 proteínas (2,3%) atenderam a ambos os testes estatísticos, sendo 10 proteínas (2,9%) consideradas as diferencialmente expressas (pontos azuis) e 8 proteínas (2,3%) que embora também sejam consideradas diferencialmente expressas apresentaram baixa abundância (amarelas), sendo recomendado a confirmação de outras análises. Dentre as 10 proteínas diferencialmente expressas (pontos azuis), 3 proteínas apresentaram um nível de expressão menor no tratamento com TRP (*downregulated*). As outras 7 proteínas tiveram a expressão aumentada (*upregulated*) na presença de TRP, com nível de expressão de até 12,1 vezes (Figura 4; Tabela 2; Tabela suplementar).

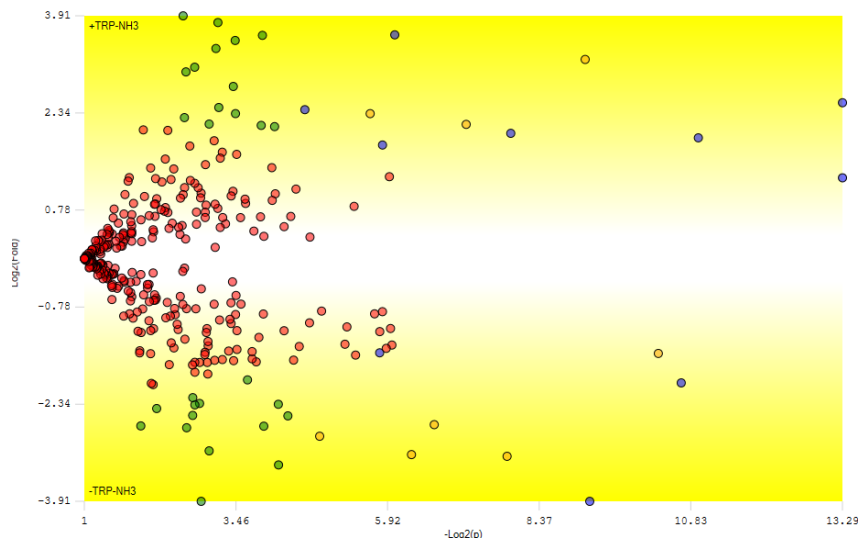


Figura 4. Análise pelo TFold das proteínas de CIAT899 mutuamente expressas nas duas condições biológicas (sem TRP e com TRP). Os pontos vermelhos representam as proteínas que não satisfazem o limite de fold-change nem o q-value, os verdes são aquelas proteínas que satisfazem somente o limite de fold-change, os pontos laranja e azuis são proteínas que satisfazem ambos (fold-change e o q-value), sendo os pontos amarelos aquelas que tiveram baixa abundância

Tabela 2. Análise pelo TFold das proteínas de CIAT899 mutuamente expressas nas duas condições biológicas (sem TRP e com TRP).

T-fold*	Uniprot	Fold Change**	pValue***	Descrição
	L0LKQ7	2.5	3.8E-05	Proteína periplásmica de ligação oligopeptídica
	L0LUL9	5.7	4.1E-05	Transportador ABC, proteína ligante de substrato
	L0LL33	3.8	5.0E-04	Proteína ribossomal 50S L33
Proteínas azuis	L0LY54	-4.0	6.1E-04	Transportador ABC, proteína ligante de substrato
	L0LQB0	-18.2	1.7E-03	Fosfatase ácida classe B (putativa)
	L0LS91	4.0	4.2E-03	Proteína do locus B associada com invasão (IaB)
	L0LV98	12.1	1.5E-02	Proteína exportadora succinoglucana ExoF
	L0LFJ1	3.6	1.8E-02	Proteína da via de dissimilação da Fucose

	L0LHK0	-2.9	1.8E-02	Proteína ribossomal 50S L24
	L0LLE5	5.3	4.2E-02	Proteína ribossomal 50S L30
	L0LLL5	-2.9	7.9E-04	Arginina--tRNA ligase
	L0LHU6	9.2	1.8E-03	Peptidase M20
	L0LPA9	-9.1	4.3E-03	Ligante ribossomal ATPase YchF
Proteínas amarelas	L0LV40	4.5	6.9E-03	Cisteína sintase
	L0LJ12	-6.4	9.8E-03	Peptidil prolil cis-trans isomerase D
	L0LQQ3	-8.9	1.3E-02	Proteína de síntese de colabamina
	L0LFX2	5.0	2.0E-02	Flagelina
	L0LJ81	-7.3	3.6E-02	NADH-quinona oxidoreductase subunidade C
	L0LW69	-5.8	5.1E-02	Raminose ABC transportador, proteína RhaS
	L0LLY3	-10.0	5.6E-02	Fator reciclante de Ribosomo
	L0LI33	-5.1	5.7E-02	Proteína ribossomal 50S L6
	L0LIZ4	4.4	5.9E-02	Proteína não caracterizada
	L0LIY0	-6.5	6.7E-02	Peptidil-prolil cis-trans isomerase
	L0LLF5	12.1	6.8E-02	Proteína da família ciclase
Proteínas verdes	L0LS81	4.4	6.9E-02	Peptídeo do transportador ABC (putativo)
	L0LS16	-3.9	8.0E-02	DNA helicase dependente de ATP
	L0LJJ3	5.0	9.1E-02	Proteína ribossomal 30S S17
	L0LJI2	11.4	9.2E-02	Modulador de proteína DNA girase
	L0LNG1	6.8	9.4E-02	Factor de elongação P
	L0LUS3	5.4	1.1E-01	L-lactate desidrogenase
	L0LQW5	13.9	1.1E-01	Proteína de partição cromossomal ParB
	L0LQP1	10.4	1.1E-01	Alfa-1,4 glucano fosforilase
	L0LK04	4.5	1.2E-01	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG família de proteínas

L0LKR5	-8.5	1.2E-01	Ligase Aspartato--tRNA(Asp/Asn)
L0LJJ0	-20.4	1.3E-01	PRC-barrel domain-containing protein
L0LWR0	-5.0	1.4E-01	proteína de choque frio CspA
L0LRK2	-5.1	1.4E-01	Proteína não caracterizada
L0LXD6	8.5	1.4E-01	Regulator transcricional, família XRE
L0LGI7	-4.7	1.5E-01	Glutaciona sintetase
L0LP80	-5.8	1.5E-01	Proteína ribosomal 50S L25
L0LQW7	-6.6	1.6E-01	Mannitol 2-desidrogenase (Putativo)
L0LXT6	8.0	1.6E-01	Metiltransferase (putativa)
L0LFC6	4.8	1.6E-01	Ezima malica NADP-dependente
L0LG31	17.4	1.6E-01	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase
L0LPM4	-5.3	2.2E-01	Inositol 2-desidrogenase
L0LGT2	-6.5	2.7E-01	Proteína contendo domínio MOSC

*Proteínas azuis, satisfazem ambos testes estatísticos (Fold-change e p-value); proteínas amarelas, satisfazem ambos cortes de fold-change e o q-value, porém com de baixa abundância; proteínas verdes, satisfazem o limite de fold-change, mas não o q-value.

**Fold change: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos.

***p-value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula.

Classificação de Gene Ontology (GO)

As proteínas identificadas nos tratamentos sem e com triptofano foram classificadas com o emprego da ferramenta Uniprot por GO e agrupadas nas seguintes categorias: função molecular, componente celular e processo biológico.

O GO para o tratamento sem e com TRP, na função molecular, nove termos GO foram fornecidos no qual o termo atividade catalítica foi o mais abundante, seguindo de ligação, atividade de molécula estrutural, atividade de transportador, atividade reguladora enzimática, atividade do transdutor de sinal, atividade de receptor, atividade antioxidante, atividade de fator de transcrição. A atividade de toxina só foi identificada no tratamento com triptofano (Tabela 3; Figura 5).

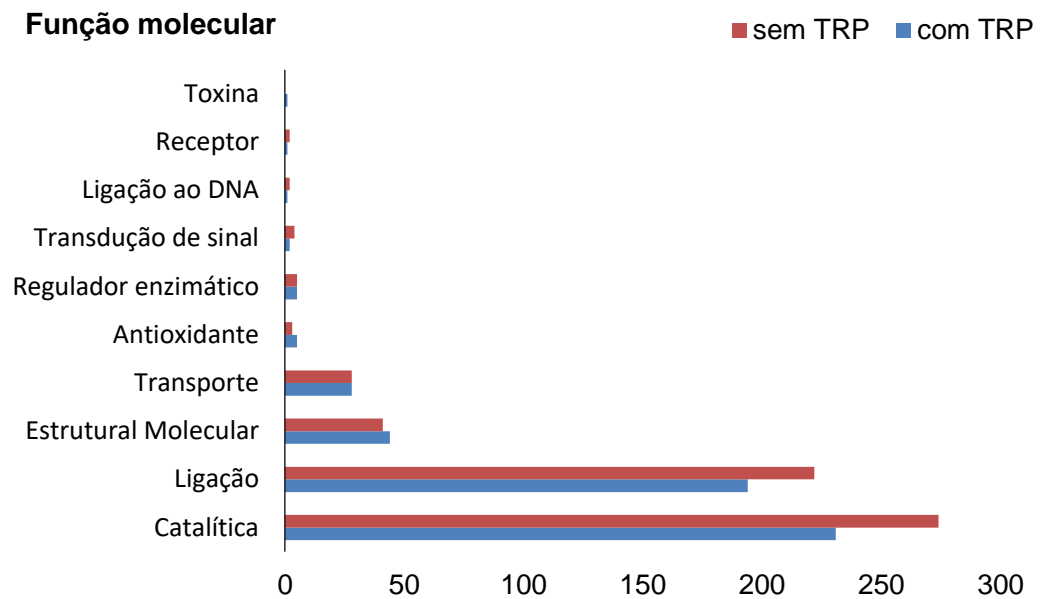


Figura 5. Número de genes expressos e classificação nas respectivas funções, conforme análise no Gene Ontology (GO) referente ao proteoma de CIAT899 cultivado na ausência ou presença de triptofano

E relação ao componente celular, o termo mais abundante foi parte da célula, seguido de complexo macromolecular, organela, parte da membrana, membrana, parte da organela, célula, região extracelular. Na categoria nucleóide bacteriano foi identificado uma proteína apenas no tratamento sem triptofano (Tabela 3; Figura 6).

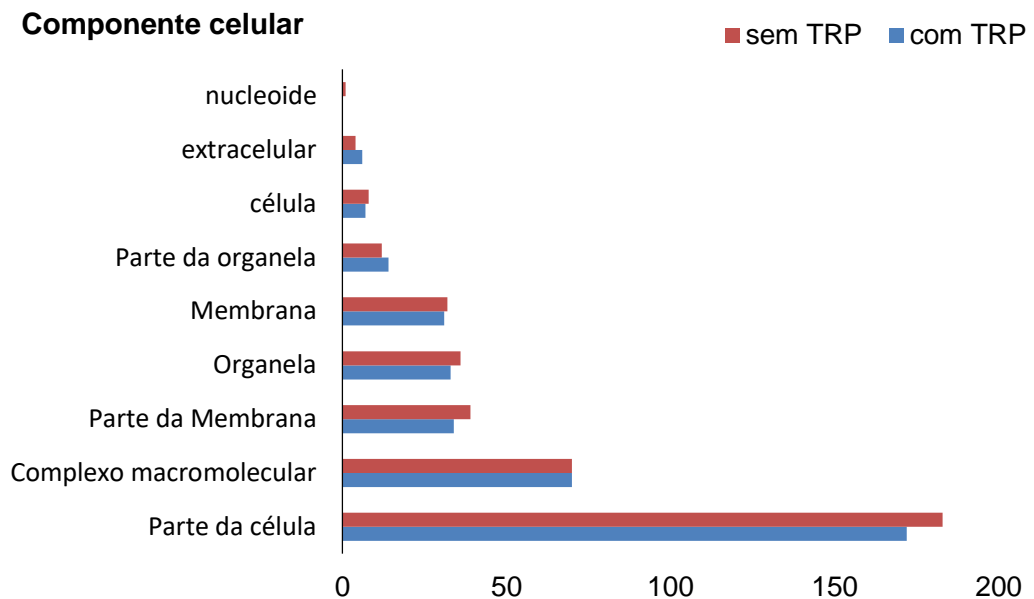


Figura 6. Número de genes expressos e classificação nas respectivas categorias de componente celular conforme análise no Gene Ontology (GO) referente ao proteoma de CIAT899 cultivado na ausência ou presença de triptofano.

No tratamento sem triptofano, no processo biológico, dez termos GO foram identificados no qual o termo processo metabólico foi mais o predominante. O segundo termo mais abundante foi o processo celular, seguido de localização, regulação biológica, organização do componente celular, resposta a estímulo, locomoção, processo multi-organismo, que são as interações entre organismos, utilização de carbono e processo de desenvolvimento (Tabela 3; Figura 7). Já no tratamento com triptofano, foram encontrados dois termos diferentes em comparação com o tratamento sem triptofano (conjugação e citocinese dependente de FtsZ) (Tabela 3; Figura 7).

