

EXPRESSÃO GÊNICA EM RAÍZES DE MILHO INOCULADAS COM
Herbaspirillum seropedicae

LUIZ EDUARDO SOUZA DA SILVA IRINEU

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO – 2018**

EXPRESSÃO GÊNICA EM RAÍZES DE MILHO INOCULADAS COM
Herbaspirillum seropedicae

LUIZ EDUARDO SOUZA DA SILVA IRINEU

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal”.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas
Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

I68 Irineu, Luiz Eduardo Souza da Silva.

Expressão Gênica em Raízes de Milho Inoculadas com *Herbaspirillum seropediae* / Luiz Eduardo Souza da Silva Irineu. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

70 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2018.
Orientador: Fabio Lopes Olivares.

1. Bacteria benéfica. 2. RNaseq. 3. Bioestimulante. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

Expressão gênica em raízes de milho inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae*

Luiz Eduardo Souza da Silva Irineu

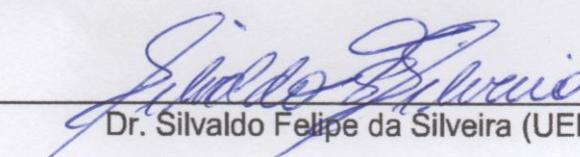
Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para obtenção do título de Mestre

Aprovada em 30 de Novembro 2018

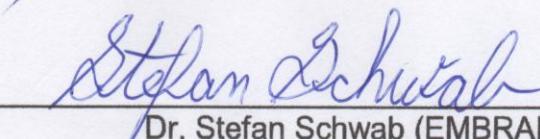
Comissão Examinadora:



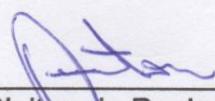
Drª. Angela Pierre Vitória (UENF)



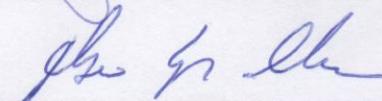
Dr. Silvaldo Felipe da Silveira (UENF)



Dr. Stefan Schwab (EMBRAPA)



Dr. Cleiton de Paula Soares (UENF) - Coorientador



Prof. Fábio Lopes Olivares (UENF) - Orientador

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **José e Maria Aparecida** que sempre cuidarem de mim, me dando apoio, incentivo e amor incondicional.

Aos meus irmãos **Raquel e Rafael** por serem incentivadores e acreditarem em meu potencial.

Aos meus amigos que mesmo longe fisicamente, por todo o carinho, conselhos, risadas e momentos de descontração.

Ao Professor **Fábio Lopes Olivares**, pela orientação, conhecimento transmitido com competência, incentivo e paciência.

Ao **Cleiton de Paula Soares**, pela co-orientação, pelos ensinamentos em laboratório, paciência e pelas caronas.

Aos demais **Professores** do programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos conhecimentos passados dentro e fora das salas de aula.

Aos amigos de laboratório do **LBCT** e **NUDIBA** pela colaboração e parceria nos trabalhos executados e pelos momentos de descontração e felicidade.

À **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia** pela oportunidade da realização do Curso.

Aos Professores **Angela Pierre Vitória, Silvaldo Felipe da Silveira e Stefan Schwab** por aceitarem fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos a mim concedida.

A **Newton Foundation, CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)** pelo auxílio financeiro concedido à pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1	
1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1 Gênero <i>Herbaspirillum</i>	16
1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	18
1.3 Interação estrutural e resposta agronômica <i>Herbaspirillum</i> -planta	20
1.4 Bases moleculares e fisiológicas da interação <i>Herbaspirillum</i> -planta.....	22
2 - REVISÃO EM BASES DE PROPRIEDADE INTELECTUAL	29
3 - REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 2	
PHENOTYPE MODULATION ON THE MAIZE ROOT GENE EXPRESSION BY THE INOCULATION OF <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> HRC54	39
1 - INTRODUCTON.....	40
2 - METHODS	42
2.1 Preparation of inoculum	42
2.2 Plant growth promotion and weight measures	42
2.3 Quantification of <i>H. seropedicae</i> in maize roots	42
2.4 RNA extraction and sequencing	44
2.5 Bioinformatics analysis of the sequences obtained by RNAseq	44
2.6 Validation of the differently expressed genes	45
3 - RESULTS	47
3.1 Plant growth promotion	47
3.2 Quantification of <i>H. seropedicae</i> in maize roots	47
3.3 Maize global transcript profile in response to <i>H. seropedicae</i> inoculation	49
3.3.1 Signaling	52
3.3.2 Phytohormones	52
3.3.3 Photosynthesis	53
3.3.4 Cell wall and cellular division	53
3.3.5 Transporters	53

3.4 Transcriptome validation by RT-qPCR	55
4 - DISCUSSION	57
5 - CONCLUSION	62
ACKNOWLEDGMENTS	62
REFERENCES	63

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Microscopia de transmissão eletrônica de células de *H. seropedicae* 16

CAPÍTULO 2

Figure 1: Growth after 5 days of inoculation 47

Figure 2: Products amplification of 16S rDNA from *Herbaspirillum seropedicae* 48

Figure 3: Bioinformatics analyses results 49

Figure 4: Functional annotation of differently expressed genes based on Gene Ontology (GO) classification. 51

Figure 5: Classification of the metabolic pathways of DEGs by Mapman. 52

Figure 6: Validation of the gene expression of the selected genes by RT-qPCR. 56

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Patentes depositadas no banco de dados internacionais com o estado da técnica envolvendo *H. seropedicae* na produção de bioinoculantes. 31

CAPÍTULO 2

Tabela 2: Sequence of primers specific for the 16S rDNA of *Herbaspirillum seropedicae*. 43

Tabela 3: Genes selected, primers designed, and concentration used to RT-qPCR..... 45

Tabela 4: Sumary of RNA_Seq data..... 49

Table 5: Maize genes modulated by the colonization with *H. seropedicae* strain HRC54 involving some biostimulation effect 54

LISTA DE MATERIAL SUPLEMENTAR

- Figure S1:** (A) Construction of standard curve of *Herbaspirillum seropedicae* DNA by RT-qPCR. (B) Standard curve of *Herbaspirillum seropedicae* DNA dilutions versus C_T average. (C) Amplification of the *Herbaspirillum seropedicae* DNA in the maize roots uninoculated. (D) Amplification of the *Herbaspirillum seropedicae* DNA in the maize roots uninoculated three replicates were used for the dilutions 67
- Figure S2:** Functional annotation of differently expressed genes based on Gene Ontology (GO) classification. Pie chart representing (A) up-regulated genes corresponding Molecular Function and (B) up-regulated genes corresponding Biological process in maize seedlings inoculated with *H. seropedicae* strain HRC54 after five days 69
- Figure S3:** Functional annotation of differently expressed genes based on Gene Ontology (GO) classification. Pie chart representing (A) down-regulated genes corresponding Molecular Function and (B) down-regulated genes corresponding Cellular Components in maize seedlings inoculated with *H. seropedicae* strain HRC54 after five days 70

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria endofítica diazotrófica, porém o uso dessa bactéria em bioinoculantes agrícolas ainda é restrito devido às respostas inconsistentes da associação *Herbaspirillum*-planta. Sendo assim, decifrar a expressão gênica e as vias metabólicas moduladas pela interação é fundamental para melhorar a eficiência na promoção do crescimento das plantas. Este trabalho foi desenhado para elucidar como a colonização por *H. seropedicae* modula a expressão gênica em raízes de milho. Sementes de milho (Dekalb 7815) foram desinfestadas e germinadas por 72 h. Em seguida plântulas com radículas de 2,5 cm de comprimento foram transplantadas para vasos de 2 L com CaCl_2 2 mM, e um inóculo contendo 2×10^7 células mL⁻¹ de *H. seropedicae* HRC54 foi aplicado no grupo de plântulas tratadas, sendo mantidas em câmara de crescimento. Cinco dias após a inoculação, as amostras foram coletadas para análise biométrica (8 repetições) e para extração de RNA (3 repetições biológicas, cada uma formada por 6 plântulas). A extração de RNA total foi utilizada para a síntese da biblioteca de cDNA para o RNA_Seq. Foi montado um segundo experimento para extração total de RNA para validação dos resultados obtidos no RNA_Seq. O estabelecimento da bactéria inoculada nos tecidos radiculares foi avaliado pela formação de película em meio JNFb semi-sólido. Em paralelo, o DNA total foi extraído e utilizado para detecção específica da bactéria por meio da técnica de RT-qPCR. Os resultados obtidos com a inoculação mostraram um efeito de bioestimulação com aumento da biomassa radicular (242 e 73%) e da parte aérea (166,7 e 188%), respectivamente para massa fresca e seca das plântulas de milho. A quantificação de *H. seropedicae* em raízes inoculadas via PCR foi maior que no controle, aproximadamente 10^6 e 10^2 células.mg de tecido⁻¹, respectivamente. A análise do RNA_Seq mostrou que 949 genes foram diferencialmente expressos, sendo 454 genes induzidos e 495 genes reprimidos. Análises de bioinformática demonstraram que a maior parte dos genes induzidos e reprimidos estão relacionados a processos biológicos, que levam à promoção do crescimento, assim como genes responsivos à AIA, e envolvidos em divisão celular e fotossíntese. A validação por RT-qPCR mostrou que a expressão dos genes *phosphate transporter protein 9* e *gibberellin regulated protein* foram

aumentados 3,5 e 2,7 vezes mais do que no controle. Com isso conclui-se que a inoculação com *H. seropedicae* promove o crescimento das plantas e altera a expressão gênica das raízes de milho modulando a sinalização a patógenos, divisão celular, síntese de transportadores e produção de energia. Esses dados podem ser usados para elucidar vários mecanismos na interação com bactérias associativas a vegetais.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic endophytic bacteria, but the use of this bacterium in agricultural bioinoculants is still restricted due to inconsistent responses of the *Herbaspirillum*-plant association. Therefore, deciphering gene expression and metabolic pathways modulated by interaction is fundamental to improve efficiency in promoting plant growth. This work was designed to elucidate how colonization by *H. seropedicae* modulates gene expression in maize roots. Maize seeds (Dekalb 7815) were disinfected and germinated for 72h. Then seedlings with 2.5 cm radicles were transplanted into 2L pots with 2mM CaCl₂ and kept in a growth chamber. After 24h, an inoculum containing 2×10^7 mL⁻¹ cells of *H. seropedicae* strain HRC54 was inoculated into the seedlings. Five days after inoculation, the samples were collected for biometric analysis (8 replicates) and for RNA extraction (3 biological replicates, each consisting of 6 seedlings). Total RNA extraction was used for the synthesis of the cDNA library for the RNA_Seq. A second experiment was set up for total RNA extraction to validate the results obtained in RNA_Seq and quantify the establishment of the bacteria in the roots by means of the RT-qPCR technique. The results obtained with the inoculation showed a biostimulation phenotype with increase of root biomass (242 and 73%) and aerial part (166.7 and 188%), respectively for fresh and dry mass. The quantification of *H. seropedicae* in roots of inoculated via RT-qPCR was greater than in the control, approximately 10^6 and 10^2 cells.mg of tissue⁻¹, respectively. The analysis of RNA_Seq showed that 949 genes were differentially expressed, being 454 genes induced and 495 genes repressed. Bioinformatics analyzes have shown that most of the induced and repressed genes are related to biological processes, which lead to growth promotion, as well as genes responsive to AIA, cell division and photosynthesis. Validation by RT-qPCR showed that the expression of the *phosphate transporter protein 9* and *gibberellin regulated protein* genes were increased 3.5 and 2.7 times higher than the control respectively. With this, it is concluded that inoculation with *H. seropedicae* promotes plant growth and alters the gene expression of corn roots by modulating pathogen signaling, cell division, transporter synthesis and energy production. These data can be used to elucidate various mechanisms in the interaction of plant bacteria.

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e econômico após a Segunda Guerra Mundial fez aumentar a demanda por alimentos e matérias-primas em todo o mundo. Com o objetivo de acabar com a fome, houve um aumento expressivo nas áreas de produção agrícola e utilização do pacote tecnológico da agricultura moderna disponível na época. Atribui-se então a essa mudança o título de Revolução Verde (MORAGAS, SCHENEIDER, 2003).

Desde então, a produção agrícola brasileira vem crescendo de tal forma que se destaca por sua participação na produção agrícola mundial. Dados da “Food and Agriculture Organization of United Nations” (FAO) demonstram que a produção de cereais brasileira cresceu de 15.036.353 milhões de toneladas em 1961 para 84.128.482 milhões de toneladas em 2016 (FAOSTAT, 2018). Em 2017, as exportações agrícolas brasileiras totalizaram US\$ 96,1 bilhões, representando um crescimento de 13% ao arrecadado no ano anterior (MAPA, 2018).

Porém, o aumento da produção agrícola demanda aumento do consumo de fertilizantes e pesticidas (TILMAN et al., 2002). Com isso, a demanda de fertilizantes no Brasil está em constante crescimento, com o uso de 1.834.733 e 2.634.552 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, respectivamente em 2002, e incrementos de 365% para N-fertilizante e 401% para P-fertilizante em 2016 (FAOSTAT, 2018).

Existe um enorme gasto monetário e energético com a síntese, armazenamento, transporte e distribuição de fertilizantes sintéticos como os nitrogenados. No caso de P-fertilizantes, as jazidas de fosfato não são fontes renováveis, sendo assim, estas podem se esgotar. Ademais, existe uma baixa eficiência de aproveitamento de fertilizantes nitrogenados e fosfatados. As plantas não utilizam todo o conteúdo dos fertilizantes nitrogenados como fonte de nitrogênio (N) aplicado, ocorrendo então uma perda de 50 a 70% (PEOPLES et al., 1995), o que resulta na contaminação dos solos e corpos d’água (FOLEY et al., 2011) e também da atmosfera através da emissão de gases causadores do efeito estufa, como o N₂O (TILMAN, et al., 2001; GALLOWAY, et al., 2008; BURNEY, et al., 2010).

De acordo com a FAO (FAOSTAT, 2018) os dados levantados mostram que em 1965 foram lançados na atmosfera cerca de 3.554.185 milhões de gigagramas

de N₂O, tendo esse número crescido para 247.218.938 bilhões em 2016, o que representa um crescimento de 6955% na emissão de N₂O na atmosfera.

O uso de inoculantes microbianos com propriedades biofertilizantes e bioestimulantes emerge como alternativa para substituição ou complementação de uso de fertilizantes sintéticos para promover o crescimento e desenvolvimento vegetal e reduzir os passivos ambientais das práticas agrícolas. Insumos e tecnologias agrícolas de base biológica representam ferramenta para incremento da soberania nacional frente aos desafios de produzir alimentos, fibras e energia no mundo.

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio da subclasse β-Proteobacteria que se associa preferencialmente a gramíneas de grande importância econômica e alimentar como forrageiras, trigo, milho, cana-de-açúcar, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1986; OLIVARES et al., 1996). A associação de *H. seropedicae* com as plantas é benéfica, este micro-organismo é capaz de fornecer nitrogênio de forma assimilável para a planta hospedeira, o que resulta na promoção do crescimento e no aumento da produção (BALDANI et al., 2000). Além disso, *H. seropedicae* é capaz de produzir hormônios reguladores do crescimento e solubilizar e disponibilizar fósforo inorgânico para as plantas (BASTIÁN et al., 1998; ESTRADA et al., 2013).

Estudos com *H. seropedicae* demonstraram que quando inoculado, induziu crescimento, aumento na acumulação de nitrogênio nas culturas de cana-de-açúcar, arroz e milho (OLIVEIRA et al., 2002; GYANESHWAR et al., 2002; ALVES, 2007). Com isso, a bactéria *H. seropedicae* vem sendo utilizada na concepção de produtos e processos microbianos e dando origem a pedidos de patentes para formulação de bioinoculantes a fim de promover o crescimento vegetal e incremento da produção agrícola.

A despeito das potencialidades de insumos biológicos contendo *Herbaspirillum* para uso agrícola, sua ampla utilização no ambiente de produção depende da melhoria da consistência de resposta das plantas a aplicação de inoculantes. Esta melhoria do desempenho de inoculantes depende igualmente da melhoria das tecnologias de inoculação e de avanços na construção do conhecimento sobre aspectos da biologia da interação bactéria-planta. As bases moleculares da interação *Herbaspirillum*-planta ainda não foram totalmente

desvendadas, sendo necessário estudos mais profundos dessa interação em nível molecular, com isso, objetiva-se com esse trabalho entender como a inoculação de *H. seropedicae* modula a expressão gênica das plantas inoculadas após a germinação, promovendo então o efeito de bioestimulação e crescimento vegetal.

CAPÍTULO 1

1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* se enquadra taxonomicamente dentro da subclasse *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*, família *Oxalobacteraceae*, onde se agrupa com os gêneros *Collimonas*, *Duganella*, *Glaciimonas*, *Herminiumonas*, *Janthinobacterium*, *Massilia*, *Noviherbaspirillum*, *Oxalicibacterium*, *Oxalobacter*, *Pseudoduganella*, *Telluria* e *Undibacterium* (BALDANI et al., 2014)

Descrita por BALDANI et al. (1986) como uma bactérias associativas da plantas herbáceas (*herba*) com sementes, pequena de formato espiral (*spirillum*), caracterizam-se como: células Gram-negativas, com células geralmente vibrioides ou às vezes helicoidais; as células possuem de um a três flagelos polares, em um ou em ambos os polos (figura 1); possui metabolismo respiratório típico e não fermenta açúcares; é capaz de fixar nitrogênio atmosférico em condições microaeróbicas e se desenvolve bem com N₂ como fonte exclusiva de nitrogênio; oxidase, catalase e urease positivo; ácidos orgânicos como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato e trans-aconitato são as fontes de carbono preferidas para crescimento dependente de NH₄⁺ e N₂; oxida açúcares como manitol, sorbitol, glicerol, glicose, galactose e L-arabinose; não hidrolisa amido e gelatina; a faixa de pH ótima para crescimento dependente de N₂ é mais ampla que a faixa de pH para *Azospirillum* sp. e em condições limitantes de O₂, assimila e desassimila nitrato, convertendo-o para NO₂⁻.

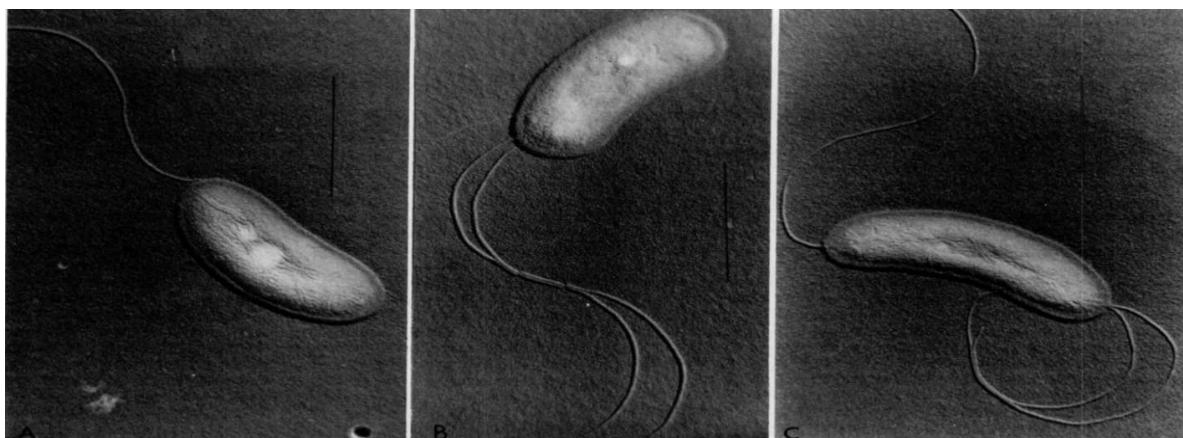


Figura 1: Microscopia de transmissão eletrônica de células de *H. seropedicae* cultivadas em ágar nutritivo. (A, B e C) um, dois e três flagelos polares em um ou ambos polos, respectivamente. Barra = 1µm. Foto original de Baldani et al. (1986).

A primeira espécie descrita do gênero foi *Herbaspirillum seropedicae*, por Baldani et al. (1986) enquanto buscavam isolar *Azospirillum amazonense* recentemente reclassificado como *Nitrospirillum amazonense* por Lin et al. (2014) do solo e de raízes de milho, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1984). No entanto, os autores encontraram colônias diferenciadas das colônias de *Nitrospirillum*, menores e de centro esverdeado, em placas com o meio NFB sólido. Quando transferidas para o meio NFB semi-sólido, formavam película típica das espécies de *N. amazonense* e demonstraram atividade da nitrogenase, fazendo-se acreditar ser uma nova espécie de *Azospirillum*. Entretanto, comparados aos resultados das análises de hibridação DNA/RNA de espécies de *Azospirillum*, Falk et al. (1986) mostraram tratar-se de uma nova espécie, sendo descrita como a primeira espécie do gênero *Herbaspirillum*.

A segunda espécie do gênero *Herbaspirillum* descrita foi primeiramente classificada como *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Este micro-organismo foi originalmente isolado de folhas de cana-de-açúcar exibindo sintomas da doença estria mosqueada. Esta enfermidade é de caráter secundário, de pouco relevância econômica, sendo restrita a poucos genótipos de cana-de-açúcar suscetíveis (OLIVARES et al. 1997). Contudo, foi demonstrado por Pimentel et al. (1991) que *P. rubrisubalbicans* era capaz de crescer e fixar N₂ em meio semi-sólido livre de nitrogênio. Baldani et al. (1992) comprovaram pelo método de redução de C₂H₂ e também pela incorporação de ¹⁵N₂ que *H. seropedicae* e *P. rubrisubalbicans* eram diazotróficas, sendo para o último o primeiro relato de uma bactéria fitopatogênica capaz de fixar o gás dinitrogênio.

Baldani et al. (1996) reclassificaram *P. rubrisubalbicans* a partir de alto grau de similaridade em ensaios de hibridação DNA/DNA (Gillis et al., 1990), onde foi possível verificar semelhanças metabólicas e fisiológicas com diferentes estirpes de *H. seropedicae*, propondo-se a incorporação desta espécie ao gênero *Herbaspirillum*, sendo designado *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

Uma terceira espécie de *Herbaspirillum* foi identificada por Kirchhof et al. (2001), isolada de raízes e parte aérea das plantas *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus*, *Spartina pectinata* e *Pennisetum purpureum*, onde características como tamanho e formato das células, aparência da colônia, motilidade e flagelação foram praticamente idênticas às espécies conhecidas *H. seropedicae* e *H.*

ruberisubalbicans. Baseando-se nas propriedades fisiológicas, análise comparativa das sequências do gene 16S rDNA e hibridização DNA-DNA, o novo isolado pode ser agrupado junto às outras espécies de *Herbaspirillum* e classificado como uma nova espécie diazotrófica designada de *Herbaspirillum frisingense*.

De todas as 11 espécies descritas no gênero *Herbaspirillum*, somente *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense* demonstraram habilidade de fixação de nitrogênio e de se associar a plantas de importância na agricultura como promotores do crescimento vegetal (MONTEIRO et al., 2012).

1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

Como descrito por Baldani et al. (1986), *H. seropedicae* tem células vibrióides e as vezes helicoidal, observa-se muita motilidade quando há presença de O₂. As células costumam ser flageladas em ambos os polos, tendo de um a três flagelos em cada polo e ter tamanho entre 0,6 a 0,7 µm. A eficiência na fixação de N₂ em meio semi-sólido NFB é de 12 a 15mg de N₂ por grama de DL-malato ou 13mg de N₂ por grama de manitol. Na presença de N₂, possui crescimento menos acelerado que *Nitrospirillum amazonense* sinonímia *Azospirillum amazonense*, porém na presença de nitrogênio mineral ou glutamato, o crescimento é mais acelerado. Não cresce na presença de 2% de NaCl. A temperatura ótima para crescimento dependente de N₂ é de 34°C.