Processos biológicos

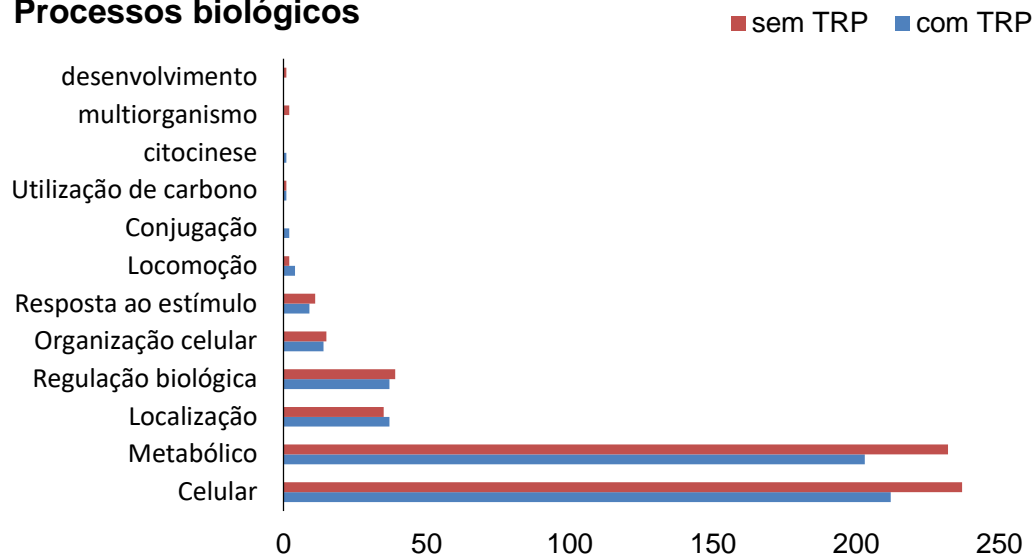


Figura 7. Número de genes expressos e classificação nas respectivas categorias de processos biológicos conforme análise por Gene Ontology (GO) referentes ao proteoma de CIAT899 cultivado na ausência ou presença de triptofano.

Essa classificação de GO é generalista, pois se não existe o conhecimento prévio e a informação anotada nos bancos de dados sobre a localização subcelular de proteínas identificadas, são observadas anotações pouco específicas como "célula" por exemplo, assim, a classificação aparenta ambiguidade, sendo necessário o estudo aprofundado dessas proteínas de interesse.

Tabela 3. Número de genes expressos e classificação nas respectivas categorias de função molecular, componente celular e processos biológicos do proteoma de CIAT899 cultivado na ausência ou presença de triptofano, conforme análise pelo Gene Ontology (GO).

Função molecular	com TRP	sem TRP
Catalítica	231	274
Ligação	194	222
Estrutural Molecular	44	41
Transporte	28	28
Antioxidante	5	3
Regulador enzimático	5	5
Transdução de sinal	2	4
Ligação ao DNA	1	2
Receptor	1	2
Toxina	1	0
Componente celular	com TRP	sem TRP
Parte da célula	172	183
Complexo macromolecular	70	70
Parte da Membrana	34	39
Organela	33	36

Membrana	31	32
Parte da organela	14	12
Célula	7	8
Extracelular	6	4
Nucleoide	0	1
Processos biológicos	com TRP	sem TRP
Celular	212	237
Metabólico	203	232
Localização	37	35
Regulação biológica	37	39
Organização celular	14	15
Resposta ao estímulo	9	11
Locomoção	4	2
Conjugação	2	0
Utilização de carbono	1	1
Citocinese	1	0
Multi-organismo	0	2
Desenvolvimento	0	1

Análise de vias metabólicas pelo KEGG Mapper – Search&Color Pathway

A organização e montagem de vias metabólicas podem ser feita com auxílio das bases de dados disponíveis no KEGG Pathway (KANEHISA, 1997). Assim, a fim de verificar quais rotas metabólicas as proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 foram mapeadas na plataforma KEGG Pathway (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html) contra o banco de dados de *R. tropici* CIAT899 (rtr). Foram analisadas as 617 proteínas obtidas dos dois proteomas (com e sem TRP) (Figura 2), 349 proteínas (~ 57%) foram mapeadas em uma das 94 vias metabólicas identificadas, sendo mapeadas 93 proteínas em biossíntese de metabólitos secundários, 87 em biossíntese de antibióticos e 80 em metabolismo microbiano. A análise mais detalhada das vias identificadas é apresentada na figura 8 que mostra as principais vias identificadas. Entre as vias identificadas as mais representativas foram as vias envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários e

antibióticos, metabolismo microbiano, transportadores ABC até metabolismo de butanoato com 6 proteínas identificadas.

A ferramenta KEGG mapper apresenta limitações, pois em nossa análise não foram identificadas 402 proteínas. Assim, num total de 617 proteínas identificadas, 210

proteínas foram mapeadas pelo KEGG. Mesmo com um elevado número de proteínas não mapeadas, os mapas representaram uma boa versão resumida para a compreensão do metabolismo global de um organismo, baseado na informação curada dos 172 mapas do KEGG Pathway (YAMADA et al., 2011). Muitas das linhas vistas nos mapas servem de representação para mais de dez vias metabólicas, com pontos de interseção entre várias enzimas.

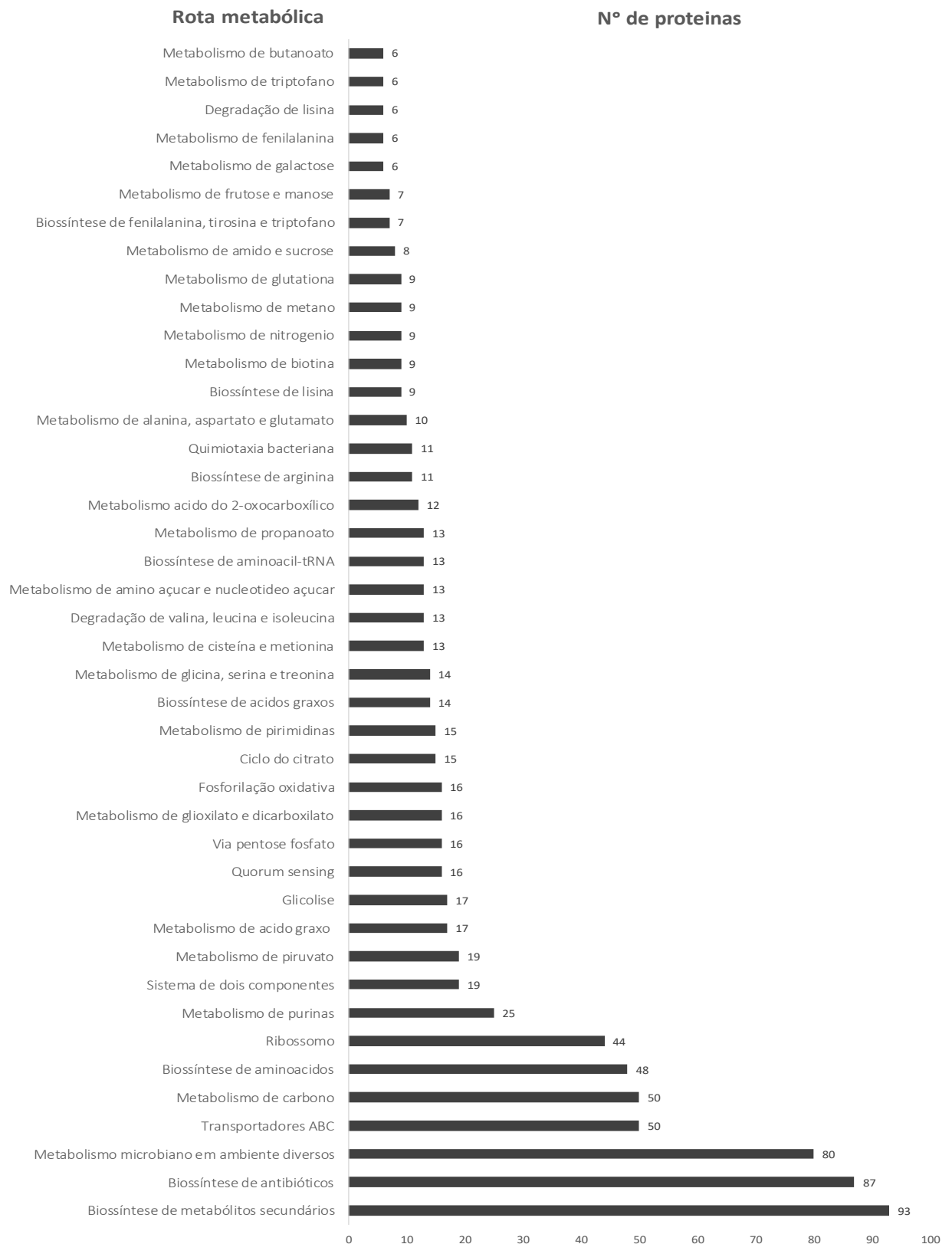


Figura 8. Distribuição do proteoma de CIAT899 conforme análise por KEGG pathway.

Com a finalidade de identificar vias metabólicas características de cada tratamento biológico, o mapeamento foi realizado com as proteínas identificadas em cada

tratamento, revelando que maioria das vias foram encontradas no proteoma de ambos os tratamentos e apenas algumas poucas vias foram exclusivamente encontradas no tratamento com TRP e outras no tratamento sem TRP (Tabela 4). Dentre as 449 proteínas identificadas no proteoma do tratamento com TRP, 265 proteínas (~ 59%) foram mapeadas. Das 507 proteínas identificadas no proteoma do tratamento sem TRP, 292 proteínas (~ 58%) foram mapeadas.

Tabela 4. Distribuição do proteoma de CIAT899 expresso em cultivos adicionados ou não de L-triptofano mapeados por KEGG.

Mapeamento KEGG	Todas (617/267)	com TRP (449/184)	sem TRP (507/215)
Metabolismo de Carbono			
Rotas metabólicas	185	131	154
Biossíntese de metabólitos secundários	93	63	81
Biossíntese de antibióticos	87	64	76
Metabolismo microbiano	80	57	67
Transportadores ABC	50	39	47
Metabolismo de Carbono	50	41	46
Metabolismo de piruvato	25	14	17
Glicólise/gliconeogenese	17	13	17
Via das pentoses	16	9	14
Fosforilação oxidativa	16	13	15
Metabolismo de glioxilato	16	12	16
Ciclo do ácido cítrico (TCA)	15	12	15
Metabolismo de amino- e nucleotídeo-açúcar	13	8	13
Metabolismo de propanoato	13	7	12
Metabolismo de ácido 2-oxocarboxílico	12	10	9
Metabolismo de amido e sacarose	8	6	8
Metabolismo de frutose e mannose	7	5	7
Metabolismo de galactose	6	5	5
Metabolismo de butanoato	6	5	5
Metabolismo de 1C	5	4	4
Metabolismo de inositol fosfato	3	2	2
Interconversão pentose-glucoronato	3	2	3
Metabolismo C5-branched acid	2	2	2
Metabolismo de aminoácidos			
Biossíntese de aminoácidos	48	35	46
Metabolismo de glicina, serina e treonina	14	9	14
Metabolismo de valina, leucina e isoleucina	13	4	10
Metabolismo de cisteína e metionina	13	10	12

Biossíntese de arginina	11	9	8
Metabolismo de alanina, aspartato e glutamato	10	8	9
Biossíntese de lisina	9	6	7
Metabolismo de glutatona	9	4	8
Biossíntese de tirosina, fenilalanina e triptofano	7	3	7
Metabolismo de triptofano	7	4	6
Degradação de lisina	6	4	6
Metabolismo de fenilalanina	6	4	5
Metabolismo de β -alanina	5	2	4
Metabolismo de tirosina	4	2	4
Biossíntese de valina, leucina e isoleucina	4	8	2
Metabolismo de histidina	4	2	3
Metabolismo de arginina e prolina	3	2	3
Metabolismo de cianoamino ácido	3	1	3
Metabolismo de enxofre	3	1	3
Metabolismo de taurina e hipotairina	3	2	2
Metabolismo de selenocompostos	2	1	1
Metabolismo de D-glutamato e D-glutamina	1	1	0
Metabolismo de ácidos graxos			
Metabolismo de ácidos graxos	17	12	12
Biossíntese de ácidos graxos	14	10	10
Degradação de ácidos graxos	5	3	4
Biossíntese de ácidos graxos insaturados	3	2	2
Metabolismo de glicerolípideo	2	1	1
Síntese e degradação de corpos cetônicos	2	2	2
Metabolismo de ácido linolênico	1	1	0
Metabolismo de glicerolfosfolípideo	1	0	1
Metabolismo de nucleotídeos			
Metabolismo de pirimidina	15	11	13
Metabolismo de purinas	25	17	22
Metabolismo de nicotinato e nicotinamida	3	0	3
Metabolismo de N			
Metabolismo de metano	9	7	9
Metabolismo de nitrogênio	9	7	9
Vitaminas/coenzimas			
Metabolismo de biotina	9	7	6
Biossíntese de pantotenato e Co-A	5	4	3
Metabolismo de vitamina B6	5	3	5
Metabolismo de porfirina e clorofila	3	2	1
Biossíntese de folato	2	1	2
Metabolismo de riboflavina	1	0	2

Metabolismo de tiamina	1	1	1
Biossíntese de ubiquinona e outros terpenoides	1	1	0
Biossíntese de terpenoides	1	1	1
Metabolismo de ascorbato e aldarato	1	1	1
Superfície celular			
Biossíntese de peptídeoglicano	4	3	3
Biossíntese de LPS	3	3	0
Processos transcrição/tradução			
Ribossomo	44	42	41
Biossíntese de aminoacil-trna	13	11	11
Degradação de RNA	5	4	5
Recombinação homóloga	3	2	3
RNA polimerase	3	3	3
Reparo mismatch	3	2	2
Replicação DNA	2	1	2
Excisão de nucleotídeo/base	1	1	1
Antibióticos			
Resistencia à vancomicina	2	2	2
Resistência à β -lactam	4	3	3
Resistência à peptídeo antimicrobiano catiônico	4	4	2
Biossíntese de estreptomicina	3	2	3
Biossíntese de novobiocina	3	2	3
Biossíntese de monobactam	3	2	3
Locomoção/quimiotaxia/regulação/secreção			
<i>Quorum sensing</i>	16	14	10
Quimiotaxia	11	8	8
Sistema de dois componentes	19	16	16
Montagem de flagelo	3	3	1
Exportação de proteína	1	1	0
Sistema de secreção	1	1	0
Degradação			
Degradação de Benzoato	5	3	3
Degradação de atrazina	3	3	0
Degradação de geraniol	3	2	2
Degradação de aminobenzoato	3	2	2
Degradação de limoneno e pineno	2	1	2
Degradação de caprolactam	1	0	1
Degradação de cloroalcano e cloroalceno	1	1	1

Análise de proteínas diferencialmente expressas

Com as identificações das proteínas diferencialmente expressas nas condições experimentais (YM-TRP x YM+TRP), foi possível identificar alguns clusters

importantes para compreensão do metabolismo de CIAT899 na presença do aminoácido triptofano.