Herbaspirillum seropedicae foi primeiramente isolado de raízes de sorgo, milho e arroz cultivados em Seropédica-RJ (BALDANI et al., 1984). Posteriormente, sua distribuição ecológica foi investigada mais profundamente, tendo sido detectada associada a distintas espécies da família das Poáceas, e em diferentes órgãos do eixo vegetativo como raízes, caules e folhas de variedades de cana-de-açúcar e arroz (OLIVARES, et al., 1996; RODRIGUES et al., 2006), raízes de gramíneas forrageiras e trigo (BRASIL et al., 2005; SALA et al., 2005), e raízes de sorgo (BERGAMASCHI et al., 2007) em outras regiões do Brasil. Zhu et al. (2012) detectaram *H. seropedicae* colonizando arroz cultivado na China. Também foram obtidos isolados de *H. seropedicae* associados a plantas como abacaxi e banana cultivados no Brasil (WEBER et al., 1999; CRUZ et al., 2001).

Döbereiner (1992) demonstrou que as espécies diazotróficas do gênero *Herbaspirillum* possuem a habilidade de colonizar os tecidos endofiticamente. Essa

característica veio a ser comprovada por Olivares, et al. (1997) e James e Olivares (1998), que demonstraram a colonização endofítica dos vasos xilemáticos de raiz de cana-de-açúcar por estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, como da mesma forma mostrada a colonização dos espaços intercelulares de raízes e colmos de duas variedades micropropagadas de cana-de-açúcar japonesas por (Njoloma, et al., 2006) e dos espaços intercelulares de raízes de arroz (James et al., 2002).

Estudos de metagenômica da comunidade bacteriana diazotrófica associada à rizosfera, raízes e caule de milho cultivado no sul do Brasil, mostraram a presença de *Herbaspirillum* spp. colonizando o interior dos tecidos das plantas, mas não o solo (ROESCH et al., 2008), o que indicou que, *H. seropedicae* não possui uma boa capacidade de sobrevivência no solo. Estudos conduzidos por Olivares et al., (1996) evidenciaram um rápido declínio da bactéria introduzida no solo, sugerindo seu desaparecimento após quatro semanas. Curiosamente, com a introdução de sementes de milho no solo, os níveis populacionais da bactéria se reestabeleceram, apontando para importância da presença da planta hospedeira e possivelmente de exsudatos radiculares na ativação da bactéria.

O processo de infecção por *Herbaspirillum seropedicae* em raízes de poáceas inicia-se com a atração das células da bactéria por exsudados radiculares da planta hospedeira (quimiotaxia). O diálogo molecular específico entre a bactéria e a planta, bem como os compostos de carbono envolvidos ainda se constituem em lacunas para o pleno entendimento desta associação. Em seguida, concomitante a expressão da maquinaria molecular envolvida na atração na direção da rizosfera e rizoplano, há um incremento da população da bactéria, seguido pela adesão apolar da bactéria à superfície das raízes. Os sítios preferenciais de adesão ao eixo radicular são a zona de alongamento/diferenciação e a zona de formação de pelos radiculares. Células aderidas à superfície radicular formam agregados com diferentes dimensões pela divisão celular e recrutamento de bactérias não aderidas, podendo produzir comunidades microbianas complexas na forma de biofilmes. Subsequentemente, bactérias aderidas secretam compostos bioativos e outras moléculas moduladoras da interação (p.ex. auxinas), que induzem atividade mitótica em células do periciclo e a formação de raízes laterais. A infecção ocorre através dos pontos de emergência das raízes laterais que rompem as camadas de células do córtex e epiderme, que servem como porta de entrada para a colonização

endofítica (OLIVARES, 1997; JAMES e OLIVARES, 1998; MONTEIRO et al., 2012).

1.3 Resposta agronômica da associação *Herbaspirillum*-planta

Ao contrário de *Rhizobium* e gêneros correlatos capazes de induzir nódulos radiculares, *H. seropedicae* não possui fatores de nodulação ativos, sendo assim, estas invadem os tecidos internos da planta hospedeira principalmente pelas aberturas nos pontos de emergência de raízes laterais, além de ferimentos na epiderme e mais raramente pelas aberturas estomáticas (JAMES E OLIVARES, 1998).

Ao colonizar os espaços intercelulares das raízes da planta, *H. seropedicae* utiliza parte dos fotoassimilados para gerar energia e promover a fixação biológica de nitrogênio (FBN), por outro lado, as plantas se beneficiam desse N fixado pelas bactérias para sua síntese de proteínas e outras biomoléculas nitrogenadas importantes, sendo estas bactérias assim promotoras do crescimento vegetal, auxiliando no suprimento da demanda de N das plantas (JAMES E OLIVARES, 1998). Alves (2007) demonstrou que a inoculação de milho (híbridos e variedades) com *H. seropedicae* estirpe ZAE94 levou a um significante aumento da produção, indicando que 30% da acumulação de nitrogênio na planta foram provenientes da FBN promovida por *H. seropedicae*.

A combinação de *H. seropedicae* com outras espécies endofíticas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense*, *H. rubrisubalbicans*, e *Paraburkholderia tropica*) em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, crescidas em vasos com solo durante doze meses, promoveu a FBN, contribuindo com até 30% do N absorvido pelas plantas, dependendo da combinação (OLIVEIRA et al., 2002). Gyaneshwar et al. (2002) demonstraram que a inoculação com *H. seropedicae* estimulou o crescimento e acumulação de nitrogênio em variedades de arroz. Outros estudos revelaram resposta positiva à inoculação de *H. seropedicae* estirpe ZAE94 em diferentes variedades de arroz cultivadas em diversas partes do Brasil (FERREIRA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2013).

Além da capacidade de FBN, *H. seropedicae* também é capaz de produzir reguladores do crescimento como auxinas e giberelinas (BASTIÁN et al., 1998; LAMBRECHT et al., 2000; BOTTINI et al., 2004) e habilidade para solubilização de fosfato inorgânico (P_i) (ESTRADA et al., 2013).

De acordo com Radwan et al. (2004), o isolado denominado 34-Arroz de *H. seropedicae* apresentou produção de auxinas seis vezes maior quando o meio de cultura foi suplementado com triptofano, que é precursor da síntese de auxinas. Bergamaschi (2006) ao isolar *H. seropedicae* e outras bactérias diazotróficas de raízes e colmos de sorgo granífero e forrageiro, constatou experimentalmente a produção de auxinas, sendo várias estirpes de *H. seropedicae* eficientes na produção deste fitormônio. Testes realizados por Keyeo et al. (2011) demonstraram que *H. seropedicae* estipe Z78 foi capaz de produzir mais auxina quando comparado aos outros micro-organismos testados.

A produção de auxina nas plantas sinaliza às células do periciclo a reiniciar o ciclo celular induzindo a divisão celular e o surgimento de pontos mitóticos que geram as raízes laterais (CASIMIRO et al., 2001). As auxinas também estimulam as enzimas H⁺-ATPases que, por sua vez, induzem o crescimento celular pelo mecanismo denominado crescimento ácido (Morsomme e Boutry, 2000). Amaral et al. (2014) apresentaram resultados de bioestimulação, em termos de número de raízes laterais, em plântulas de milho após sete e dez dias de inoculação com *H. seropedicae*, que podem ser relacionados à produção de auxina pela bactéria inoculada.

Quanto a solubilização de fósforo inorgânico (P_i), Estrada et al. (2013) foram os primeiros a reportar em estirpes de *Herbaspirillum* com tal capacidade, promovendo um crescimento na produção de arroz cultivado na presença de fosfato tricálcico.

Indiretamente, a colonização endofítica de *Herbaspirillum* também contribui para a proteção contra patógenos através da produção de agentes antifúngicos ou antibacterianos e sideróforos (DOBBELAERE et al., 2003; RYAN et al., 2008; ROSENBLUETH e MARTINEZ-ROMERO 2006).

Weber e Freire (2003) demonstraram que a colonização endofítica por *Herbaspirillum* ocasionou a redução da seca severa causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* em plântulas de cultivares de Banana-maçã. *Herbaspirillum seropedicae* foi capaz de ativar as vias de defesas contra bactérias em folhas de *Arabidopsis thaliana* de plantas inoculadas, demonstrando o potencial no biocontrole a fitopatógenos (LEANDRO, 2016).

Olivares e colaboradores (2015) demonstraram que o uso de vermicomposto

como substrato enriquecido com *H. seropedicae* exerceu papel bioestimulante em plântulas de tomate em casa de vegetação promovendo aumento na biomassa de raiz e parte aérea e em campo estas plântulas quando re-inoculadas com *H. seropedicae* via pulverização foliar aumentaram a produção de frutos.

De acordo com os resultados de estudos de campo, em que plantas de milho foram re-inoculadas com *H. seropedicae*, a reinoculação promoveu um aumento de 20% a mais na produção de grãos em relação às plantas não inoculadas (CANELLAS et al., 2012). Já *Herbaspirillum seropedicae* em consórcio com *H. rubrisubalbicans* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* combinadas a ácidos húmicos promoveram efeito de bioestimulação capaz de aumentar a produção de cana-de-açúcar em 19% na cana planta e 18% na cana soca, correspondendo a 11 e 13 toneladas a mais que o controle, respectivamente quando aplicados por pulverização foliar (SILVA et al., 2017).

1.4 Bases moleculares e fisiológicas da interação *Herbaspirillum*-planta

Pedrosa et al. (2011) sequenciaram completamente o genoma do *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Smr1, sendo este constituído por um cromossomo circular de 5.513.887 pares de bases com 63,4% de seu conteúdo em G+C, e um de 4.804 genes, que codificam 3.108 proteínas com funções conhecidas, 497 com predição geral de suas funções e 1.130 com funções desconhecidas. *Herbaspirillum seropedicae* possui em seu genoma múltiplos sistemas de secreção de proteínas, incluindo do tipo I, II, III, V, VI e pili tipo IV, possui também genes para quatro vias metabólicas para a biossíntese de ácido indol acético, genes para hemaglutininas, hemolisinas e adesinas e um gene codificante para 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase. Isso permitiu um melhor entendimento de sua fisiologia através de novos estudos sobre as bases moleculares da sua interação com as plantas.

O primeiro passo para o início da colonização rizosférica por *H. seropedicae* é a quimiotaquia, onde os diferentes compostos químicos exsudados pela raiz da planta podem servir como atrativo químico para os micro-organismos ali presentes (MONTEIRO et al., 2012). Esses compostos se ligam a proteínas que servem como quimiorreceptores de membrana conhecidos como “methyl-accepting chemotaxis proteins” (MCPs) (GREBE e STOCK, 1998). *Herbaspirillum seropedicae* tem

aproximadamente 46 genes envolvidos na biossíntese, montagem e estrutura de flagelos (PEDROSA et al., 2011). Tadra-Sfeir et al. (2015) também demonstraram que ao menos 46 genes relacionados aos flagelos foram regulados na presença do flavonoide naringenina, um potencial quimioatraente relacionado a interação endofítica.

Raízes de milho inoculadas com *H. seropedicae* tiveram mudanças no perfil de exsudação, sendo possível identificar diversos compostos na presença da bactéria (LIMA et al., 2014), indicando uma possível comunicação que media a interação entre os organismos.

Pankievicz et al. (2016) analisaram o transcriptoma de *H. seropedicae* colonizando raízes de trigo e os resultados das análises do RNA_Seq revelaram que os genes *Hsero_2914*, *Hsero_2915*, *Hsero_2723*, que codificam MCPs foram expressos 17,6, 18,1 e 5,9 vezes mais nas células bacterianas colonizando epifiticamente as raízes de trigo. Resultados similares foram encontrados por Balsanelli et al. (2016): os genes *Hsero_2723* e *Hsero_3720*, que codificam MCPs, também foram mais expressos quando na presença de raízes de milho. Balsanelli et al. (2016) também analisaram um mutante de *H. seropedicae* estirpe Smr1 *Hsero_3720* e foi mostrado que a mutação desse gene diminuiu a capacidade de adesão da bactéria às raízes, o que sugere que a expressão desse gene é necessária para percepção de sinais do ambiente rizosférico e para uma eficiente adesão de *H. seropedicae* na superfície da raiz.

Tadra-Sfeir et al. (2015) analisaram o transcriptoma do *H. seropedicae* SmR1 cultivado na presença de naringenina e os resultados mostraram que genes codificantes para MCPs, pertencentes ao agrupamento “Cluster” II, foram transcritos na presença do flavonoide. O padrão de expressão do operon *fde* (“flavonoid degradation”) em *H. seropedicae* estirpe SmR1 foi avaliado através de ensaios de atividade de β-galactosidase. Os resultados mostraram que a presença do flavonoide naringenina aumentou a atividade da β-galactosidase em 36 vezes com relação ao controle. A estirpe foi capaz de degradar o flavonoide naringenina a níveis indetectáveis após 9 horas de crescimento. Porém uma estirpe mutante no gene *fdeA* foi incapaz de degradar o flavonoide, o que indica que o operon é o responsável pela degradação de flavonoides em *H. seropedicae* (MARIN et al. 2013).

O gene chalcona sintase (*Zmchs*) está envolvido com a síntese de flavonoides relacionados à defesa em plantas. Amaral et al. (2014) analisaram a expressão desse gene em raízes de milho inoculadas com *H. seropedicae* Smr1 após 1, 4, 7 e 10 dias de inoculação e identificaram que este gene esteve menos expresso nas plantas inoculadas, com uma alteração significativa apenas no sétimo dia.

Peptídeoglicano podem ser reconhecidos como elicitores da imunidade inata da planta sendo reconhecidos como “microbe-associated molecular pattern” (MAMP) (ERBS e NEWMAN, 2012). Balsanelli et al. (2016) demonstraram que os genes *mur*, responsáveis pela biossíntese de peptídeoglicano, foram menos expressos em *H. seropedicae* ao iniciar a colonização epífita quando comparado à *H. seropedicae* em condições planctônica. Além disso, os genes da transglicoliase lítica da mureína (*Hsero_3419* e *Hsero_3582*) revelaram-se seis vezes mais expressos quando colonizando epifiticamente raízes de milho, o que sugere perda de camadas de peptídeoglicano durante essa condição. Na presença do flavonoide naringenina os genes que codificam as enzimas Mur ligases, responsáveis pela montagem do peptídeoglicano (*murC*, *murD*, *murE* e *murF*) foram reprimidos. Esses resultados demonstram que *H. seropedicae* é capaz de controlar a produção de peptídeoglicano em resposta a sinais da planta hospedeira (Tadra-Sfeir et al., 2015).

Uma análise do perfil de expressão gênica em raízes de arroz inoculadas com *H. seropedicae* evidenciou um decréscimo na expressão da proteína relacionada à defesa, PBZ1, e tioninas, o que sugere que a inoculação da bactéria pode modular a defesa da planta para permitir o estabelecimento de uma cooperação eficiente entre bactéria-hospedeiro (BRUSAMELLO-SANTOS et al., 2012). D rogue et al. (2014) também demonstraram que a inoculação de *Azospirillum* sp. em plantas de arroz induziu expressão diferencial de nove genes envolvidos na sinalização do ácido abscísico, e sete genes envolvidos na sinalização do ácido salicílico, o que sugere que talvez bactérias promotoras do crescimento possam modular a expressão de genes relacionados à imunidade da planta.

A cadeia de oligossacarídeos de lipopolissacarídeos (LPS) é composta por monossacarídeos como raminose, glicose e N-acetil glucosamina. Através de estudos realizados por Balsanelli et al. (2010), foi possível verificar que o LPS do *H.*

seropedicae participa da adesão da bactéria em raízes de milho, possivelmente ancorando as porções N-acetil glucosamina aos receptores da planta hospedeira.

A adesão do *H. seropedicae* SmR1 à superfície de raízes de milho se mostrou ser mediada pela ligação do LPS às lecitinas das raízes. Este mecanismo ocorre em outras plantas hospedeiras como trigo e arroz, e alterações na estrutura do LPS reduzem a capacidade de adesão bacteriana em 90% (BALSANELLI et al., 2013). Pankiewicz et al. (2016) demonstraram que os genes que codificam os filamentos de hemaglutinina (*Hsero_1294* e *Hsero_3251*) foram expressos 2,8 e 2,3 vezes mais respectivamente, quando aderidos a raízes de trigo comparados à células bacterianas em condições planctônicas.

Uma mutação no gene *epsB*, responsável pela biossíntese de exopolissacarídeos (EPS) e formação de biofilme, diminuiu a produção de EPS e consequentemente a produção de biofilme. Porém, *H. seropedicae* mutante foi capaz de colonizar raízes de milho de maneira similar à estirpe selvagem, o que sugere que a colonização epífita e endofítica não depende da formação de biofilme (BALSANELLI et al., 2014). Os genes codificantes de EPS também não foram encontrados quando analisados os transcritos do *H. seropedicae* de vida livre e aderida a raízes de trigo, o que corrobora com os dados encontrados por Balsanelli et al. (2014) (PANKIEWICZ et al. 2016).

O principal agrupamento gênico para flagelos teve seus níveis de expressão alterados em *H. seropedicae* vivendo epíteticamente. Isso sugere uma mudança do estilo de vida livre para um estado séssil, em que *H. seropedicae* pode utilizar a motilidade espasmódica através do uso dos pili tipo IV. Assim, a expressão do gene de retração ATPase codificado pelo *pilT* (*Hsero_0816*) teve um aumento de 1,6 vezes, e o gene *pill* codificante para a mobilidade espasmódica teve aumento em sua expressão de 2,5 vezes mais em células bacterianas aderidas (PANKIEWICZ et al. 2016). Todavia, Balsanelli et al. (2016) detectaram níveis de expressão dos genes *pilOPQRSM* aumentada 10 vezes em células bacterianas antes da adesão à raiz. Porém esse aumento não foi encontrado quando *H. seropedicae* já se encontrava aderido à raiz, sugerindo que talvez o *pili IV* seja requerido no contato inicial com a planta hospedeira, estando envolvido com a adesão.

De acordo com o descrito por Baldani et al. (1986), *H. seropedicae* é capaz de crescer aerobicamente usando nitrato como fonte de nitrogênio. Porém essa

capacidade é perdida em condições anaeróbicas, perdendo também a capacidade de desnitrificação. Bonato et al. (2016) estudaram a importância dos genes respiratórios nitrato redutase (*NAR*) em *H. seropedicae* e descobriram que estes não são necessários para a assimilação de nitrato, mas que estão envolvidos na produção de óxido nítrico, uma molécula importante durante a sinalização da bactéria com a planta hospedeira.

Pankievicz et al. (2016) demonstraram que a expressão do operon contendo os genes *nif* foi expresso durante a associação com as raízes da planta hospedeira, indicando fortemente a atividade de fixação de nitrogênio, sendo mais expresso nas células bacterianas epifiticamente aderidas que as células bacterianas de vida livre. Durante a colonização o sistema Ntr foi induzido, ativando genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio, o que inclui o nitrato, nitrito, amônia, transportadores de ureia e o ativador de transcrição *nifA*, ativando consequentemente os genes *nif* (BALSANELLI et al., 2016). Estes autores também verificaram que células bacterianas de vida livre tiveram um aumento da expressão dos genes *nif* três dias após a inoculação, em comparação com células bacterianas aderidas epifiticamente tiveram um decréscimo na expressão desses genes, talvez por consequência das fontes de nitrogênio fornecidas pela planta hospedeira.

Lima et al. (2014) identificaram um aumento no conteúdo de compostos nitrogenados exsudados por raízes de milho inoculadas com *H. seropedicae*, o que pode estar relacionado com um aumento das taxas de N absorvido pela planta via FBN. Bonato et al. (2016) identificaram que a inoculação de *H. seropedicae* mutante no gene *narG*, codificador da nitrato redutase, resultou em menores índices de massa seca da raiz e parte aérea das plantas quando comparadas com as inoculadas com a estirpe selvagem.

Em diversos organismos, as proteínas Fnr agem como um regulador dos genes requeridos para a mudança metabólica em resposta aos níveis de O₂. Em *H. seropedicae*, esta proteína tem como papel a regulação da configuração da cadeia transportadora de elétrons, a fim de explorar a flexibilidade respiratória e otimizar o acoplamento de energia em resposta à disponibilidade de oxigênio (BATISTA et al., 2013). Uma análise dos transcritos de *H. seropedicae* colonizando raízes de trigo revelou que os genes *Fnr1* (*Hsero_3197*) e *Fnr2* (*Hsero_2381*) tiveram seus níveis de expressão aumentados em 16,8 e 38,9 vezes, respectivamente (PANKIEVICZ et

al., 2016).

De acordo com Kadouri et al. (2003) e Ratcliff e Denisson, (2011), a habilidade de produzir e estocar poli-hidroxibutirato (PHB) influência positivamente a sobrevivência e/ou estresse em ambientes competitivos. Segundo Pankievicz et al. (2016), os genes codificantes para produção de PHB foram induzidos em células aderidas. O gene *phaA2* (Hsero_0239), *phaB* (Hsero_2998) e *phaC1* tiveram seus níveis de expressão aumentados em 2,7, 1,6 e 1,5 vezes respectivamente. Balsanelli et al. (2016) relataram aumento nos níveis de expressão dos genes *phb* (ABC) relacionados à biossíntese de PHB de 12 a 16 vezes em bactérias aderidas comparadas às de vida livre. A expressão do metabolismo de PHB em diferentes fases sugere que a síntese e degradação de PHB é necessária em estágios primários da colonização da bactéria na planta hospedeira

Herbaspirillum seropedicae possui genes para quatro possíveis rotas de produção de ácido indol-acético (AIA), também conhecido como o fitormônio auxina (PEDROSA et al., 2011). Os genes codificantes para a produção de AIA, *Hsero_4278* e *Hsero_1422*, estiveram 3,1 e 2,7 vezes mais expressos, respectivamente, em *H. seropedicae* quando aderido às raízes de trigo, o que sugere que a produção de AIA é estimulada pelo contato com a planta hospedeira (PANKIEVICZ et al., 2016). Brusamello-Santos et al. (2012) analisaram os transcritos de raízes de plantas de arroz inoculadas com *H. seropedicae*, e encontraram dois repressores de resposta à auxina (*IAA18-like* e *IAA11-like*) regulados negativamente, o que pode ser justificado pela produção de auxina por parte do micro-organismo.

Em contrapartida, a presença de AIA de origem bacteriana pode estimular a presença de ACC deaminase, modulando a produção de etileno, permitindo o desenvolvimento da planta sob condições estressantes (PEDROSA et al., 2011). Vargas et al (2012) investigaram os níveis de expressão de receptores de etileno (*OsERS1*, *OsERS2*, *OsETR2* e *OsETR3*) em transcritos de raízes de arroz inoculados com *Azospirillum brasiliense* sp245 e *Burkholderia kururiensis* M130, tendo sido possível concluir que a inoculação destes micro-organismos promotores do crescimento vegetal induziu a expressão desses receptores, o que indica que a via desse hormônio esteve desativada.

As análises feitas por Brusamello-Santos et al. (2012) em arroz inoculado com *H. seropedicae* demonstraram que o fator de transcrição envolvido na resposta ao etileno (*ERF2-like*) foi reprimido quando na presença do micro-organismo. Os genes “ent-copalyl difosfato sintase” (*Zmcps1*), “ent-caureno oxidase” (*Zmko1*) e giberelina 20 oxidase 4 (*Zmga20ox4*) envolvidos na síntese de giberelina em plantas, estiveram expressos diferencialmente em plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* Smr1. Os níveis de expressão de *Zmga20ox4* e *Zmcps1* tiveram um aumento após 10 dias, comparado ao primeiro dia de inoculação, tanto no controle quanto nas plantas inoculadas, enquanto o gene *Zmko1* teve um aumento após quatro dias de inoculação quando comparado ao controle (AMARAL et al., 2014).

Apesar do conhecimento a despeito das potencialidades do *H. seropedicae* sobre a promoção do crescimento vegetal, ainda não se conhece totalmente as bases moleculares da interação com as plantas, sendo assim, estudos de genes e redes metabólicas são necessários para sedimentar os conhecimentos e aperfeiçoar a atividade de promoção do crescimento vegetal.

2 - REVISÃO EM BASES DE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Com o desenvolvimento da tecnologia dos bioinoculantes microbianos, muitos produtos vêm sendo produzidos com base nessa tecnologia, incrementando as inovações cada vez mais e aumentando o número de patentes. O *Herbaspirillum seropedicae* faz parte de um grupo seletivo de microrganismos capazes de promover o crescimento e desenvolvimento vegetal, tornando seu uso em preparações microbianas para bioinoculantes, um ingrediente imprescindível.