Biossíntese de polissacarídeos de superfície celular

Na simbiose planta-bactéria, o desenvolvimento inicial do nódulo necessita da síntese e percepção de sinais moleculares como lipo-quito-oligosacarídeos chamados de fatores Nod que são importantes para indução do desenvolvimento dos nódulos. A superfície de polissacarídeos da bactéria é também importante para o sucesso do estabelecimento da simbiose com as leguminosas. Os polímeros de açúcares dos rizóbios são compostos por um número de diferentes polissacarídeos, como lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (CPS ou antígenos-K), β -1,2-glucans neutro e polissacarídeos extracelulares ácidos (EPS). Estas moléculas são utilizadas no reconhecimento com o hospedeiro e várias foram descritas na literatura. Genes relacionados à biossíntese de exopolissacarídeos (*exo/exs* ou *pss*) formam um grande grupo de genes localizados tanto no cromossomo quanto nos megaplasmídeos (FINAN et al., 2001). No presente trabalho foram encontradas 9 proteínas para biossíntese de EPS, 12 para biossíntese de LPS e 4 para biossíntese de peptidoglicano (Tabela 5; 6).

R. tropici é conhecida por produzir elevada quantidade de EPS, inclusive com interesse biotecnológico (STAUDT et al., 2012). Estruturalmente, o EPS produzido por CIAT899 é um octosacarídeo composto de unidades de D-glicose e D-galactose em uma relação 6:2 com modificações de resíduos de piruvil e acetil (GIL-SERRANO et al., 1990; JANCZAREK, 2011). Os genes necessários para a polimerização, modificação, processamento e exportação de succinoglicano (EPS I) encontram-se no plasmídeo pRtrCIAT899c constituindo um grande cluster de 15 genes *exo*. Entre as proteínas codificadas dentro de tais regiões podem ser citadas: as transferases, responsáveis pela montagem das unidades repetidas do EPS, as enzimas envolvidas na biossíntese de precursores de nucleotídeos e açúcares, as enzimas envolvidas na modificação dos EPS com ramificações não derivadas de açúcares, e proteínas envolvidas na polimerização e exportação de cadeias de EPS sobre a superfície celular (REUBER & WALKER, 1993; WHITFIELD & PAIMENT,

2003). Foram identificadas no proteoma de CIAT899 proteínas envolvidas na biossíntese e exportação de EPS, sendo a maioria destas encontradas tanto em CIAT cultivada com TRP quanto sem TRP. Entre estas, a proteína ExoF foi significativamente induzida (aumento de 12x) no tratamento com TRP. As proteínas ExoF e ExoY são necessárias para a adição da primeira unidade de galactose ao lipídeo carreador a partir do qual, unidades de glicose são adicionadas à cadeia de EPS em crescimento pelas glicosiltransferases (REUBER & WALKER, 1993). A biossíntese de EPS em *Rhizobium* é influenciada por diversas condições ambientais, sendo sua regulação complexa e ocorrendo tanto a nível transcricional quanto pós-traducional por meio de diferentes tipos de reguladores que podem atuar na repressão ou indução da biossíntese. Entre estes reguladores, SyrM e NtrC são reguladores positivos da biossíntese de EPS sob condições limitantes de nitrogênio e atuam induzindo a expressão dos genes *exoF* e *exoP*, via estimulação positiva de SyrA (SKORUPSKA et al., 2006).

Os lipopolissacarídeo (LPS) são macromoléculas de estrutura extremamente complexa, encontrados exclusivamente formando a monocamada da membrana externa de bactérias gram-negativas (COLLINS & FERRIER, 1995). Esses glicoconjugados são formados por três regiões estruturalmente distintas: a porção denominada lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico e o antígeno-O (SUTHERLAND, 1985). A biossíntese de LPS de espécies de *Rhizobium* é iniciada por sete enzimas (LpxA, LpxC, LpxD, LpxH, LpxB, LpxK, kdtA) que atuam sequencialmente para formar o precursor fosforilado KDO2-lipid IVA. O KDO2-lipid IVA é então processado de forma para gerar diversas moléculas.

As beta-glucanas são proteínas importantes da adaptação osmótica e a proteína NdvB é necessária para o crescimento hipo-osmótico em *Sinorhizobium meliloti* e *Agrobacterium tumefaciens* (INGRAM-SMITH & MILLER, 1998). Um mutante *ndvB* de *Sinorhizobium fredii* NGR234 que não possui β (1,2) glucanos apresentou deficiência em motilidade, interação com raízes e infecção em leguminosas (GAY-FRARET et al., 2012) como também nos eventos iniciais essenciais no estabelecimento de simbiose. Em *S. fredii* HH103, os mutantes *ndvB* que não possuíam β -glucanos cíclicos, mas super produção de EPS formaram apenas pseudo-nódulos em dois hospedeiros diferentes (CRESPO-RIVAS et al., 2009). De fato, o NdvB é uma proteína importante na interação planta bactéria e foi expressa

em *Rhizobium tropici* CIAT 899. Já as 12 proteínas expressas para biossíntese de LPS, todas, exceto lipoproteína putativa (localizada no plasmídeo pRtrCIAT899), são proteínas codificadas por genes localizados no cromossomo (Tabela 6).

Tabela 5. Proteínas de CIAT899 relacionadas com o metabolismo de exopolissacarídeos.

UNIPROT	GenBank	Localização	Descrição	Condição	Fold (p -value) ou abundância ^a
L0LNM7	AGB72988.1	cromossomo	NDVb; Cyclic beta-1,2-glucan synthase	-/+TRP	-1.29 (2.8E-01)
L0LKV5	AGB70729.1	cromossomo	Polysaccharide export protein	+TRP	4.8E-04
L0LYN1	AGB75205.1	pRtrCIAT899c	Succinoglycan biosynthesis protein ExoP	-/+TRP	2.72 (1.8E-01)
L0LWW7	AGB75206.1	pRtrCIAT899c	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	-/+TRP	-1.08 (4.5E-01)
L0LV89	AGB75208.1	pRtrCIAT899c	Succinoglycan biosynthesis glycosyltransferase ExoM	+TRP	4.8E-03
L0LWX2	AGB75211.1	pRtrCIAT899c	Succinoglycan biosynthesis endo-beta-1,3-1,4-glycanase ExoK	-/+TRP	1.51 (3.0E-01)
L0LYJ4	AGB75214.1	pRtrCIAT899c	Succinoglycan biosynthesis pyruvyltransferase ExoV	-/+TRP	1.03 (4.8E-01)
L0LYN8	AGB75215.1	pRtrCIAT899c	Succinoglycan biosynthesis glycosyltransferase ExoU	-TRP	2.6E-04
L0LV98	AGB75218.1	pRtrCIAT899c	Succinoglycan export protein ExoF	-/+TRP	12.14 (1.5E-02)

^a Fold: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos. p -value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula. Abundância: sinal total relativo à área da curva.

Tabela 6. Proteínas de CIAT899 envolvidas no metabolismo de lipopolissacarídeos.

UNIPROT	GenBank	Localização	Descrição	Condição	Fold (p -value) ou abundância ^a
L0LI79	AGB71093.1	cromossomo	Outer membrane protein BamA kdsA; 2-dehydro-3-	-/+TRP	-3.55 (1.4E-01)
L0LLZ5	AGB71104.1	cromossomo	deoxyphosphooc-tonate aldolase lpxD; UDP-3-O-acylglucosamine	+TRP	2.8E-04
L0LLY6	AGB71094.1	cromossomo	N-acyltransferase lpxA; acetylglucosamine O-	+TRP	5.0E-04
L0LK83	AGB71096.1	cromossomo	acyltransferase	+TRP	3.1E-04
L0LKQ9	AGB70640.1	cromossomo	SurA domain-containing protein	+TRP	1.2E-03

L0LIF2	AGB69874.1	cromossomo	lptE; LPS-assembly protein LptE	-TRP	2.1E-03
L0LSG5	AGB73094.1	cromossomo	lptA; LPS-assembly protein LptA lptD; lipopolysaccharide transport	-/+TRP	-1.75 (1.4E-01)
L0LIW4	AGB70641.1	cromossomo	(Lpt)	-TRP	2.9E-04
L0LIV3	AGB71157.1	cromossomo	Bifunctional protein GImU	-TRP	1.4E-04
L0LJG9	AGB70866.1	cromossomo	LPS Glycosyltransferase	-TRP	1.4E-03
L0LT32	AGB74387.1	pRtrCIAT899c	Putative lipoprotein Outer membrane lipoprotein	-/+TRP	1.60 (2.3E-01) 3.7E-01 (3.7E-01)
L0LRH0	AGB72734.1	cromossomo	omp19	-/+TRP	01)

^a Fold: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos. p-value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula. Abundância: sinal total relativo á área da curva.

Biossíntese de triptofano, fenilalanina e tirosina

A biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano ocorre pela via do shiquimato, sendo o corismato um ponto de ramificação na biossíntese destes aminoácidos. Algumas das principais proteínas envolvidas na biossíntese e metabolismo destes aminoácidos foram identificadas no proteoma de CIAT899 (Tabela 7).

Tabela 7. Proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 envolvidas na biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano).

Uniprot	GenBank	Localização	Descrição	Condição	Fold (p -value) ou abundância ^a
L0LL25	AGB71416.1	cromossomo	3-deoxy-7-phosphoheptulonate sintase (2.5.1.54)	-TRP	6.8E-05
L0LPC7	AGB71969.1	cromossomo	trpEG; antranilato sintase (4.1.3.27)	-TRP	8.2E-05
L0LNF9	AGB72797.1	cromossomo	corismato mutase; 5.4.99.5	-TRP	1.1E-03
L0LIK1*	AGB70541.1	cromossomo	Histidinol-phosphate aminotransferase; 2.6.1.9	-TRP	9.6E-04
L0LLH8	AGB70935.1	cromossomo	flavodoxina WrbA	+TRP	6.6E-04
L0LGG0	AGB70307.1	cromossomo	aroC; corismato sintase; 4.2.3.5	-/+TRP	1.2 (0,41)
L0LU90*	AGB74276.1	pRtrCIAT899c	aspartato aminotransferase; 2.6.1.57	-/+TRP	-1.2 (0,37)
L0LKF0*	AGB71893.1	cromossomo	aspartato aminotransferase A; 2.6.1.1	-/+TRP	-1.5 (0,23)
L0LJ12	AGB71227.1	cromossomo	Peptidyl prolyl cis-trans isomerase D; EC:5.2.1.8	-/+TRP	-6.4 (0.01)

^a Fold: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos. p-value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula. Abundância: sinal total relativo á área da curva.