Com o objetivo de analisar o estado da proteção intelectual do uso do *H. seropedicae* em inoculantes, foram feitas buscas nos banco de dados de propriedade intelectual brasileiro, o que resultou em nenhuma patente encontrada com relação ao uso de *H. seropedicae* em preparações de bioinoculantes. Porém, existe um bioinoculante turfoso com *H. seropedicae*, produzido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) para o cultivo de milho com a estirpe BR11417 (REIS et al., 2009a). Há também um bioinoculante turfoso produzido pela EMBRAPA, à base de um consórcio bacteriano entre as estirpes *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281), *H. seropedicae* (BR11335), *H. rubrisubalbicans* (BR11504), *Nitrospirillum amazonense* (BR11145) e *Paraburkholderia tropica* (BR11366) para cultivo de cana-de-açúcar (REIS, et al., 2009b).

Ao realizar uma busca pelos termos *Herbaspirillum seropedicae* e bioinoculante no banco de dados European Patent Office (EPO), United States Patents and Trademark Office (USPTO) e World Intellectual Property Organization (WIPO-Patentscope), foram encontradas as patentes relacionadas na tabela 1.

A patente WO 2002045513 A1 descreve o uso de um bioinoculante na forma de consórcio entre estirpes bacterianas de gêneros distintos, como *H. seropedicae* 2A, *Pantoea agglomerans* P102, *Klebsiella pneumoniae* 342, *Klebsiella pneumoniae* zmvsy, *H. seropedicae* Z152 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15.

A patente WO 2013029112 A1 compreende um kit de bioinoculante contendo estirpes de *H. seropedicae*, *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus subtilis*, tensoativos e estimulantes que podem ser aplicados no solo ou diretamente na planta.

A patente WO2016009397A1 refere-se a um bioinoculante seco onde os

micro-organismos se encontram encapsulados em grânulos de alginato, podendo estes micro-organismos ser *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia cepacea* ou *H. seropedicae*.

Nº do pedido	Título	Requerente	Inventor	Data de publicação	Base de Dados
WO 2002045513 A1	“Bacterial inoculants for enhancing plant growth”	Wisconsin Alumni Research Foundation	TRIPPLETT, E. W.	13.06.2002	Patentscope Espacenet
WO 2013029112 A1	“Microbial composition, method and kit for enhancing plant growth”	Kyle Anthony Merritt	MERRITT, K. A.	07.03.2013	Patentscope Espacenet
WO 2016009397 A1	“Biofertilizer, method for it's preparation and uses thereof ”	Consorzio di Ricerche Applicate Alla Biotecnologia	SPERA, D. M.; et al.	21.01.2016	Patentscope Espacenet

Tabela 1: Resultados de busca em banco de dados internacionais sobre patentes utilizando os termos “*Herbaspirillum seropedicae*” e “bioinoculante”.

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. C. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- AMARAL, F. P., et al. Gene expression of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promote bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Symbiosis**. v. 62, p.41-50, 2014.
- ARAÚJO, A. E. da S., et al. Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. **Applied Soil Ecology**. n. 64, p.49–55, 2013.
- BALDANI J. I., et al. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Academia Brasileira de Ciências**. n.56, p.365, 1984.
- BALDANI, J. I., et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, V. L. D., et al. Identification and ecology of *Herbaspirillum seopedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**. N. 19, p.65–73, 1992.
- BALDANI, J. I., et al. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*]*rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb . nov .; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, n. 3, p.802–810, 1996.
- BALDANI, V. L. D., et al. Inoculation of Rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol.Fertil.Soils** n.30, p.485–491, 2000.
- BADANI, J. I., et al. The Family Oxalobacteraceae. In: ROSEMBERG, E., et al. **The Prokaryotes - Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria 2014**. 4th edition ed. [s.l.] Springer Reference, 2014.
- BALSANELLI, E., et al. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v.12, n.8, p.2233–2244, 2010.
- BALSANELLI, E., et al. Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. **Plos One**, v.8, n.6 , p.1-9, 2013.

BALSANELLI, E., et al. Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*, **Plos One**, v.9, n.10, p. 1-10, 2014.

BALSANELLI, E., et al. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v.18, n.8, p.2343–2356, 2016.

BASTIÁN, F., et al Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, n.24, p.7–11, 1998.

BATISTA, M. B., et al. The *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 FnR orthologs controls the cytochrome composition of the eletron transport chain. **Scientific Reports**, n. 2544, p. 1-11, 2013.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

BERGAMASCHI, C., et al. Occurrence of diazotrophic bacteria associated with forage sorghum cultivars. **Ciência Rural**, n. 37, p.727–733, 2007.

BONATO, P., et al. RNA_Seq analyses reveal insights into the function of respiratory nitrate reductase of the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Environmental Microbiology**, v.18, n.8, p.2677–2688, 2016.

BOTTINI, R.; CASSAN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology Biotechnology**. n. 65, p.497–503, 2004.

BRASIL M. DA S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V.L.D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, n. 29, p.179–190, 2005.

BRUSSAMELO-SANTOS, L. C. C., et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant soil**, v.356, p.113-125, 2012.

BURNEY, J. A., et al. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.107, n.26, p.12052-12057, 2010.

CANELLAS, L. P., et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Pant Soil, Plant Soil**. v.366 p.119-132, 2013.

CRUZ, L. M., et al. 16S ribosomal characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied and Environment Microbiology**. n. 67, p. 2375–3279, 2001.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, n. 44, p. 310–313, 1992.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, n.22, p.107–149, 2003.

DROGUE, B., et al. Plant root transcriptome profiling reveals a strain-dependent response during Azospirillum-rice cooperation. **frontiers in Plant Science**. v. 5, n. 607, p.1-14, 2014.

ESTRADA, G. A., et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant Soil**. n.369, p.115–129, 2013.

FALK, E. C., et al. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.36, p.80-85, 1986.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Superavit de US\$ 81,86 bilhões do agronegócio foi o segundo maior da história. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/superavit-de-us-81-86-bilhoes-do-agronegocio-foi-o-segundo-maior-da-historia>> Acesso em: 15 de novembro de 2018.

FAOSTAT. Cereal Total Production. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#country/21>> Acesso em: 15 de novembro de 2018.

FAOSTAT. Agriculture Emissions N₂O. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#country/21>> Acesso em: 15 de novembro de 2018.

FAOSTAT. Input, Fertilizers consumption in nutrients. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#country/21>> Acesso em: 15 de novembro de 2018.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz ¼ Selection of peats inoculants with diazotrophic bacteria in two rice varieties. **Acta Sci Agron** n.32, p.179–185, 2010

FOLEY, J. A., et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v.478, n.7369, p.337-342, 2011.

GALLOWAY, J. N., et al. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, v.320, n.5878, p.889-892, 2008.

GILLIS, M., et al. Taxonomic relationships between [Pseudomonas] rubrisubalbicans, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [Aquaspirillum] autotrophicum. In: **Nitrogen fixation**. Springer Netherlands, p. 293-294, 1991.

GREBE, T. W.; STOCK, J. Bacterial chemotaxis: the five sensors of a bacterium. **Current Biology**. v. 8, n.5, p.R154-R157, 1998.

GYANESHWAR, P., et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**, v. 245, n. 1, p. 83-93, 2002.

JAMES, E. K. OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Science**. n. 17, p. 77–119, 1998.

JAMES, E. K., et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**. n. 15, p. 894–906, 2002.

KEYEO, F., et al. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph and promoting growth of rice seedlings. **Biotechnology**, v.10, n.3, p.267-273, 2011.

KIRCHHOF, G., et al. *Herbaspirillum frisingense* sp . nov ., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157–168, 2001.

LAMBRECHT, M., et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. **Trends Microbiology**. n.8 p.298–300, 2000.

LEANDRO, M. R. **Colonização endofítica de *Arabidopsis thaliana* por *Herbaspirillum seropedicae* e seus efeitos na promoção do crescimento vegetal e na regulação diferencial de proteínas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2016.

LIMA, L. S., et al,. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. **Chem. Biol. Technol. Agric.** v. 1, n.23, p.1-18, 2014.

LIN, S.-Y., et al. "Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov." **Antonie van Leeuwenhoek** n.105, v.6, p.1149-1162, 2014.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly-b-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasiliense* stress endurance and root colonization. **Appl Environ Microbiol**,v.69, p.3244–3250, 2003.

MARIN, A. M., et al. Naringenina degradation by the endophytic diazotrophy *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Microbiology**, v. 159, p.167-175, 2013.

MERRITT, K. A. Method and system for promoting microbial nitrogen fixation activity, **Google Patents**. 2006.

MONTEIRO, F.; GENIN, S.; VAN DIJK, I.; VALLS, M. A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. **Microbiology**. v.158, p 2107-2116, 2012.

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

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**. v.3, n.10, p.26-40, 2003.

MORSOMME P.; BOUTRY, M. The plant plasma-membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. **Biochim Biophys Acta** v.1465, p.1-16, 2000.

NJOLOMA, J., et al. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp.B501gfp1. **Biology and Fertility of Soils**, 43(2), 137–143, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M., et al. The effect of inoculating endophytic N2 –fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and soil**. n. 242, p.205-215, 2002.

OLIVARES, F. L., et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**. n. 2, p.197–200, 1996.

OLIVARES, F. L., et al. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**. n. 135, p.723–737, 1997.

OLIVARES, F. L., et al. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plantgrowth promoting bacteria and humic substances boosts productionof organic tomatoes. **Scientia Horticulturae** v.183 p.100–108, 2015.

PANKIEWICZ, V. C. S., et al. RNA_Seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) root. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n.6, p. 589-603, 2016.

PEDROSA, F. O., et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* stain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **Plos Genetics**, v.7, n.5, p.1-10, 2011.

PEOPLES, M. B., et al. Minimizing gaseous losses of nitrogen. BACON, P. E. (Ed.). **Nitrogen fertilizer in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 565-606.

RADWAN, T. EL-S. EL-D., et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

RATCLIFF, W.C.; DENISON, R.F. Bacterial persistence and bet hedging in *Sinorhizobium meliloti*. **Commun Integr Biol**. v.4, p.1–3, 2011.

REIS, V. M., et al. Comunicado Técnico: Recomendação de inoculante para cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417. **Embrapa**. n. 119, 3p. 2009a.

REIS, V. M., et al. Circular Técnica: Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). **Embrapa**, n.30, 4p. 2009b.

RODRIGUES L. DA S., et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 41, p.275–284, 2006.

ROESCH, L. F. W., et al. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant Soil**. n. 302, p. 91–104, 2008.

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

RYAN, R.P., et al., Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters** n.278, p.1–9, 2008.

SALA, V. M. R., et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. N. 29, p. 345–352, 2005.

SILVA, S. F.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. **Chem. Biol. Technol. Agric.** v.4, n. 24, p.1-6, 2017.

SPERA, D. M., et al. Biofertilizer, method for its preparation and uses thereof, **Google Patents**, 2016.

TADRA-SFEIR, M. Z., et al. Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenina. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1-6, 2015.

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

TILMAN, D., et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v.418, p.671-677, 2002.

TRIPLETT, E. W., et al. Bacterial inoculants for enhancing plant growth. **Google Patents**. 2002.

VARGAS, L., et al. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant or bacterial genotypes. **Plant Soil**. v. 256, p.127-137, 2012.

WEBER, O. B. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant Soil**, n. 210, v. 1, p.103–113, 1999.

WEBER, O. B.; FREIRE, F. C. O. Contribuição de bactérias diazotrópicas na cultura da bananeira: perspectivas de utilização na produção integrada. **Embrapa**. n.16, 29p. 2003.

ZHU, B., et al. Genome sequence of the pathogenic *Herbaspirillum seropedicae* strain Os45, isolated from rice roots. **Journal of Bacteriology**. N. 194, p.6995–6996, 2012.

CAPÍTULO 2

**PHENOTYPE MODULATION ON THE MAIZE ROOT GENE EXPRESSION BY THE
INOCULATION OF *Herbaspirillum seropedicae* HRC54**

1 - INTRODUCTION

Herbaspirillum seropedicae is a plant growth promoting bacterium (PGPB) able to colonize the inner spaces of the tissues of economically important grasses like wheat, rice, sugarcane and maize (Baldani et al., 1986). Endophytic root-associated *Herbaspirillum seropedicae* uses photosynthetic plant C-sources to generate energy and reduction power to maintain its metabolism and biological activity. By the way, one possible plant growth-promotion benefit comes from the biological nitrogen fixation (BNF) activity of the bacteria living within the apoplastic compartment (JAMES, OLIVARES, 1998). The endophytic interaction takes place mainly in the intercellular spaces of the cortical root tissue and lumen of the metaxylem favoring the supply of nitrogen for the plant host (JAMES E OLIVARES, 1998).