*atua na biossíntese e no metabolismo de fenilalanina (PHE), triptofano (TRP) e tirosina (TYR)

Biossíntese e Metabolismo de triptofano, fenilalanina e tirosina

O aminoácido triptofano é sintetizado a partir do corismato pelas enzimas codificadas pelo operon TRP, o qual é negativamente regulado na presença do triptofano. O operon TRP contém cinco genes estruturais (*trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* e *trpA*) que produzem os componentes de três enzimas (duas das enzimas consistem em duas cadeias polipeptídicas (PIERCE, 2011). No genoma de CIAT899 os genes que codificam as enzimas responsáveis pela biossíntese de triptofano não estão organizados em um único operon como em *E. coli*, sendo encontrado no cromossoma de CIAT899 três clusters constituídos pelos genes *trpFBA* (AGB69457.1, AGB69458.1, AGB69459.1), *trpDC* (AGB71228.1; AGB71229.1) e *trpEG* (AGB71969.1). O gene *trpEG* codifica a antranilato sintase (AS – EC 4.1.3.27), enzima que converte corismato em antranilato e a primeira etapa da via de biossíntese do triptofano. Seu sítio ativo é dividido em duas subunidades: uma subunidade maior chamada α , também conhecida por componente I (ASI) e uma subunidade menor chamada β , ou componente II (ASII) (CRAWFORD, 1975). Para a biossíntese de tirosina e fenilalanina, o corismato é convertido em pterfenato pela corismato mutase (EC 5.4.99.5). Nas condições experimentais deste trabalho, as proteínas antranilato sintase e corismato mutase foram identificadas apenas no tratamento sem TRP (Tabela 7). A inibição da síntese de antranilato por triptofano é um dos mecanismos de regulação mais conhecidos em bactérias (PIERCE, 2011).

Metabolismo de triptofano

Degradação do triptofano pela rota quinurerina

Em microrganismos, o triptofano pode ser degradado pela via de degradação da quinurenina (KP) ou ser metabolizado pelas vias de biossíntese de ácido-3-indolacetic (AIA) dependente do triptofano (PIERCE, 2011). Na via de degradação da quinurerina o triptofano é convertido em antranilato pela ação sequencial das enzimas triptofano-2,3-dioxigenase (*kynA*; EC 1.13.11.11), quinurerina formamidase (*kynB*; EC 3.5.1.9) e quinureninase (*kynU*; EC 3.7.1.3). No genoma de CIAT899, são encontrados os genes *kynA* (AGB75059.1) e *kynU* (AGB75115), enquanto não há

indicação no KEGG da existência do gene *kynB*. A proteína AGB72218.1 anotada no genoma como uma proteína da família ciclase foi identificada no proteoma de CIAT899, com uma expressão 12X (p -value=0,07) maior no tratamento com triptofano (Tabela 8). Ela possui o domínio conservado COG1878 (*Kynurenine formamidase*; E-value 1.42e-68) e pode ser considerada como uma provável quinunerina formamidase (*KynB*) de CIAT899

Tabela 8. Proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 envolvidas no metabolismo de triptofano.

Uniprot	GenBank	Localização	Descrição	Condição	Fold (p -value) ou abundância ^a
L0LLF5	AGB72218.1	cromossomo	Quinurenina formamidase; EC 5.3.1.9	-/+TRP	12.1 (0,07)
L0LQ70	AGB72230.1	cromossomo	AbmA; anthraniloyl-CoA monooxygenase EC 1.14.13.40	+TRP	3.6E-04
L0LND9	AGB72231.1	cromossomo	AbmB; beta-hydroxiacil-CoA desidrogenase; EC 1.1.1.35	+TRP	1.3E-03
L0LQ48	AGB72234.1	cromossomo	GCDH; glutaryl-CoA desidrogenase. EC 1.3.8.6	-TRP	6.2E-05
L0LEM9	AGB69858.1	cromossomo	ECH; Enoyl-CoA hidratase; EC 4.2.1.17	-TRP	4.4E-04
L0LMW8	AGB72728.1	cromossomo	SucA; oxoglutarate desidrogenase; EC 1.2.4.2	-/+TRP	-2.2 (0,02)
L0LS54	AGB72965.1	cromossomo	ACAT; acetyl-CoA acetyltransferase; EC 2.3.1.9	-/+TRP	1.6 (0,05)
L0LV32	AGB75138.1	pRtrCIAT899c	KatG; catalase/peroxidase HPI; 1.11.1.21	-/+TRP	-1.7 (0,18)
L0LWY9	AGB74674.1	pRtrCIAT899c	y4wF-like; FMN monooxygenase; EC 1.14.14.3	-TRP	1.0E-04
L0LTX4	AGB74687.1	pRtrCIAT899c	Aldehyde desidrogenase EC 1.2.1.3	-/+TRP	-1.4 (0,35)

^a Fold: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos. p -value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula. Abundância: sinal total relativo á área da curva.

Além da proteína *KynB*, foram identificadas no proteoma de CIAT899 outras proteínas relacionadas a degradação do antranilato (Tabela 8). O antranilato pode ser metabolizado pela via de degradação do aminobenzoato ou ser convertido em 3-hidroxi-antranilato que posteriormente, pode ser degradado em acetil-coA por uma séria de reações envolvendo o metabólito 2-oxoadipato.

Biossíntese de AIA

Aminotransferase - conversão

A primeira etapa via do IPyA ($\text{Trp} \rightarrow \text{IPyA} \rightarrow \text{IAald} \rightarrow \text{IAA}$), a conversão de triptofano em IPyA, é catalisada pela aminoácido aromático-aminotransferase (AAT; EC 2.6.1.27; EC 2.6.1.99) ou pela ação de L-amino ácido oxidase (EC 1.4.3.2). As AATs catalisam a conversão dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano nos seus respectivos α -cetoácidos e podem estar envolvidas em diferentes rotas metabólicas. No proteoma de CIAT899 foram identificadas 9 aminotransferases em sua maioria identificadas nas duas condições experimentais (Tabela 9). Ainda neste grupo, foi incluída para esta análise, a aminotransferase Y4wE (AGB73411.1) de CIAT899. Resultados anteriores sugerem que a expressão do gene *y4wE* é regulada pelo aminoácido triptofano (IMADA et al., 2017). O gene *y4wE* é localizado no plasmídeo constituindo um cluster com o gene *y4wF*, em uma organização similar àquela observada em *S. freddi* NGR234 (THEUNIS et al., 2004). Em *Sinorhizobium fredii* NGR234 o cluster plasmidial *y4wEF* é conhecido pelo seu envolvimento na biossíntese de AIA quando induzida por flavonoides (THEUNIS, 2004). Embora a proteína Y4wE não tenha sido detectada, a proteína Y4wF (AGB74674.1; FMN monooxygenase) foi identificada no proteoma de CIAT899 no tratamento sem triptofano (Tabela 8). Alguns trabalhos sugerem que a atividade das AATs é regulada pelos aminoácidos aromáticos (PEDRAZA et al, 2004). Estudos adicionais com as aminotransferases identificadas no proteoma de CIAT899 são necessários para avaliar seu envolvimento no metabolismo de triptofano e na biossíntese de AIA.

Tabela 9. Aminotransferases identificadas no proteoma de CIAT899

Uniprot	GenBank	Localização	Descrição	Condição	Fold (p -value) ou abundância ^a
L0LIK1	AGB70541.1	cromossomo	HisC; Histidinol-phosphate aminotransferase; AAT-I e II	-TRP	9.6E-04
L0LLL9	AGB71009.1	cromossomo	AspB; Aspartate aminotransferase; AAT-I e II	-TRP	8.1E-05
L0LU90	AGB74276.1	pRtrCIAT899c	AspB; Aspartate aminotransferase; AAT-I e II	-/+TRP	-1,2 (0.37)
L0LKF0	AGB71893.1	cromossomo	AspB; Aspartate aminotransferase; AAT-I e II	-/+TRP	-1,5 (0.23)
L0LH03	AGB69991.1	cromossomo	ArgD; acetylornithine aminotransferase; EC 2.6.1.11; AAT-III	-TRP	2.4E-04
L0LL69	AGB71987.1	cromossomo	BioA; Ω -amino acid-pyruvate aminotransferase; AAT-III	-TRP	1.6E-04
L0LMA0	AGB72377.1	cromossomo	BCAT aminotransferase; AAT- IV	-/+TRP	-1,9 (0.07)

L0LI94	AGB70441.1	cromossomo	BCAT aminotransferase; AAT -IV	+TRP	2.2E-03
L0LQ96	AGB72284.1	cromossomo	SerC; phosphoserine aminotransferase; AAT-V	-/+TRP	-2,2 (0.17)

^a Fold: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos. p-value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula. Abundância: sinal total relativo à área da curva.

A produção de ILA a partir de IPyA pode ser realizada pela indol-3-lactato desidrogenase (1.1.1.110), uma enzima dependente de NADH (JEAN & DEMOSS, 1968) e também pela ação de L-lactato desidrogenases (LDH; EC 1.1.1.27). A LDH de *S. meliloti* utiliza tanto piruvato quanto indol-3-piruvato como substrato produzindo lactato e indol-3-lactato, respectivamente (TRINCHANT & RIGAUD, 1974). No proteoma de CIAT899, uma L-lactato desidrogenase-citocromo (AGB74982.1; EC 1.1.2.3) foi identificada nas duas condições experimentais, com um nível de expressão 5,39X maior no tratamento com triptofano (Tabela 10), mas sem significância estatística (p-value=0,11). O gene que codifica esta proteína está localizado ao lado de um gene que codifica um transportador de aminoácidos hidrofóbicos (AGB74983.1) que foi identificado no proteoma com uma expressão 5,69X maior no tratamento com triptofano e com alto valor de significância (p-value=4,1E-05). Neste mesmo cluster está localizado o gene que codifica uma metiltransferase (AGB74979.1) (Tabela 10) que também foi identificada no proteoma com uma expressão 8,03X maior no tratamento com triptofano, mas sem significância estatística (p-value 0,16). Entre os transportadores codificados neste cluster gênico, temos um transportador de aminoácidos hidrofóbicos (HAAT), um transportador de aminoácido de cadeia ramificada, um componente ATPase do sistema de transporte ABC e um transportador EamA (*drug/metabolite transporter family*). A expressão diferencial das proteínas deste cluster no proteoma de CIAT899, especialmente do transportador HAAT, indicam o envolvimento destas proteínas no transporte e metabolismo de triptofano; contudo, estudos adicionais são necessários para esclarecer o papel destas proteínas em CIAT899 e também a relação destas com a biossíntese de AIA.

Tabela 10. Proteínas do cluster LDH identificadas no proteoma de CIAT899

Uniprot	GenBank	Localização	Descrição	Condição	Fold (p-value) ou abundância ^a
L0LXT6	AGB74979.1	pRtrCIAT899c	Metiltransferase	-/+TRP	8.03 (0,16)
L0LUS3	AGB74982.1	pRtrCIAT899c	L-lactato desidrogenase; EC 1.1.99.31	-/+TRP	5.39 (0,11)

L0LUL9 AGB74983.1 pRtrCIAT899c Transportador de aminoácido hidrofóbico (HAAT) -/+TRP 5.69 (4.1E-05)

^a Fold: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos. p-value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula. Abundância: sinal total relativo á área da curva.

Biossíntese de sideróforo

Os rizóbios de vida livre competem com outros organismos no solo para aquisição de nutrientes, entre eles, o ferro. Este nutriente é abundante no solo, porém em sua forma oxidada (Fe^{3+}), que apresenta baixa solubilidade em ambiente aquoso e pH neutro (NEILANDS, 1995). Uma estratégia utilizada por muitos microrganismos para obter ferro do meio ambiente é secreção sideróforos, compostos quelantes de baixo peso molecular (entre 300-1500 Da) que possuem elevada afinidade à ferro e outros íons metálicos, como zinco e cobre (LANKFORD, 1973; NEILANDS, 1973; RATLEDGE & DOVER, 2000). O sideróforo secretado pelas bactérias liga-se ao ferro e é transportado para célula através do sistema de transporte específico. Em bactérias gram-negativas, o transporte do complexo sideróforo- Fe^{3+} através da membrana externa necessita de mecanismos de transporte ativo via receptores da membrana externa. A energia requerida é fornecida pela força próton-motriz e é transduzido para os receptores da membrana externa pelo complexo TonB-ExbB-ExbD (POSTLE & KADNER, 2003).

A caracterização dos sideróforos pode ser determinada de acordo com seu mecanismo de biossíntese como: peptídeo não-riossomal sintetase (NRPS)-dependente ou NRPS-independente (RAYMOND & DERTZ, 2004; CHALLIS, 2005; DONADIO et al., 2007). A biossíntese de sideróforo já foi estudada em *R. leguminosarum* 8401 e *S. meliloti* 1021. Em ambos os casos, os genes de biossíntese estão posicionados no plasmídeo em *clusters* gênicos localizados perto dos genes que codificam seus respectivos receptores na membrana externa (PERSMARK, et al., 1993).

No proteoma de CIAT899, foram identificadas proteínas diferencialmente expressas, cujos genes codificadores estão localizados no plasmídeo constituindo dois clusters gênicos para biossíntese e transporte de sideróforos (Tabela 11, Figura 9). A maioria das proteínas codificadas por estes clusters foi encontrada somente no

tratamento com TRP, com exceção das proteínas AGB74034 AGB74038 (enzima dependente de piridoxal 5'-fosfato) que apresentou uma expressão significativamente maior (4,47X, p-value = 0,007) no tratamento com TRP (Tabela 11). Além das proteínas identificadas no proteoma (Tabela 11), o cluster A (Figura 9) contém genes que codificam duas proteínas do sistema de transporte de sideróforos FepB e FepC (AGB74039 e AGB74040) e um receptor de sideróforos TonB (AGB74041). O cluster B (Figura 8) contém ainda genes que codificam uma citocromo P450/ciclopeptídeo sintase (AGB74921), uma lauril/miristoil aciltransferase (AGB74920) e um exportador de metabolitos tóxicos MATE (AGB74924). À frente do gene AGB74926, que codifica uma NRPS sintetase EntF, são encontrados sete outros genes que também codificam proteínas relacionadas à síntese e transporte de sideróforos. A organização destes *clusters* são conservadas em outras espécies de *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mezorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Ensifer* conforme análise no PATRIC.

Tabela 11. Proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 envolvidas na biossíntese de sideróforos.

Uniprot	GenBank	Localização	Descrição	Condição	Fold (p-value) ^a
L0LRV1	AGB74033.1	pRtrCIAT899c	Diaminopimelato descarboxilase LysA	+TRP	4.5E-04
L0LV40	AGB74034.1	pRtrCIAT899c	Enzima dependente de piridoxal-fosfato (PALP)	-/+TRP	4.47 (6.9E-03)
L0LV63	AGB74035.1	pRtrCIAT899c	NAD/NADP octopina/nopalina desidrogenase	+TRP	2.9E-04
L0LTK4	AGB74036.1	pRtrCIAT899c	FhuF proteína de biossíntese de sideróforo	+TRP	7.0E-04
L0LRV7	AGB74038.1	pRtrCIAT899c	Sistema de transporte Fe ³⁺ -sideróforo, proteína FepB/TroA	-/+TRP	1.58 (0,11)
L0LUL1	AGB74922.1	pRtrCIAT899c	Diaminopimelato descarboxilase LysA	+TRP	3.5E-04
L0LUF5	AGB74923.1	pRtrCIAT899c	Cistationina β-liase MetC	+TRP	1.0E-03
L0LXS2	AGB74925.1	pRtrCIAT899c	N6-hidroxilisinaO-acetiltransferase	+TRP	6.7E-04
L0LW40	AGB74926.1	pRtrCIAT899c	NRPS ^b sintetase EntF	+TRP	2.9E-04

^a Fold: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos. p-value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula. Abundância: sinal total relativo à área da curva.

^b NRP – N on-ribosomal peptide synthetase.

A produção de sideróforos é regulada por ferro, sendo estimulada em condições limitantes de ferro via regulador FhuA . Os dados obtidos com o proteoma de CIAT899 mostram a regulação destes clusters pelo aminoácido triptofano ou AIA, o que sugere a possibilidade biossíntese de sideróforos contendo TRP. Culturas de

Aeromonas hydrophila suplementadas com TRP ou fenilalanina produzem amonobactin, um sideróforo composto de 2,3-ácido dihidroxibenzoico, lisina, glicina e triptofano (amonabactin T) ou fenilalanina (amonabactin P) (BARGHOUTH et al., 1989). Em *Pseudomonas*, a síntese do sideróforo quinolobactina envolve a rota triptofano-quinurenina-ácido xanturenico (MATTHIJS et al., 2004). Ainda, a atividade quelante de alguns metabólitos relacionados ao TRP, como o antranilato e o indol-3-piruvato tem sido descrita. Em *R. leguminosarum*, o antranilato já foi reportado como promotor no aumento na absorção de Fe^{3+} em condições de baixa concentração de ferro (RIOUX et al., 1986).

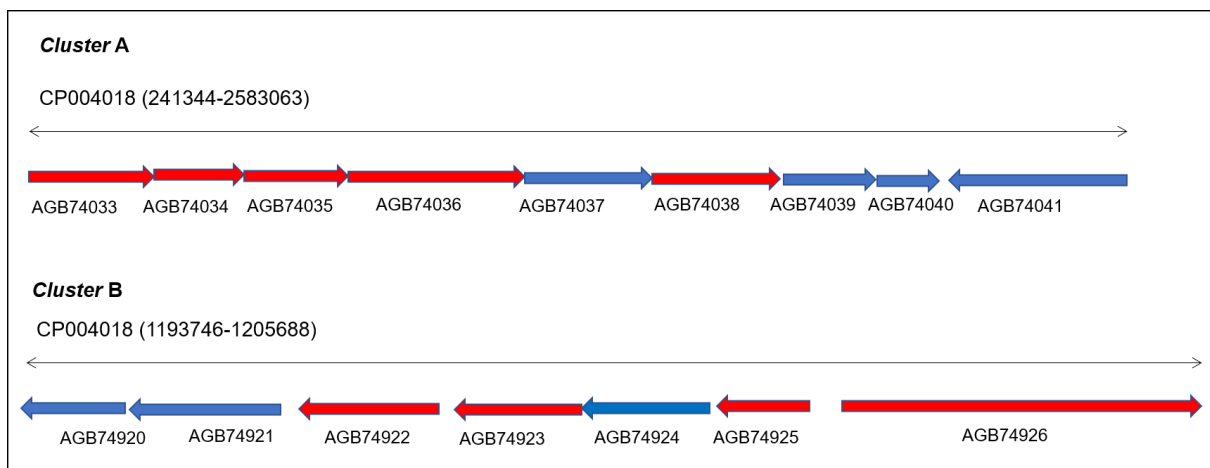


Figura 9. Organização gênica dos clusters A e B construídos por análise no software PATRIC, referente aos genes envolvidos com a biossíntese de sideróforos.

Quimiotaxia e motilidade

O flagelo bacteriano consiste de três regiões distintas: o corpo basal, o gancho e o filamento (EVANS et al., 2014). No proteoma de CIAT899 foram identificadas proteínas envolvidas em quimiotaxia e motilidade (Tabela 12). Dentre estas, a proteína AGB70082.1, que codifica a flagelina FlaA, a principal subunidade constituinte da região do filamento flagelar, foi diferencialmente expressa com um aumento significativo de 5X (p-valor = 2.0E-02). Adjacente ao gene que codifica esta flagelina FlaA encontra-se o gene de outra FlaA (AGB70081.1) e, próximo a estes, encontra-se o gene que codifica a proteína FlgL (AGB70094.10), que constitui a região de conexão entre o gancho e o filamento do flagelo (EVANS et al., 2014). As proteínas FlaA e FlgL foram identificadas somente no proteoma de CIAT899 na condição com TRP. No genoma de CIAT899, estes genes estão organizados em um cluster que codifica proteínas envolvidas na montagem das diferentes subunidades e

regiões do flagelo tanto em quimiotaxia e motilidade. Ainda, foram identificadas no proteoma, proteínas envolvidas na regulação do processo de quimiotaxia, como o receptor MCP (*methyl-accepting chemotaxis protein*; AGB70292.1) e as proteínas regulatórias CheY1 e CheY2 (AGB70050.1, AGB70055.1) (Tabela 12). Estas proteínas estão envolvidas na recepção (proteína MCP) de sinais quimiotáticos e na transmissão (proteínas CheY1 e CheY2) destes sinais ao motor do flagelo, alterando o comportamento de locomoção do flagelo e permitindo a bactéria responder a alterações na composição química do ambiente (BREN & EISENBACH, 2000). As proteínas que codificam os reguladores CheY1 e CheY2 encontrados no genoma estão organizados em um cluster gênico relacionado à quimiotaxia (*cheXY₁AWRBY₂D*) e próximos a genes relacionados a estrutura e funcionamento do flagelo.

Estes dados sugerem que CIAT899 respondeu a presença do L-triptofano no meio de cultivo alterando seu comportamento de locomoção. Em *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* a presença de D-aminoácidos inibiu a formação de biofilme e desfez o biofilme existente (KOLODKIN-GAL et al., 2010; HOCHBAUM et al., 2011) Em *Pseudomonas aeruginosa*, os aminoácidos triptofano e tirosina inibiram a formação de biofilme e aumentaram a motilidade (BRANDENBURG et al., 2013). Shimazaki et al (2012) em estudos com *E. coli* mostraram que a presença de L-triptofano inibiu a formação de biofilme aumentando a catalise de triptofano em compostos indólicos. O triptofano também pode inibir a formação de biofilme, em parte, modulando a motilidade da célula. Reprimir a síntese do flagelo é necessário para formação de biofilme por *P. aeruginosa* (O'Toole, 1998; Ruer et al., 2007; Bala et al., 2011; Conrad et al., 2011;). Análises futuras necessitam ser realizadas para avaliar se a presença do triptofano em *R. tropici* CIAT899 interfere na motilidade e formação do biofilme desta bactéria, como sugere os resultados de expressão diferencial das proteínas relacionadas à formação de flagelo.

Tabela 12. Proteínas identificadas no proteoma de CIAT899 envolvidas na biossíntese de flagelo.

Uniprot	GenBank	Localização	Descrição	Condição	Fold (p-value) ou abundância ^a
L0LGE4	AGB70292.1	cromossomo	Receptor quimiotaxia (MCP)	-/+TRP	1.1 (3.5E-01)
L0LJ06	AGB70050.1	cromossomo	Regulador de quimiotaxia CheY1	+TRP	2.2E-03

L0LJ09	AGB70055.1	cromossomo	Regulador de quimiotaxia CheY2	-/+TRP	1.2 (3.2E-01)
L0LHC0	AGB70081.1	cromossomo	Flagelina FlaA	+TRP	3.8E-04
L0LFX2	AGB70082.1	cromossomo	Flagelina FlaA	-/+TRP	5.0 (2.0E-02)
L0LJ45	AGB70094.1	cromossomo	Flagelina FglL	+TRP	6.5E-04
L0LMS5	AGB71375.1	cromossomo	Biossíntese de flagelo FliO	-TRP	1.9E-04

^a Fold: Razão das abundâncias da proteína entre dois tratamentos. P-value: medida estatística que tenta dizer o quão aquela análise rejeitou ou não uma hipótese nula. Abundância: sinal total relativo à área da curva.

Conclusão

O crescimento de CIAT899 foi estatisticamente maior na presença de amônio nos 3 tempos (24 h, 36 h e 48 h) analisados por densidade ótica (DO₅₃₀).

A presença do aminoácido triptofano na cultura aumentou a produção de ácido indol-3-acético por CIAT899, e o amônio interferiu negativamente na produção deste fitormônio.

A utilização da nanoLC-MS/MS foi eficiente na análise de proteínas expressas por CIAT899 cultivado na presença ou ausência de triptofano no qual foram identificadas 617 proteínas utilizando software PatternLab com nos parâmetros de FDR < 0,01 e com 6 ou mais leituras de intensidade durante a extração do cromatograma de íons.

Pela análise do *Gene Ontology*, os termos que apresentaram maior número de proteínas identificadas foram atividade catalítica na função molecular; parte da célula no componente celular; e processo celular dentro de processo biológico.

Na análise pelo KEGG, os principais processos identificados foram biossíntese de metabólitos secundários, biossíntese de antibiótico, metabolismo microbiano e transportadores ABC.

No estudo das proteínas diferencialmente expressas, destacaram-se a fosfatase ácida, lactato desidrogenase, proteína periplásmica de ligação oligopeptídica, transportador ABC, proteína do locus B associada com invasão, succinoglucana ExoF, proteína da via de dissimilação da Fucose e três proteínas ribossomais 50S.

Em relação aos processos que foram alterados em resposta ao aminoácido triptofano foi identificado o metabolismo de sideróforo, biossíntese de polissacarídeos de superfície celular, quimiotaxia e motilidade e biossíntese e metabolismo de aminoácidos aromáticos por CIAT899.

Referências

- ALKHALAF, L. M.; RYAN, K. S. Biosynthetic manipulation of tryptophan in bacteria: pathway and mechanisms. *Chemistry and Biology*, v. 22, p. 317-328, 2015.
- BALA, A.; KUMAR, R.; HARJAI, K. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections. **J. Med. Microbiol**, n. 60, p. 300–306, 2011.
- BARGHOUTH, S. et al. Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. **J Bacteriol**, v. 171, n.4, p. 1811–1816, 1989.
- BATISTA, J. S. S.; TORRES, A. R.; HUNGRIA, M. Towards a two dimensional proteomic reference map of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15: spotlighting “hypothetical proteins”. **Proteomics**, v. 10, p. 3176-3189, 2010.
- BEATTIE, G. A. Plant-associated bacteria: Survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: GNANAMANICKAM, S. S. **Plant-associated Bacteria**. Springer Netherlands, p. 1-56, 2006.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BREN, A.; EISENBACH, M. How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation. **J Bacteriol**, v. 182, n. 24, p. 6865–6873, 2000.
- CANTERI, M.G. et al. SASM-Agri – Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n2, p.18-24, 2001.
- CARVALHO, P. C.; FISCHER, J. S. G.; XU, T.; COCIORVA, D.; et al. Search Engine Processor: filtering and organizing PSMs. **Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 944–949, 2012
- CARVALHO, P.C.; LIMA, D.B.; LEPREVOST, F.V.; SANTOS, M.D.M.; FISCHER, J.S.G.; AQUINO, P.F.; et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v.11, n.1, p. 102-117, 2016.
- CHALLIS, G. L. A Widely Distributed Bacterial Pathway for Siderophore Biosynthesis Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases. **ChemBiochem**, v. 6, n.4, p. 601-611, 2005.
- CHAMPION, A.; LUCAS, M.; TROMAS, A.;...LAPLAZE, L. Inhibition of auxin signaling in *Frankia*-infected cells in *Casuarina glauca* nodules leads to increased nodulation. **Plant Physiology**, v. 167, n. 3, p. 1149-1157, 2015.