Herbaspirillum seropedicae can associate endophytically with grasses of economical importance like sorghum, maize, rice (BALDANI et al., 1984; BERGAMASCHI et al., 2007; ZHU et al. 2012), sugar-cane (OLIVARES, et al., 1996; RODRIGUES et al., 2006), wheat (BRASIL et al., 2005; SALA et al., 2005) and in pineapple and banana (WEBER et al., 1999; CRUZ et al., 2001).

Beside this, *H. seropedicae* can modulate growth and development of the plants through different mechanisms such as production of phytohormones, phosphate solubilization, protection against pathogens and abiotic stresses alleviation (BASTIÁN et al., 1998; LAMBRECHT et al., 2000; BOTTINI; et al., 2004; ESTRADA et al., 2013; DOBBELAERE et al., 2003; RYAN et al., 2008; ROSENBLUETH e MARTINEZ-ROMERO 2006).

Hormonal balance disruption is one of the remarkable effects of the *H. seropedicae* inoculation in the plant host. Auxin-like activity of bioactive compounds and other unknown compounds secreted by the bacteria would concur to the increased rates of seed germination and plantlets growth. Such effects in plants can be accompanied by rapid C-sources remobilization from seeds as well increased root branching (OLIVARES et al. 2017). Growth and architectural changes in root are mainly driven by auxin effect that actives P-type proton ATPase of plasma membrane. H⁺-ATPase induction acidifies plant apoplast, induce the activity of cell wall loosening enzymes such as those from the expansin family, which contributes to

plant cell expansion (COOSGROVE, 2000). In addition, exogenous bacterial auxin increases differentiation rates of pericycle cells in root vascular tissue system, increasing by consequence lateral root formation sites (OLIVARES et al. 2017). Root architectural changes in combination with increased electrochemical gradients serve as well to energize secondary nutrient transport and to increase nutrient uptake in the soil system (OLIVARES et al. 2017).

These are effects triggered by the biostimulation observed in many researches associated with *H. seropedicae*. It has been demonstrated that the inoculation with *H. seropedicae* promoted the growth and increased nitrogen accumulation in sugarcane, rice and maize crops (OLIVEIRA et al., 2002; GYANESHWAR et al., 2002; ALVES, 2007). Weber and Freire (2003) have shown that the endophytic colonization of *H. seropedicae* reduced the damage effects of *Fusarium oxysporum* in banana seedlings.

Despite the known potential of *H. seropedicae* as plant growth promotion agent, the molecular bases of the plant-bacteria interaction is poorly understood so a better understanding of genes and metabolic networks involved in these processes are necessary to improve the plant response for future increased adoption of *Herbaspirillum*-based inoculants by farmers.

The RNA_Seq is a technology that provides a great leap in understanding the functionality of genomes (MARDIS, 2008a, MARDIS, 2008b), enabling a more accurate study of metabolic pathways involved in microorganism-plant interaction. Several studies have been carried out to identify the genes differentially expressed in plants associated to microorganisms (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012; AMARAL et al., 2014; WU et al., 2018).

The objective of this work was to evaluate the gene expression profile of maize roots inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* through RNA-Seq to understand how the inoculation benefits affect plant global gene expression.

2 - METHODS

2.1 Preparation of inoculum

The microorganism used was *Herbaspirillum seropedicae* strain HRC54 (SisGen nº AFD1CAD), originally isolated from sugarcane roots. The pre-inoculum was obtained from a pure plate colony and after growth in DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) liquid medium for 24h at 30°C in an orbital shaker at 150rpm. After growth, a 20 µL aliquot of the bacterial suspension was transferred to JNFB (DÖBEREINER et al. 1995) liquid medium supplemented with NH₄Cl (1g.L⁻¹) for 48 hours under the same conditions described above. After 48 hours of growth the bacterial cells were sedimented by centrifugation (5.000 g for 15 min) and resuspended in sterile water at cell density of 4x10⁹ cfu.ml⁻¹.

2.2 Plant inoculation and weight measures

To obtain the seedlings, maize seeds were used (*Zea mays L.*, var. Dekalb 7815), the seeds were surface disinfected by immersion in 0.5% NaClO for 30 minutes, followed by rinsing and immersion in distilled water for 6 hours. After the seeds were placed to germinate on Germitex paper for 72 hours. The seeds with radicles approximately 2.5 cm long were selected and placed in 2L pots filled with 0.2 M calcium chloride solution, making a total of 40 seeds per pot. The maize seedlings were inoculated with a 20 mL aliquot of the bacterial inoculum. The tests were carried out under the following conditions: uninoculated maize plants (Control) and maize plants inoculated with 2x10⁷ cells mL⁻¹ *H. seropedicae* strain HRC54 at 28°C, photoperiod of 16h/8h and aeration by aquarium pump.

After five days of biostimulation, the plants were collected and separated in biological triplicates to determine the fresh and dry weight of shoots and the roots. Roots were separated for extraction of RNA and DNA.

2.3 Quantification of *H. seropedicae* in maize roots

For the quantification of total diazotrophic bacteria associated with the maize roots, these were washed with sterile water and pounded in a sterile mortar with saline solution 0,9%. Serial dilutions of 10⁻³ to 10⁻⁷ were made and inoculated in

semisolid, N-free culture media JNFb. Diazotrophic bacteria populations were counted based on the most probable number (MPN), using McCrady table for three replication per dilution (DÖBEREINER et al., 1995).

For the quantification of *H. seropedicae* stabilized in the inoculated and uninoculated maize roots total DNA was isolated using DNAzol (Thermo Fischer) using approximately 300 mg of the vegetable tissue macerated in liquid nitrogen. Total DNA samples were quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer and were standardized to the final concentration of 40 ng. μ L $^{-1}$.

Specific primers for *H. seropedicae* ribosomal DNA 16S (16S rDNA) were used (Table 1) for PCR amplification. The protocol consisted on an initial incubation at 50 °C for 2 min, 95 °C incubation for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. This PCR aimed to detect the presence of the bacterial in the extracted material from three control and three inoculated plants as described by Pereira et al. (2014).

Primers	Sequence	Amplicon
HRC54Fw	CTAATACCGCATACGATCTAC	307pb
HRC54Rew	TTCTGGATATTAGCCAAAACC	

Table 1: sequence of primers specific for the 16S rDNA of *Herbaspirillum seropedicae*. Pereira et al. (2014).

Standard curve was constructed to standardize the quantification of the *H. seropedicae*, the total DNA was extracted with DNAzol, quantified in NanoDrop 1000 Spectrophotometer and standardized to the final concentration of 100ng. μ L $^{-1}$. From the standardized DNA solution, a serial dilution was made up to the concentration of 0.001ng. μ L $^{-1}$ (10^{-5}). Diluted and undiluted DNA samples and DNA samples from inoculated and uninoculated maize roots were used in qPCR reactions containing 5 μ L of *H. seropedicae* DNA of each dilution (100, 10, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 ng. μ L $^{-1}$) 0.3 μ L (100nM) of each primer specific for 16S rDNA of *H. seropedicae*, 7.5 μ L of Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) and 1.9 μ L of water. The amplification efficiency was calculated using de formula E= $10^{(-1/\text{slope})^{-1}}$.

2.4 RNA extraction and sequencing

For extraction of RNA, 100 mg of control roots and inoculated plant roots were macerated in liquid nitrogen. The total RNA of the samples was extracted with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using the Nanodrop 1000 spectrophotometer.

The RNA was eluted in DEPC-treated water (total amount of 4-10 µg RNA) digested with DNase and depleted of ribosomal RNA using the GOTAQ® 1-STEP RT-QPCR (PROMEGA). Subsequently, a 1% free RNase agarose gel was made to analyze the RNA extracted. Sequencing libraries were prepared using the Whole Transcriptome Analysis kit (Applied Biosystem) according to the manufacturer's protocol. Libraries were sequenced on the Illumina platform by Lactad company - Brazil.

2.5 Bioinformatics analysis of the sequences obtained by RNA_Seq

The reads obtained from the RNA_Seq were analyzed to identify ribosomal RNA (rRNA) sequences in two steps: 1- rRNA sequences of *Zea mays* were downloaded from NCBI and an index file of rRNA was created using Novoalign v3.06.05. (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/>). Then reads were mapped on index file using Novoalign 2- All fastq files were converted into Fasta and BLASTN Analisys was performed against downloaded rRNA sequences. Identified rRNA sequences were removed and reads were cleaned. Further, quality of all reads was accessed by running the FastQC software (WINGETT; SIMON, 2018) and high-quality cleaned reads were aligned on *Z. mays* genome using Novoalign.

Gene expression levels were calculated with Cufflinks v2.1.1 (TRAPNELL et al., 2012), and normalized as reads per kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM). The differential gene expression between control and inoculated were determined by using Cuffdiff v2.2.1 (TRAPNELL et al., 2012). The genes with differences of at least one-fold change along with adjusted p-value (FDR) ≤ 0.05 were considered to be significantly differentially expressed.

Simultaneously, raw reads counts were performed using htseq-count and differently expressed genes (DEGs) analysis was performed with EdgeR (ROBINSON, 2009). The genes were considered as differentially expressed with differences of at least one-fold change along with FDR ≤ 0.05 .

Venn diagram was constructed as described (OLIVEIROS, 2015) (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) was used to analyze common and unique DEGs in the treatments. The Gene Ontology (GO) annotations of the DEGs were accomplished using Blast2GO® (GÖTZ et al., 2008.) and functional classification analysis was executed with MapMan version 3.6.0RC1 (<https://mapman.gabipd.org/>).

2.6 Validation of differentially expressed genes by Real Time qPCR

A new set of RNA samples were prepared with Trizol® reagent (ThermoFischer) and the cDNA synthesis was carried out using the ImProm-II™ kit (Promega) as described on the manufacturer's protocol using the 1µg from RNA extracted from the inoculated and uninoculated samples.

Real-time PCR quantification was used to validate differentially expressed of some genes identified through transcriptome analyses. Specific primers for each gene to be analyzed (Table 2) were designed using the Primer 3 Express (Applied Biosystems). The genes for α-Tubulin (α -Tub) and Tubulin β-chain (β -Tub) were used as normalizing genes, according to Lin, et al (2014).

Gene	Gene product	Access code	Primers sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)
PHTP9	Phosphate transporter protein9	NM_001196972.1	F: GACATGCCTTCTACAGCCA	110
			R: GAGATGCGGTACACCTCCTC	
GARP6	Gibberellin-regulated protein 6	NM_001301603.1	F: GCACCTACGGCAACAAGAAC	91
			R: GAGAGGGAGGGCTACTAGGG	
HMTD	Heavy metal transport detoxification	NM_001348787.1	F: CGCCGCTACCTATCTACAC	141
			R: TGCTAACGCTCCTAGAAC	
ERD4	Early responsive to dehydration protein	NM_001114650.2	F: CTATCCCTACCAACAAATCAGC	97
			R: CACAGCCTCATACTTTCTCAG	
Tub	Tubulin alfa-3 chain	NM_001174192.2	F: GCGCACCATCCAGTTCGT	61
			R: CTGGTAGTTGATTCCGCACTTG	
β-tub	Tubulin beta-4 chain	NP_001105457	F: CTACCTCACGGCATCTGCTATGT	139
			R: GTCACACACACTCGACTTCACG	

Table 3: Genes selected, primers designed and concentration used for RT-qPCR.

The primers were used in RT-qPCR reactions at concentrations of 500 nM, using 7,5 µL of FAST SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) in Step One Plus Real Time PCR machine (Applied Biosystems) under the following conditions: 40 cycles 95° C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min.

All qPCR runs were conducted in triplicate. The relative quantification was determined according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

3 - RESULTS

3.1 Plant growth promotion

The plant growth response was evaluated at five days after inoculation (DAI) of *H. seropedicae* by the means of fresh and dry weights of roots and shoots comparing with the uninoculated control plants. The biostimulation effect by bacterial inoculation was observed in the inoculated plantlets (Figure 1), where an increase of 166.7% was observed in the fresh biomass and 188% in the dry biomass of the shoots. Positive growth stimulation was observed in the roots inoculated, with an increase of 242% of fresh biomass and 73% in the dry biomass compared with the control (Figure 1).