COLLINS, P. C.; FERRIER, R.J. Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products, Jul 1995.

CONRAD, J.C.; Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. **Biophys. J**, v. 100, p.1608–1616, 2011.

CRAWFORD, I.P. Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. **Bacteriol Review**, v, 39, n.2, p. 87–120, 1975.

CRESPO-RIVAS et al., *Sinorhizobium fredii* HH103 cgs Mutants Are Unable to Nodulate Determinate-and Indeterminate Nodule-Forming Legumes and Overproduce an Altered EPS. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 22, n. 5, p.575-588.

DE BILLY, F.; GROSJEAN, C.; MAY, S.; BENNETT, M.; CULLIMORE, J. V. Expression studies on AUX1-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, p. 267–277, 2001.

DING, Y.; OLDROYD, G.E.D. Positioning the nodule, the hormone dictum. **Plant Signaling and Behavior**, v.4, p.89–93, 2009.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; SOSIO M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. **Nat Prod Rep.**, n. 24, p. 1073–1109, 2007

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

EVANS et al. Building a flagellum outside the bacterial cell. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 566-572, 2014.

FINAN et al. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 9889-9894, 2001.

GAY-FRARET, J.; et al. Cyclic-β-glucans of *Rhizobium (Sinorhizobium)* sp. Strain NGR234 are required for hypo-osmotic adaptation, motility, and efficient symbiosis with host plants. **FEMS Microbiology**, v. 333, n. 1, p. 28-36, 2012.

GHOSH, P.K.; KUMAR, T.; MAITI, T. K. Production and Metabolism of Indole Acetic Acid in Root Nodules and Symbiont (*Rhizobium undicola*) Isolated from Root Nodule of Aquatic Medicinal Legume *Neptunia oleracea* Lour. **Journal of Botany**, 2015.

GIL-SERRANO, A. G.; SANCHES DEL JUNCO, A.; MATEO, P. T.; MEGIAS, M.; CAVIEDES, M. A. Structure of the extracellular polysaccharide secreted

by *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CIAT 899. **Carbohydrate Research**, v. 204, p. 103-107, 1990.

GORDON, A. H. Electrophoresis of proteins in 78olyacrylamide and starch gels. **New York: Elsevier**, p. 213, 1995.

GORDON, Solon A.; WEBER, Robert P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192, 1951.

HEIDSTRA, R. G.; NILSEN, F.; MARTINEZ-ABARCA, F.; VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T. Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH_4NO_3 inhibition on root hair deformation. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, n. 2, p. 215-220, 1997.

HOCHBAUM, A.I.; et al. Inhibitory effects of D-amino acids on *Staphylococcus aureus* biofilm development. **J. Bacteriol**, v. 193, p. 5616–5622, 2011.

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, 2003.

IMADA, E.L.; DE OLIVEIRA, A.L.M.; HUNGRIA, M.; RODRIGUES, E. P. Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. **Research in Microbiology**, v. 168, n.3, p. 283-292, 2017.

INGRAM-SMITH, C., AND MILLER, K.J. Effects of ionic and osmotic strength on the glucosyltransferase of *Rhizobium meliloti* responsible for cyclic beta-(1,2)-glucan biosynthesis. **Applied Environment Microbiology**, v.64, p. 1290–1297, 1998.

JANCZAREK, M. Environmental Signals and Regulatory Pathways That Influence Exopolysaccharide Production in *Rhizobia*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 7898-7933, 2011.

JEAN, M., DEMOSS, R. D. Indolelactate dehydrogenase from *Clostridium sporogenes*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.14, n. 4, p. 429-435, 1968.

KANEHISA, M. A database for post-genome analysis. **Trends in genetics**, v. 13, n. 9, p. 375-376, 1997.

KAWAHARA, R.; LIMA, R.N.; DOMINGUES, R.R.; PAULETTI, B.A.; MEIRELLES, G.V.; ASSIS, M.; FIGUEIRA, A.C.; PAES LEME, A.F. Deciphering the role of the ADAM17-dependent secretome in cell signaling. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 2080-2093, 2014.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 426- 435, 2011.

- KOHLLEN, W.; LIANG PIN, N.G. J.; DEINUM, E.E.; MATHESIUS, U. Auxin transport, metabolism, and 79olyacryl during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 229–244, 2018.
- KOLODKIN-GAL, I.; et al., D-amino acids trigger biofilm disassembly. **Science**, n. 328, p. 627–629, 2010.
- LANKFORD, C. E. Bacterial assimilation of iron. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 2, p. 273-331, 1973.
- LAPLAZE, L., LUCAS, M., CHAMPION, A. Rhizobial root hair infection requires auxin signaling. **Trends in Plant Science**, v. 20, p. 332–334, 2015.
- LEWIS, D.B.; HUGHES, C.; FRASER, G. M. Building a flagellum outside the bacterial cell. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 566-572, 2014.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 417-426, 1991.
- MATHESIUS, U. Goldacre paper: Auxin: at the root of nodule development?. **Functional Plant Biology**, v. 35, n. 8, p. 651-668, 2008.
- MATTHIJS, S. et al. The *Pseudomonas* siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an intermediate of the kynurenine pathway. **Mol Microbiol.** v. 52, n. 2, p. 371-384, 2004.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v.73, p.121-132, 2002.
- NEILANDS, J. B. Microbial iron transport compounds (siderochromes). **In Inorganic Biochemistry**, v. I, 1973.
- NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 26723-26726, 1995.
- OBBERG, A.L.; VITEK, O. Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 5, p. 2144-2156, 2009.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol. Microbiol.** 30:295–304, 1998.
- PATRIARCA, E. J.; TATÈ, R.; IACCARINO, M. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 203-222, 2002.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.

PEDRAZA, R.O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUI, M.L.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, n. 1, p.15-21, 2004.

PERSMARK, M., et al. Isolation and structure of rhizobactin 1021a siderophore from alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. **J Am Chem Soc**, v. 115, p. 3950–395, 1993.

PIERCE, B. A. Genética – Um Enfoque Conceitual – 4ª Ed, 2011.

PII, Y.; CRIMI, M.; CREMONESE, G.; SPENA, A.; PANDOLFINI, T. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 21, 2007.

POSTLE, K.; KADNER, R.J. Touch and go: tying TonB to transport. **Mol Microbiol.**, v. 49, n.4, p. 869-882, 2003.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, v. 2, p.1896–1906, 2007.

RATLEDGE, C.; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu Rev Microbiol.**, v. 54, p. 881-941, 2000.

RAYMOND, K.N.; DERTZ, E.A. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 3584–3588, 2004.

REUBER, T. L.; WALKER, G. C. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. **Cell Press**, v. 74, n. 2, p. 269-280, 1993.

RIOUX, C.R.; JORDAN, D.C.; RATTRAY, B. M. Iron requirement of *Rhizobium leguminosarum* and secretion of anthranilic acid during growth on an iron-deficient medium. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.248, p. 175-182, 1986.

RUER, S.; STENDER, S.; FILLOUX, A.; DE BENTZMANN, S. Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. **J. Bacteriol**, n. 189, p. 3547–3555, 2007.

SHIMAZAKI, J.; FURUKAWA, S.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. I-Tryptophan prevents *Escherichia coli* biofilm formation and triggers biofilm degradation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 419:715–718, 2012.

SKORUPSKA, A.; MONIKA JANCZAREK, MAŁGORZATA MARCZAK, ANDRZEJ MAZUR; JAROSŁAW KRÓL. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions . **Microbial Cell Factories**, 2006.

SPAEPEN, S. Plant Hormones Produced by Microbes. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. **Springer International Publishing**, p. 247-256. 2015.

SPAEPEN, S.; BOSSUYT, S.; ENGELEN, K.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. **The New phytologist**, v. 201, n. 3, p.850-861, 2014.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 2011.

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

STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 3, p. 197-206, 2012.

SUZAKI, T.; ITO, M.; KAWAGUCHI, M. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W.J.; PRINSEN, E. 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 Interaction**, v. 17, p. 1153–1161, 2004.

TRINCHANT, J. C. & RIGAUD, J. Lactate dehydrogenase from *Rhizobium*. Purification and role in indole metabolism. **Physiologia plantarum**, v. 32, p. 394-399, 1974.

VILLEN, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1630–1638, 2008.

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 170, n. 2, p. 283-287, 2007.

WHITFIELD, C.; PAIMENT, A. Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 23, p. 2491-2502, 2003.

WOODWARD, A.W.; BARTEL B. Auxin: regulation, action, and interaction
YAMADA, T.; LETUNIC, 1.; OKUDA, S.; KANEHISA, M.; BORK P. iPath2.0: interactive pathway explorer. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 412-415, 2011.

ZAHIR, Z.A.; SHAH, M.K.; NAVEED, M.; AKHTER, M.J. Substrate-dependent auxin production by *Rhizobium phaseoli* improves the growth and yield of *Vigna 81olyacr* L.

under salt stress conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 1288-1294, 2010.

ZAHARAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biological Review**, v. 63, p. 968-998, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-DURÁN, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 2, p. 161-164, 2002.

AIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 819, 2009.

ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4016–4021. 1995.

AQUINO, P. F.; LIMA, D. B.; DE SALDANHA DA GAMA FISCHER, J.; MELANI, R. D.; NOGUEIRA, F. C.; CHALUB, S. R.; CARVALHO, P. C. Exploring the proteomic landscape of a gastric cancer biopsy with the shotgun imaging analyzer. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 1, p. 314-320, 2013.

BADENOCH-JONES, J. A. N. E.; ROLFE, BARRY G.; LETHAM, DAVID S. Phytohormones, *Rhizobium* Mutants, and Nodulation in Legumes. **Plant Physiology**, v. 73, p. 347-352, 1983.

BADENOCHJONES, J.; ROLFE, B.G.; LETHAM, D.S. Phytohormones, *Rhizobium* mutants, and nodulation in legumes. 3. Auxin metabolism in effective and ineffective pea root nodules. **Plant Physiology**, v. 73, p. 347–352, 1983.

BARBULOVA, A.; ROGATO, A.; D'APUZZO, E.; OMRANE, S.; CHIURAZZI, M. Differential effects of combined N sources on early steps of the Nod factor-dependent transduction pathway in *Lotus japonicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, p. 944-1003, 2007.

BARCELLOS, F.G.; MENNA, P.; DA SILVA BATISTA, J. S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium* (Ensifer) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2635-2643, 2007.

BARRET, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of Burkholderia, Cupriavidus, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1198-1206, 2006.

BARTLING, D.; 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.

BATISTA, J. S. S.; TORRES, A. R.; HUNGRIA, M. Towards a two dimensional proteomic reference map of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15: spotlighting “hypothetical proteins”. **Proteomics**, v. 10, p. 3176-3189, 2010.

BEATTIE, G. A. Plant-associated bacteria: Survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: GNANAMANICKAM, S. S. **Plant-associated Bacteria**. Springer Netherlands, p. 1-56, 2006.

BERNAL, G. R.; TLUSTY, B.; DE JENSEN, C. E.; VAN BERKUM, P.; GRAHAM, P. H. Characteristics of rhizobia nodulating beans in the central region of Minnesota. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 1023-1031, 2004.

BIANCO, C.; DEFEZ, R. *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 3097–3107, 2009.

BIANCO, C.; et al. Improvement of phosphate solubilization and *Medicago* plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4626–463, 2010.

BLAŽINKOV, M.; SIKORA, S., UHER, D., MAČEŠIĆ, D., REDŽEPOVIĆ, S. Genotypic characterization of indigenous *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* field population in Croatia. **Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)**, v. 72, n. 2, p. 153-158, 2007.

BOIVIN- MASSON, C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; BATUT, J. Establishing nitrogenfixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in Microbiology**, v. 17, p. 458-466, 2009.

BOLAÑOS-VÁSQUEZ, M. C.; WERNER, D. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 3, p. 339-346, 1997.

BOUSSAU, B.; KARLBERG, E. O.; FRANK, A. C.; LEGAULT, B. A.; ANDERSSON, S. G. Computational inference of scenarios for α -proteobacterial genome evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9722-9727, 2004.

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

BRANDL, M.T.; LINDOW, S.E. Environmental signals modulate the expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 10, p. 499–505, 1997.

BRANDL, M.T.; QUINONES, B.; LINDOW, S.E.. Heterogeneous transcription of an indoleacetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola* on plant surfaces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 3454–3459, 2001.