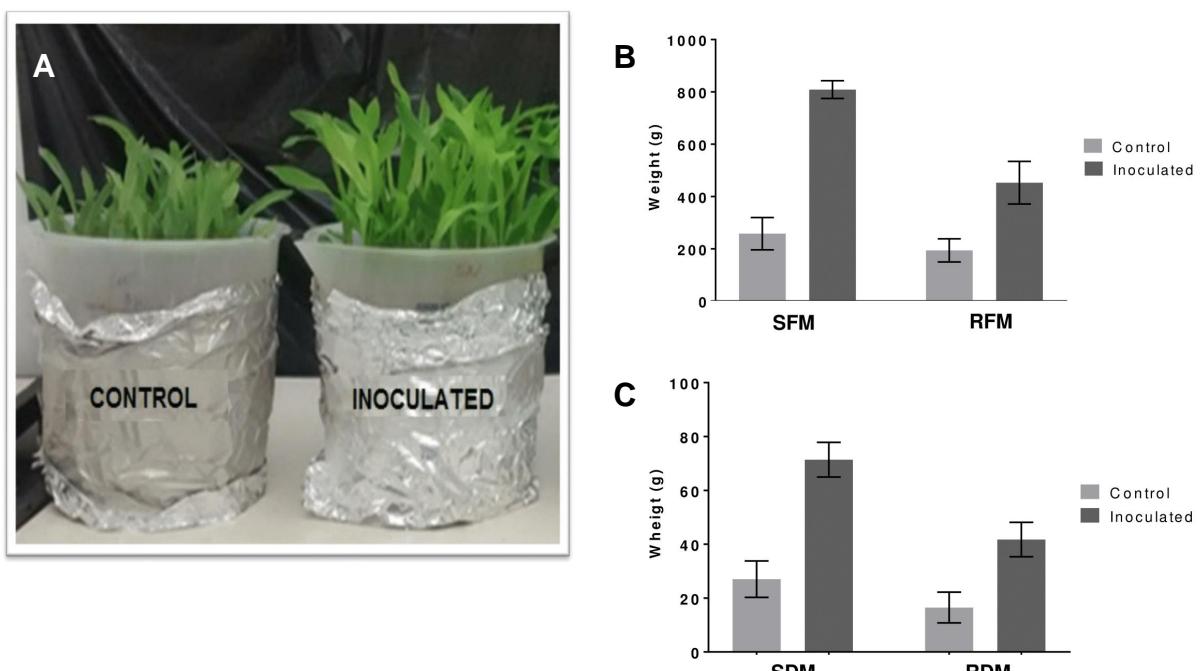


Figure 1: (A) Growth after 5 days of inoculation of 2×10^7 cells mL^{-1} of *H. seropedicae* strain HRC54 on maize variety Dekalb 7815. (B) Increase of the shot fresh mass (SFM) and root fresh mass (RFM). (C) Increase of the shot dry mass (SDM) and root dry mass (RDM).

3.2 Quantification of *H. seropedicae* in maize roots

Counting of diazotrophic bacteria by means of the NMP technique showed their occurrence in the control plants at 4.5×10^4 cells. mL^{-1} and inoculated plants at 1.2×10^7 cells. mL^{-1} (Fig. 2A) The confirmation of the presence of *H. seropedicae* established in the roots was evaluated by conventional PCR amplification using the specific primers for the 16S rDNA gene of *H. seropedicae* (Fig. 2B).

The DNA extracted from the inoculum and their dilutions were used to generate a standard curve ranging from 10^{-1} to $10^{-5} \text{ ng}.\mu\text{L}^{-1}$ of DNA. The efficiency of the primer was approximately 98% (Fig S1).

The standard curve generated by the Cycletreshold (C_T) average using the different DNA concentrations allowed calculating the number of *H. seropedicae* DNA copies stabilized in the roots of the inoculated and control plants, substituting the C_T values of the samples into the standard curve.

The CT values obtained from the amplification of the samples in qPCR were used to determine the number of bacterial cells present in the roots using a standard equation (Fig. S1B).

The number of bacterial cells in the inoculated maize were 10^6 while the uninoculated plants presented 10^2 bacterial cells. mg tissue^{-1} (Fig. 2C).

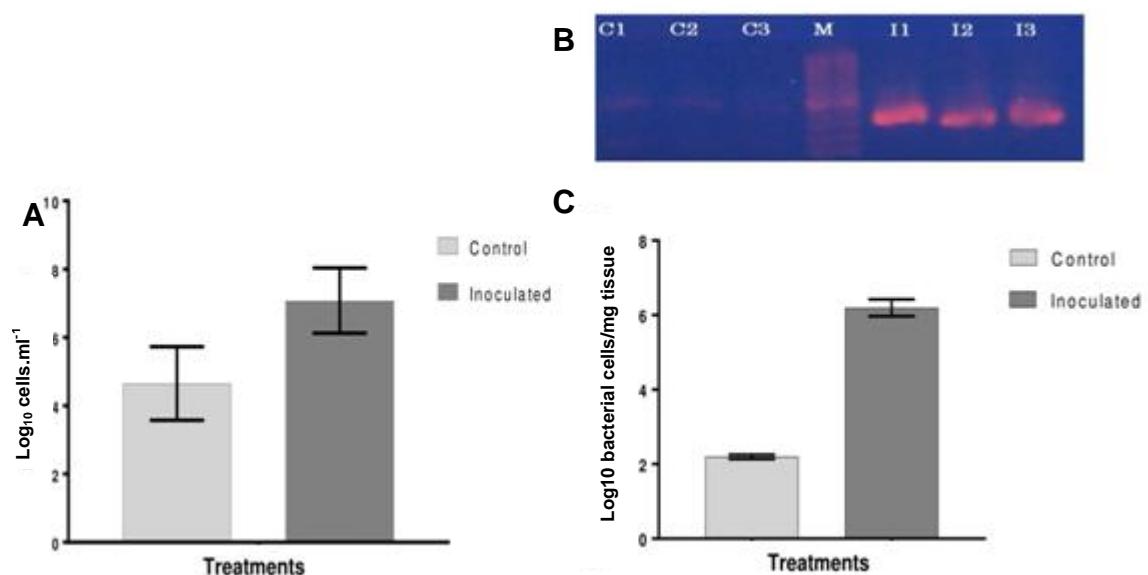


Figure 2: (A) Population size of root associated diazotrophs (MPN) (B) PCR amplification of the 16S rDNA from *Herbaspirillum seropedicae*. M= Molecular weight marker (100kb DNA ladder); C1, C2 and C3= Control plants; I1, I2 and I3= Inoculated plants. (C) Number of bacterial cells validated by qPCR. Estimation considered the copy number of 16S rDNA gene of *H. seropedicae*, the Avogadro's number and the product mass of the amplification.

3.3 Maize global transcript profile in response to *H. seropedicae* inoculation

Statistics on RNA_Seq reads are depicted in Table 4. (Table 3).

Table 3: Summary of RNA Seq data.

Samples	number of reads	number of reads (in millions)	uniquely mapped reads (%)	multiple mapped reads (%)	No mapped reads (%)
Control 1	88076503	88.08	86.3	7.6	6
Control 2	31824019	31.82	86.2	7.8	6
Control 3	59423976	59.42	86.8	7.8	5.4
Inoculated 1	52138879	52.14	64.7	9.8	25.4
Inoculated 2	16289067	16.29	83.1	7.6	9.3
Inoculated 3	46604990	46.60	71.5	8.7	19.8

The genes that showed fold change greater than 1.0 and $P=0.05$ were considered responsive to the inoculation of *H. seropedicae*. 1092 DEGs were identified through the cuffdiff analysis, including 543 up-regulated and 549 down-regulated genes; while edgeR analysis permitted the identification of 2152 DEGs, including 1177 up-regulated and 975 down-regulated genes. 949 DEGs were commonly identified through both bioinformatics tools, which represent 41.4% of the total DEGs (Figure 3).

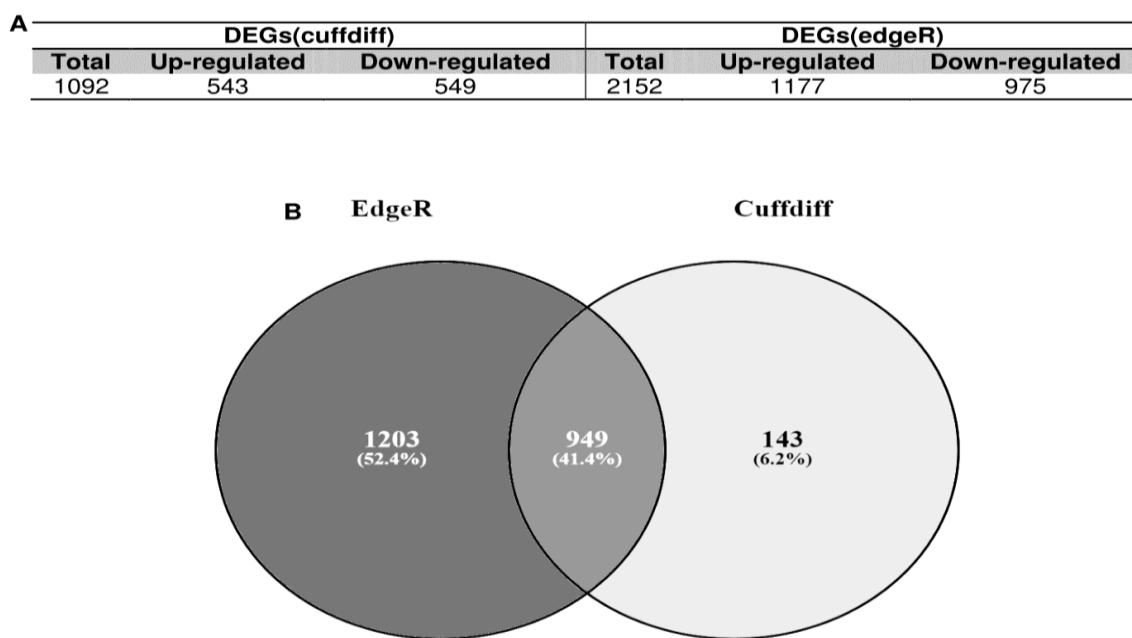


Figure 3: Bioinformatics identification of DEGs (A) General statistics according to the bioinformatics tool used. (B) Venn diagram showing the common DEGs identified.

Gene Ontology (GO) annotations showed that most up-regulated genes were of cellular components, representing 41.75%, followed by molecular functions with 32.33% and biological process with 25.91%. A distribution analysis of subclasses showed that the majority (27%) of the cellular components were of integral

components of membrane, while the majority of molecular functions were ATP binding (17%) and most of Biological process were phosphorylation and transport, both with 17%.

The most down-regulated genes were of biological process (42.12%), followed by cellular components with 34.67%, and finally molecular functions (23.30%). The biological process subclass with more down-regulated genes was organonitrogen compound biosynthetic process that corresponded to 10% of this categorization, while the cellular components subclass had the integral components of membrane (33%), and the molecular functions subclass the metal ion binding (16% of the DEGs with down regulation) (Figure 4 and Figures S2 and S3). 130 out from the 949 DEGs, corresponding to 13.74%, had no GO annotations.