- BURK, D. Azotase and nitrogenase in *Azotobacter*. **Ergebnisse Enzymforsch**, v. 3, p. 23-56, 1934.
- BURK, D.; LINEWEAVER, H.; HORNER, C. K. The specific influence of acidity on the mechanism of nitrogen fixation by *Azotobacter*. **Journal of bacteriology**, v. 27, n. 4, p. 325-340, 1934.
- CAETANO-ANOLLES, G.; CRIST-ESTES, D. K.; BAUER, W. D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 7, p. 3164-3169, 1988.
- CAMERINI S., et al. Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. **Archives of Microbiology**, v. 190, p. 67–77, 2008.
- CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.
- CAPELA, D.; CARRERE, S.; BATUT, J. Transcriptome-based identification of the *Sinorhizobium meliloti* *NodD1* regulon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4910-4913, 2005.
- CARVALHO, P. C.; FISCHER, J. S. G.; XU, T.; COCIORVA, D.; et al. Search Engine Processor: filtering and organizing PSMs. **Proteomics**, v. 12, n. 7, p. 944–949, 2012.
- CARVALHO, P. C.; YATES III, J. R.; BARBOSA, V. C. Analyzing shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics. **Current Protocols in Bioinformatics**, p. 13.13. 1-13.13. 15, 2010.
- CARVALHO, P.C.; FISCHER, J.S.; CHEN, E.I.; DOMONT, G.B.; CARVALHO, M.G.; DEGRAVE, W.M.; YATES III, J.R.; BARBOSA, V.C. GO Explorer: A gene-ontology tool to aid in the interpretation of shotgun proteomics data. **Proteome Science**, v. 7, n. 6, 2009.
- CARVALHO, P.C.; FISCHER, J.S.G.; XU, T.; YATES III, J.R.; BARBOSA, V.C. PatternLab: From mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. **Current Protocols in Bioinformatics**. 2012.
- CARVALHO, P.C.; LIMA, D.B.; LEPREVOST, F.V.; SANTOS, M.D.M.; FISCHER, J.S.G.; AQUINO, P.F.,; et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v.11, n.1, p. 102-117, 2016.
- CHABOT, R.; CHANTAL, J.; KLOEPPER, J. Short communication effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 1615–1618, 1998.
- CHAMPION, A.; LUCAS, M.; TROMAS, A.;...LAPLAZE, L. Inhibition of auxin signaling in *Frankia*-infected cells in *Casuarina glauca* nodules leads to increased nodulation. **Plant Physiology**, v. 167, n. 3, p. 1149-1157, 2015.

CHEN, S. X.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

CHEN, W. M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7266-7272, 2003.

CHENG, Q. Perspectives in biological nitrogen fixation research. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 7, p. 786-798, 2008.

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.

COSTACURTA, A.; MAZZAFERA, P.; ROSATO, Y.B. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 159, p. 215–220, 1998.

D'HAENZE, W.; HOLSTERS, M. *Nod* factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, v. 12, n. 6, p. 79R-105R, 2002.

DARDANELLI, M. S.; DE CÓRDOBA, F. J. F.; ESTÉVEZ, J.; CONTRERAS, R.; CUBO, M. T.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. Á.; ... OLLERO, F. J. 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.

DART, P.J.; WILDON, D.C. Nodulation and nitrogen fixation by *Vigna sinensis* and *Vicia atropurpurea*: The influence of concentration, form, and site of application of combined nitrogen. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 21, n. 1, p. 45 – 56, 1970.

DE BILLY, F.; GROSJEAN, C.; MAY, S.; BENNETT, M.; CULLIMORE, J. V. Expression studies on AUX1-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, p. 267–277, 2001.

DE SMET, I.; TETSUMURA, T.; DE RYBEL, B.; et al. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. **Development**, v.134, p. 681-690, 2007.

DEL CERRO, P.; PÉREZ-MONTAÑO, F.; GIL-SERRANO, A.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M.; OLLERO, F. J. The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. **Scientific Reports**, v. 7, 46712, 2017.

DENARIE, J.; DEBELLE, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J. C. *Rhizobium* and legume nodulation: A molecular dialogue. In: **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Springer Netherlands, p. 19-30, 1993.

- DIAS, L. L. C.; BALBUENA, T. S.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; SHEVCHENKO, A.; FLOH, E. I. S. Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 23-33, 2010.
- DING, Y.; OLDROYD, Giles, E.D.O. Positioning the nodule, the hormone dictum. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 2, p. 89-93, 2009.
- DOMON, B. A., R. Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 710-21, 2010.
- DONATI, A.J.; LEE, H.I.; LEVEAU, J.H.; CHANG, W.S. 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.
- DOS SANTOS, P. C.; FANG, Z.; MASON, S. W.; SETUBAL, J. C.; DIXON, R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 162, 2012.
- DOSSELAERE, F.; VANDERLEYDEN, J. A metabolic node in action: Chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, p. 75-131, 2001.
- DUBROVSKY, J.G.; SAUER, M.; NAPSUCIALY-MENDIVIL, S.; IVANCHENKO, M.G.; FRIML, J.; SHISHKOVA, S.; CELENZA, J.; BENKOVÁ, E. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8790-8794, 2008.
- DUNN, M. F.; PUEPPKE, S. G.; KRISHNAN, H. B. The *nod* gene inducer genistein alters the composition and molecular mass distribution of extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium fredii* USDA193. **FEMS Microbiology Letters**, v. 97, n. 1-2, p. 107-112, 1992.
- DUSHA, I.; KONDOROSI, A. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 240, n. 3, p. 435-444, 1993.
- DUSHA, I.; KONDOROSI, A. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 240, p. 435-444, 1993.
- ESSELING, J. J.; LHUISSIER, F. G. P; EMONS, A. M. C. *Nod* factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1982-1988, 2003.
- ESTÉVEZ, J.; SORIA-DÍAZ, M. E.; DE CÓRDOBA, F. F.; MORÓN, B.; MANYANI, H.; GIL, A.; MEGÍAS, M. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na⁺ stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, n. 2, p. 220-231, 2009.

FENN, J.B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v.6, p.64-71, 1989.

FERGUSON, S. J. Nitrogen cycle enzymology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 2, p. 182-193, 1998.

FOUCHER, F.; KONDOROSI, E. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 773-786, 2000.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; MCCOY, E. Root nodule bacteria of leguminous plants. Madison, University of Wisconsin Press, 343p, 1932.

FUJISHIGE, N. A.; LUM, M. R.; DE HOFF, P. L.; WHITELEGGE, J. P.; FAULL, K. F.; HIRSCH, A. *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation. **Molecular Microbiology**, 67: 504–515, 2008.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, p. 280-300, 2004.

GALIBERT, F.; FINAN, T. M.; LONG, S. R.; PÜHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; ... BOTHE, G. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v. 293, n. 5530, p. 668-672, 2001.

GHOSH, S.; BASU, P.S. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. **Microbiological Research**, v. 161, p. 362–36, 2006.

GICHANGI A.; MAOBE S. N.; KARANJA, D.; GETABU, A.; MACHARIA, C. N.; OGECHA, J. O. Assessment of production and marketing of climbing beans by smallholder farmers in Nyanza region, Kenya. **World Journal of Agriculture Sciences**, v. 8, n. 3, p. 293–302, 2012.

GOEDHART, J.; HINK, M. A.; VISSER, A. J.; BISSELING, T.; GADELLA, T. W. In vivo fluorescence correlation microscopy (FCM) reveals accumulation and immobilization of *Nod* factors in root hair cell walls. **The Plant Journal**, v. 21, n. 1, p. 109-119, 2000.

GORDON, Solon A.; WEBER, Robert P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192, 1951.

GRAHAM, P. H. ; DRAEGER, K. J., FERREY, M. L., CONROY, M. J., HAMMER, B. E., MARTINEZ, E., ... QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian journal of microbiology**, v. 40, n. 3, p. 198-207, 1994.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean

(*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 867-876, 2007.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J.N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 293-296, 2008.

GUERREIRO, N.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G.; DJORDJEVIC, M. A. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 4, p. 506-516, 1997.

GUO, R. Effect of four nitrogen compounds on nodulation and nitrogen fixation in faba bean, white lupin and medic plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 5, p. 501-508, 1992.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

HAAG, A. F.; ARNOLD, M. F. F.; MYKA, K. K.; KERSCHER, B.; DALL'ANGELO, S.; ZANDA, M.; MERGAERT, P.; FERGUSON, G. P. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 364-383, 2013.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 117-153, 2003.

HABER, F. Bemerkung zu vorstehender Notiz. **Naturwissenschaften**, v. 11, n. 18, p. 339-340, 1923.

HABER, F. Über die darstellung des ammoniaks aus stickstoff und wasserstoff. **Naturwissenschaften**, v. 10, n. 49, p. 1041-1049, 1922.

HARRISON, M. J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 19-42, 2005.

HASSAN, S.; MATHESIUS, U. 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.

HEIDSTRA, R. G.; NILSEN, F.; MARTINEZ-ABARCA, F.; VAN KAMMEN, A.; BISSELING, T. Nod factor-induced expression of leghemoglobin to study the mechanism of NH_4NO_3 inhibition on root hair deformation. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, n. 2, p. 215-220, 1997.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

HESTER, R. E.; HARRISON, R. M. *Soils and Food Security*. London: Royal Society of Chemistry, 2012.

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, 2003.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: BIOFAG, org. *Uso y perspectivas de los biofertilizantes en iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial*. **Biofag**, p. 1-16, 2007

HUNGRIA, M.; DE S ANDRADE, D., DE O CHUEIRE, L. M., PROBANZA, A., GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *rhizobia* from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 11, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A.; CAMPO, R. J.; CHUEIRE, L. M.; DE ANDRADE, D. S. The Brazilian experience with the soybean (*Glycine max*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. In: **Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity**., Dordrecht, p. 515-518, 2000.

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.

IMADA, E.L.; DE OLIVEIRA, A.L.M.; HUNGRIA, M.; RODRIGUES, E. P. Indole-3-acetic acid production via the indole-3-pyruvate pathway by plant growth promoter *Rhizobium tropici* CIAT 899 is strongly inhibited by ammonium. **Research in Microbiology**, v. 168, n.3, p. 283-292, 2017.

JANCZAREK, M.; RACHWAŁ, K.; MARZEC, A.; GRZĄDZIEL, J.; PALUSIŃSKA-SZYSZ, M. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 94-113, 2015.

JIA, H. P.; QUADRELLI, E. A. Mechanistic aspects of dinitrogen cleavage and hydrogenation to produce ammonia in catalysis and organometallic chemistry: relevance of metal hydride bonds and dihydrogen. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 2, p. 547-564, 2014.

JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. E.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*–*Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 619-633, 2007.

JUMAS-BILAK, E.; MICHAUX-CHARACHON, S.; BOURG, G.; RAMUZ, M.; ALLARDET-SERVENT, A. Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 10, p. 2749-2755, 1998.

KANG, B.R.; et al. Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. **Current Microbiology**, v. 52, p. 473–476, 2006.

KAWAHARA, R.; LIMA, R.N.; DOMINGUES, R.R.; PAULETTI, B.A.; MEIRELLES, G.V.; ASSIS, M.; FIGUEIRA, A.C.; PAES LEME, A.F. Deciphering the role of the ADAM17-dependent secretome in cell signaling. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 2080-2093, 2014.

KERESZT, A.; MERGAERT, P.; KONDOROSI, E. Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims?. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1300-1309, 2011.

KHALID, A.; TAHIR, S.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. **Australian Journal of Soil Research**, v. 42, p. 921–926, 2005.

KOOMEN, M. J. et al., Proteomic Contributions to Personalized Cancer Care. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, p. 1780-1794, 2008.

KOHLER, W.; LIANG PIN, N.G. J.; DEINUM, E.E.; MATHESIUS, U. Auxin transport, metabolism, and signalling during nodule initiation: indeterminate and determinate nodules. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 229–244, 2018.

KRISHNAN, H. B.; LORIO, J.; KIM, W. S.; JIANG, G.; KIM, K. Y.; DEBOER, M.; PUEPPKE, S. G. Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 7, p. 617-625, 2003.

LAPLAZE, L., LUCAS, M., CHAMPION, A. Rhizobial root hair infection requires auxin signaling. **Trends in Plant Science**, v. 20, p. 332–334, 2015.

LASKOWSKI, M.; GRIENEISEN, V.A.; HOFHUIS, H.; HOVE, C.A.T.; HOGEWEG, P., et al. Root System Architecture from Coupling Cell Shape to Auxin Transport. **PLOS Biology** v. 6, n. 12, p. e307, 2008.

LAVENUS, J.; GOH, T.; ROBERTS, I.; GUYOMARC'H, S.; LUCAS, M.; DE SMET, I.; FUKAKI, H.; BEECKMAN, T.; BENNETT, M.; LAPLAZE, L. Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin. **Trends in Plant Science**, v.18, n. 8, p. 450-480, 2013.

LI, B.; LI, G.; KRONZUCKER, H.J.; BALUSKA, F.; SHI, W. Ammonium stress in *Arabidopsis*: signaling, genetic loci, and physiological targets. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 107–114, 2014.

LINK, A. J.; ENG, J.; SCHIELTZ, D. M.; CARMACK, E.; MIZE, G. J.; MORRIS, D. R.; ...YATES, J. R. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 676-682, 1999.

LIU, H.; LIN, D.; YATES, J. R., 3RD. Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. **Biotechniques**, v. 32, n. 4, p. 898-902, 2002

LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 22, p. 37-78, 2003.

MACKAY, B. A.; FRYZUK, M. D. Dinitrogen coordination chemistry: on the biomimetic borderlands. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 385-402, 2004.

MACLEAN, A. M.; FINAN, T. M.; SADOWSKY, M. J. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. **Plant Physiology**, v. 144, n. 2, p. 615-622, 2007.

MALLICK, P.; KUSTER, B. Proteomics: a pragmatic perspective. **Nature Biotechnology**, v. 28, no. 7, p. 695-709, 2010.

MANN, M.; KELLEHER, N. L. Precision proteomics: the case for high resolution and high mass accuracy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 47, p. 18132-8, Nov 25 2008.

MARCHANT, A.; BHALERAO, R.; CASIMIRO, I.; EKLÖF, J.; CASERO, P.J.; BENNETT, M.; SANDBERG, G. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. **The Plant Cell**, v. 14, n. 3, p. 589-597, 2002.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant Soil**, v. 252, p. 11–23, 2003.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 417-426, 1991.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 333-339, 2003.

MARX, V. Targeted proteomics. **Nature Methods**, v. 10, n. 1, p. 19-22, 2013.

MATHESIUS, U. Goldacre paper: Auxin: at the root of nodule development?. **Functional Plant Biology**, v. 35, n. 8, p. 651-668, 2008.

MATHU, S.; HERRMANN, L.; PYPERS, P.; MATIRU, V.; MWIRICHIA, R.; LESUEUR, D. Potential of indigenous bradyrhizobia versus commercial inoculants to improve cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.) and green gram (*Vigna radiata* L. wilczek.) yields in Kenya. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 58, p. 750–763, 2012.

MCGLYNN, S. E.; BOYD, E. S.; PETERS, J. W.; ORPHAN, V. J. Classifying the metal dependence of uncharacterized nitrogenases. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 419, 2013.

MEGHVANSI, M. K.; PRASAD, K.; MAHNA, S. K. Symbiotic potential, competitiveness and compatibility of native *Bradyrhizobium japonicum* isolates to three soybean genotypes of two distinct agro-climatic regions of Rajasthan, India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 303–310, 2010.

MERINO, E.; JENSEN, R.A.; YANOFSKY, C. Evolution of bacterial trp operons and their regulation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 78–86, 2008.

MORÓN, B.; SORIA-DÍAZ, M. E.; AULT, J.; VERROIOS, G.; NOREEN, S.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; ... SOUSA, C. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 9, p. 1029-1040, 2005.

MORON, B.; SORIA-DIAZ, M.E.; AULT, J.; VERROIOS, G.; NOREEN, S.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; GIL-SERRANO, A.; THOMAS-OATES, J.; MEGIAS, M.; SOUSA, C. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. **Chemistry & Biology**, v.12, p. 1029–1040, 2005.

MORRIS, R. O. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, n. 1, p. 509-538, 1986.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v.73, p.121-132, 2002.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 948-950, 2001.

MUTUMA, S. P.; OKELLO, J. J.; KARANJA, N. K.; WOOMER, P. I.. Smallholder farmers' use and profitability of legume inoculants in Western Kenya. **African Crop Science Journal**, v. 22, p. 205–214, 2014.

MWANGI, S. N.; KARANJA, N. K.; BOGA, H.; KAHINDI, J. H. P.; MUIGAI, A.; ODEE D., et al. Genetic diversity and symbiotic efficiency of legume nodulating bacteria from different land use systems in Taita Taveta, Kenya. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 13, p. 109–118, 2011.

NAGARAJ, N. et al. System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top Orbitrap. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 3, p. M111 013722, 2012.

NAGARAJ, N. et al. System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top Orbitrap. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 3, p. M111 013722, 2012.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G.; VALORI, F. Effects of Root Exudates in Microbial Diversity and Activity in Rhizosphere Soils. **Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence**, Chapter 14, 2008.

NONGBRI, P. 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.

OBBERG, A.L.; VITEK, O. Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 5, p. 2144-2156, 2009.

OBERHÄNSLI, T.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. 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.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 519-546, 2008.

OLDROYD, G. E. D.; MURRAY, J. D., POOLE, P. S., DOWNIE, J. A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 119-144, 2011.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 5, p. 252-62, 2005.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROSENBLUETH, M.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1271-1284, 2008.

OUMA, E. W.; ASANGO, A. M.; MAINGI, J.; NJERU, E. M. Elucidating the potential of native rhizobial isolates to improve biological nitrogen fixation and growth of common bean and soybean in smallholder farming systems of Kenya. **International Journal of Agronomy**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

PATRIARCA, E. J.; TATÈ, R.; IACCARINO, M. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 203-222, 2002.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 635-642, 2002.

- PAWLOWSKI, T. A. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: influence of abscisic and gibberellic acids. **Proteomics**, v. 7, p. 2246-2257, 2007.
- PECK, M. C.; FISHER, R. F.; LONG, S. R. Diverse flavonoids stimulate *NodD1* binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5417-5427, 2006.
- PENG, J.; GYGI, S. P. Proteomics: the move to mixtures. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 10, p. 1083-1091, 2001.
- PÉREZ-MONTAÑO, F.; DEL CERRO, P.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; CUBO, M. T.; HUNGRIA, M.; OLLERO, F. J. RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 198, 2016.
- PERLEY, J. E.; STOWE, B. B. The production of tryptamine from tryptophan by *Bacillus cereus* (KVT). **Biochemistry. J**, v. 100, p. 169-174, 1966.
- PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000.
- PICOTTI, P.; BODENMILLER, B.; AEBERSOLD, R. Proteomics meets the scientific method. **Nature Methods**, v. 10, n. 1, p. 24-27, 2013.
- PII, Y.; CRIMI, M.; CREMONESE, G.; SPENA, A.; PANDOLFINI, T. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. **BMC Plant Biology**, v. 7, n. 1, p. 21, 2007.
- PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1851-1864, 2007.
- POLLMANN, S.; et al. Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 216, n. 1, p. 155-161, 2002.
- POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Two-dimensional gel electrophoresis in the light of new developments. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 53, p. 167-177, 2014
- PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. 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.
- RAHMANI, H. A.; RÄSÄNEN, L. A.; AFSHARI, M.; LINDSTRÖM K. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soils of Iran. **Applied Soil Ecology**, v. 48, p. 287-293, 2011.

RAO, J. R.; COOPER, J. E. Soybean nodulating rhizobia modify nod gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n. 6, p. 855-862, 1995.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nature Protocols**, v. 2, p.1896–1906, 2007.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 489-512, 2011.

REMANS, R.; et al. Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. **The Plant Soil**, v. 312, p. 25–37, 2008.

RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOL, R. F.; GRAHAM, P. H.; MARTINEZ-ROMERO E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. **Research in Microbiology**, v. 164, p. 740–748, 2013.

RIBEIRO, R; A.; ROGEL, M. A.; LOPEZ-LOPEZ, A.; ORMENO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F. G.; MARTINEZ, J.; ... HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1179-1184, 2012.

RYU, R.J.; PATTEN, C.L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. **Jornal of Bacteriology**, v. 190, p. 7200–7720, 2008.

SADYGOV, R. G.; COCIORVA, D.; YATES, J. R. Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. **Nature Methods**, v. 1, n. 3, p. 195-202, 2004.

SALVAGIOTTI, F. Cassman, K. G.; Specht, J. E.; Walters, D. T.; Weiss, A.; Dobermann, A. R. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. **Field Crops Research**, v.108, n.1, p.1-13, 2008.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SA-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 7-17, 2004.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, v. 32, p. 33-57, 1998.

SCHULZE, W. X.; USADEL, B. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 491-516, 2010.

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.

SHAMSELDIN, A.; MOAWAD, H.; KHALAFALLAH, M.; FAYEZ, M.; MONIB, M. Pot and field assessment of the symbiotic performance of new identified *Rhizobium* strains nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Egypt under nitrogen and phosphorus fertilization. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, p. 4001–4008, 2012.

SHAW, L. J.; HOOKER, J. E. The fate and toxicity of the flavonoids naringenin and formononetin in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 528-536, 2008.

SHEORAN, I. S.; OLSON, D. J. H.; ROSS, A. R. S.; SAWHNEY, V. K. Proteome analysis of embryo and endosperm from germinating tomato seeds. **Proteomics**, v. 5, p. 3752-3764, 2005.

SILVA, E. F.; Marchetti, M. E.; Souza, L. C. F.; Mercante, F. M.; Rodrigues, E. T.; Vitorino, A. C. T. Inoculação do feijoeiro com *Rhizobium tropici* associada à exsudato de *Mimosa flocculosa* com diferentes doses de nitrogênio. **Bragantia**, v.68, n.2, p.443-451, 2009.

SINGH, J. S.; KOUSHAL, S., KUMAR, A.; VIMAL, S. R.; GUPTA, V. K. Book review: microbial inoculants in sustainable agricultural productivity-Vol. II: functional application. **Frontiers in Microbiology**, 7:2105, 2016.

SMIL, V. Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food production. **MIT press**, 2004.

SOMERS, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; SRINIVASAN, M.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1803–181, 2005.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 2011.

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

SPRENT, J. I. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing?. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 5, p. 1081-1084, 2008.

SPRENT, J. I. Evolution and diversity of legume symbiosis. In: **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Springer Netherlands, p. 1-21, 2008.

SPRENT, J. I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **The New Phytologist**, v. 174, n. 1, p. 11-25, 2007.

STAJKOVIĆ, O.; DELIĆ, D.; JOŠIĆ, D.; KUZMANOVIĆ, D.; RASULIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ J. Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, p. 5919–5926, 2011.

STRACKE, S.; KISTNER, C.; YOSHIDA, S.; MULDER, L.; SATO, S.; KANEKO, T.; ... PARNISKE, M. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 959-962, 2002.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G. & MERCANTE, F.M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J. & STONE, L.F. Produção de feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, p.122-153, 2002.

SULLIVAN, J. T.; PATRICK, H. N.; LOWTHER, W. L.; SCOTT, D. B.; RONSON, C. W. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 19, p. 8985-8989, 1995.

SULLIVAN, J. T.; RONSON, C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 9, p. 5145-5149, 1998..

SUZAKI, T.; ITO, M.; KAWAGUCHI, M. Genetic basis of cytokinin and auxin functions during root nodule development. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2^a edição, Sinauer, Sunderland, Massachusetts, p. 549-551, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4^a edição, Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 2009.

THAMDRUP, B. New pathways and processes in the global nitrogen cycle. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 407-428, 2012.

THEUNIS, M. **IAA biosynthesis in rhizobia its potential role in symbiosis**. 2005. Tese de Doutorado - Universiteit Antwerpen, 2005

THEUNIS, M.; 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.

TORRES, A. R.; CURSINO, L.; MURO-ABAD, J. I.; GOMES, E. A.; ARAÚJO, E. F.; HUNGRIA M., et al. Genetic diversity of native common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

rhizobia from the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 852–856, 2009.

TURNER, S. L.; YOUNG, J. P. W. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 2, p. 309-319, 2000.

VAN BRUSSEL, A. A. ; RECOURT, K. E. E. S.; PEES, E. L. L. Y.; SPAINK, H. P.; TAK, T. E. U. N.; WIJFFELMAN, C. A., ... LUGTENBERG, B. J. . 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.

VAN NOORDEN, G.E.; et al. Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, v. 144, p. 1115–1131, 2007.

VAN PUYVELDE, S.; 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.

VANDE BROEK A.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 1338–1342, 1999.

VEGA-HERNANDEZ, M. C.; LEÓN-BARRIOS, M.; PÉREZ-GALDONA, R. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 665-668, 2002.

VILLEN, J.; GYGI, S. P. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1630–1638, 2008.

VINCENT, J. M.; 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.

WAIS, R. J.; KEATING, D. H.; LONG, S. R. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p. 211-224, 2002.

WANG, G.; HONG, Y.; JOHNSON, M.K.; MAIER, R.J. Lipid peroxidation as a source of oxidative damage in *Helicobacter pylori*: protective roles of peroxiredoxins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 1596–1603, 2006.

WANG, S. P.; STACEY, G. Ammonia regulation of nod genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.223, p. 329-331, 1990

WANI, P.A.; KHAN, M.S.; ZAIDI, A. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown

chickpea. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 170, n. 2, p. 283-287, 2007.

WESTHOEK, A.; FIELD, E.; REHLING, F.; MULLEY, G.; WEBB, I.; POOLE, P. S.; TURNBULL, L. A. Policing the legume-*Rhizobium* symbiosis: a critical test of partner choice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1419, 2017.

WHITEHOUSE, C. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

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

WONG, K.; GOLDING, G. B. A phylogenetic analysis of the *pSymB* replicon from the *Sinorhizobium meliloti* genome reveals a complex evolutionary history. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 269-280, 2003.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 11, n. 1, p. 49-79, 2009.

ZAHARAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biological Review**, v. 63, p. 968-998, 1999.

ZAKHIA, F.; DE LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v. 21, n. 6-7, p. 569-576, 2001.

ZHANG S.R.; et al. The Null-Test for peptide identification algorithm in Shotgun proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 163, p. 118-125, 2017.

ZHANG, Y.; FONSLow, B. R.; SHAN, B.; BAEK, M. C.; YATES, J. R., 3RD. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, no. 4, p. 2343-2394, 2013.

ZHAO, Y.; CHRISTENSEN, S.K.; FANKHAUSER, C.;... CHORY J. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. **Science**, v. 291, n. 5502, p. 306-309, 2001.