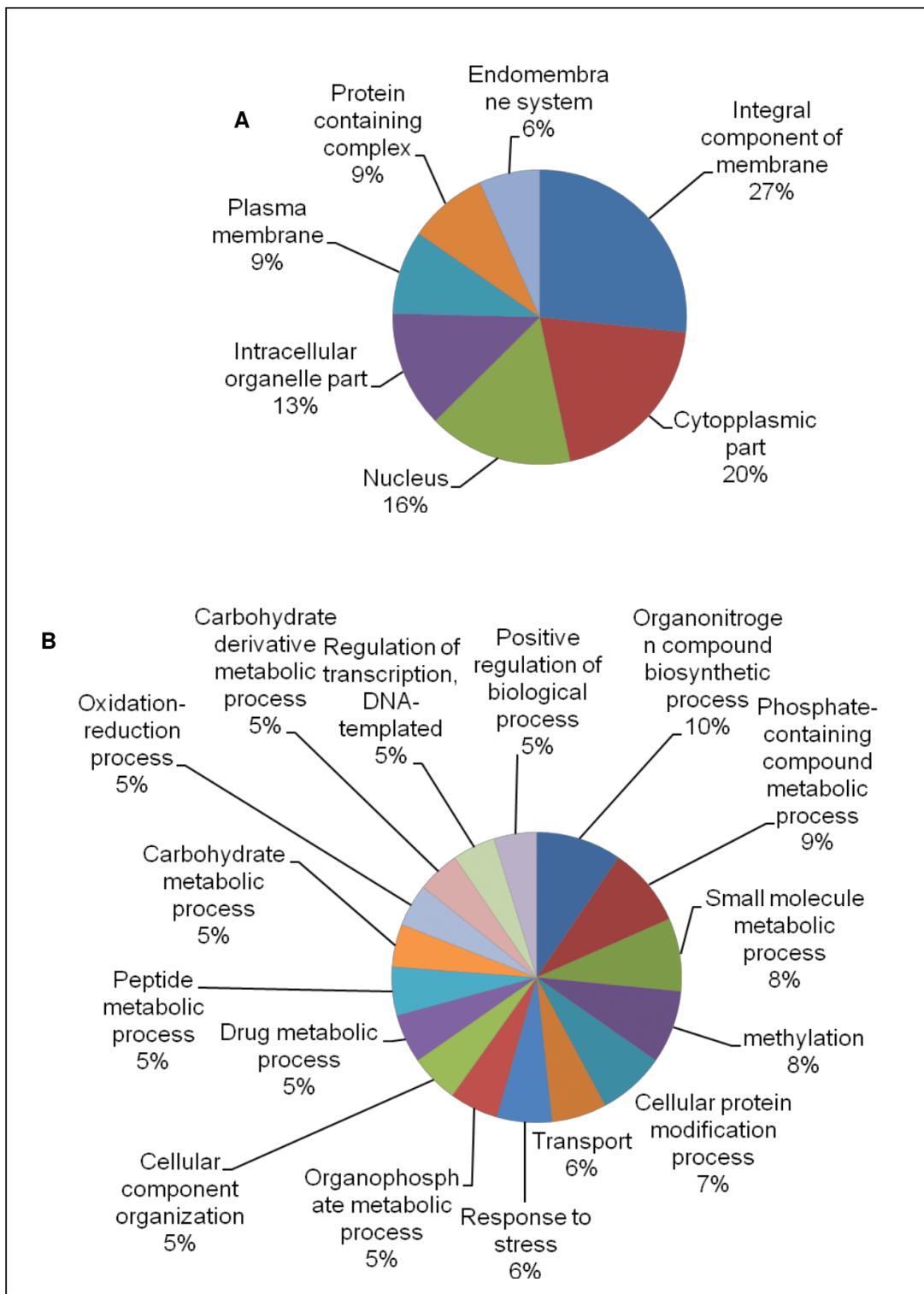


Figure 4: Functional annotation of differently expressed genes based on Gene Ontology (GO) classification. Pie chart representing (A) up-regulated genes corresponding to Cellular components and (B) down-regulated genes corresponding to Biological process in maize seedlings inoculated with *H. seropedicae* strain HRC54 after five days.

Functional classification of gene products from 203 DEGs are shown in Figure 5. All the modulated genes classified according to MapMan and Blast2Go are presented in the table 5.

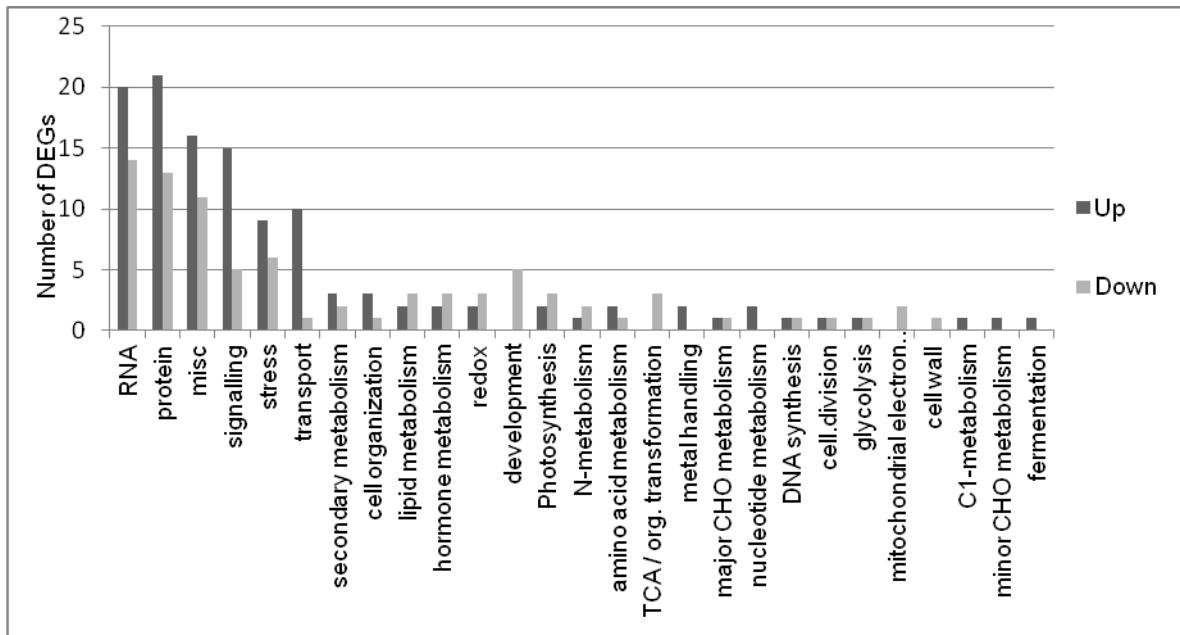


Figure 5: Classification of the metabolic pathways of DEGs according to Mapman analysis.

3.3.1 Signaling

Expression of DEGs encoding signaling was mapped in the two tools. The genes encoding *L-type Lectin-domain containing receptor kinases* was up-regulated 1.10, 1.52, 1.59 and 2.10-fold-change and five *receptors leucine rich repeat (LRR)* were up-regulated 1.19, 1.40, 1.42, 1.91 and 1.42-fold-change respectively.

The expression of two *mitogen-activated protein kinases2 (MAPK)* were up-regulated 1.24 and 1.56-fold-change, and one other *MAPK17* was down-regulated-1.04 fold-change. The *calcium/calmodulin protein kinase (CAMK)* appears differently expressed, where was repressed -4.00 and -1.48-fold-change and two induced 1.37 and 2.58-fold-change.

3.3.2 Phytormones

Some genes involved in metabolism of growth-regulating phytormones were modulated by the inoculation of *H. seropedicae*. Two genes encoding *indol-3-acetaldehyde oxidases* and *Auxin responsive protein IAA10* were up-regulated 1.53, 1.67, 2.54-fold-change, the small auxin up-regulated RNA (*SAUR*)-like auxin-responsive protein was up-regulated 8.30 fold-change and the gene *Auxin induced*

regulated responsive was down-regulated -2.93 fold-change. Gene encoding the *ethylene-responsive transcription factor 1-like* were up regulated 1.78-fold-change.

3.3.3 Photosynthesis

Some genes related with photosynthesis was induced positively and negatively by the inoculation of *H. seropedicae*. The *Light-harvesting complex-like protein OHP1, chloroplastic* was up-regulated 2.21 change folds.

The *Glycolate oxidase 1 (Gox1)* was down-regulated -2.37-fold-change. Genes related to the metabolism of carbohydrates was differently expressed by the colonization of *H. seropedicae*, the *fructose-1,6-biphosphatase (FBPase)* gene related to the Calvin Cycle was down-regulated -1.37-fold-change and the *sucrose synthase (SS)* was up-regulated 1.27 fold-change.

3.3.4 Cell wall and cellular division

The cell wall gene, *Fasciclin-like arabinogalactan (AGP) protein 7* and the gene *Cell division control protein 48* was found down-regulated -1.34 and -1.87-fold-change by the inoculation respectively. The gene *Cell number regulator 10 (CNR10)* and *DCD* (development and cell death) domains protein were up-regulated 1.88 and 1.64-fold-changes respectively.

Some genes responsible to biosynthesis of membrane lipids were up-regulated, *Acyl-CoA binding protein* 2.64 and *beta-ketoacyl-Coa synthase (KCS)* 1.89 fold-change.

3.3.5 Transporters

The inoculation with *H. seropedicae* modulated a range of genes of transporters. These genes encoding transporters were up-regulated, two *phosphate transporters* (2.19 and 29.5 fold-change), a *sulphate transporter* 1.2 (2.52 fold-change), *ABC transporter F family member 3* and *ABC transporter B family member 14* (2.22 and 1.52 changes -fold), *probable folate-biopterin transporter 2* (1.80 fold-change) and a *protein transporter* (2.47-fold-change), while were down-regulated the genes *Oligopeptide transporter 9* (-1.39-fold-change) and *Bidirectional sugar transporter SWEET4* (-1.67-fold-change).

Table 5: Maize genes modulated in response to inoculation with *H. seropedicae* strain HRC54, which may be involved in the observed effect of increased plant development. * Gene/product name description according to Mapman and Blast2Go.

GenelD	Gene/product description*	Fold-change	P-value
Cell wall and cell division			
GRMZM2G119755	Cell number regulator 10	1,88	0,0019
GRMZM2G475360	Cell division control protein 48 homolog C	-1,87	2,00E-27
GRMZM5G893913	DCD (Development and Cell Death) domain protein	1,64	6,5E-14
GRMZM2G001514	Cell wall.cell wall proteins.AGPs (Arabinogalactan Proteins)	-1,34	0,0011
GRMZM2G053803	Lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.acyl-CoA binding protein	2,64	1E-25
GRMZM2G022558	Lipid metabolism fatty acid (FA) synthesis and FA elongation.beta ketoacyl CoA synthase	1,89	4E-10
Phytohormones metabolism			
GRMZM2G142768	Auxin-responsive protein IAA10 isoform X1	2,54	4,5E-12
GRMZM2G003762	Hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-2,93	9,8E-09
GRMZM5G899851	Indole-3-acetaldehyde oxidase	1,67	3,8E-06
GRMZM2G141473	Indole-3-acetaldehyde oxidase	1,52	4,6E-07
GRMZM2G330012	SAUR-like auxin-responsive protein family	8,3	3,20E-03
Photosynthesis			
GRMZM2G095287	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic	-1,33	2,4E-08
GRMZM2G012324	Light-harvesting complex-like protein OHP1, chloroplastic	2,21	3E-09
GRMZM2G129246	PS.photorespiration.glycolate oxydase	-2,37	1,7E-17
GRMZM2G045171	Sucrose synthase 6	1,27	0,0007
Signallization			
GRMZM2G428096	Calcium-transporting ATPase 4, endoplasmic reticulum-type	2,58	1,5E-10

GRMZM2G400720	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1	2,1	8,6E-06
GRMZM2G341304	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1	1,52	0,0005
GRMZM2G400694	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.2	1,59	2E-05
GRMZM2G327999	Signalling.calci	1,37	1,7E-07
GRMZM2G055499	Signalling.MAP kinases	1,24	0,00042
GRMZM2G400470	Signalling.MAP kinases	1,56	0,00327
GRMZM2G176206	Signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XI	1,19	0,00306
GRMZM2G428554	Signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XI	1,4	2,5E-05
GRMZM2G421680	Signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XI	1,912	9E-09
GRMZM2G461278	Signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XIII	1,422	4,1E-07
Transporters			
GRMZM2G030347	ABC transporter F family member 3	2,22	7,1E-09
GRMZM2G135568	Protein transporter	2,47	2,6E-08
GRMZM2G333183	Transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	1,15	4,1E-07
GRMZM2G157102	Transport.misc	1,8	2,1E-05
GRMZM2G176282	Transport.phosphate	2,19	5,5E-17
GRMZM2G159632	Transport.sulphate	2,52	4E-27

3.4 Transcriptome validation by RT-qPCR

To evaluate and understand the growth stimulatory effect promoted by the inoculation, genes up-regulated related to the uptake of nutrients and phytohormone crosstalk (*PHTP9* and *GARP6*), and genes down-regulated related to heavy metal detoxification and dehydration (*HMTD* and *ERD4*) were selected to validation through RT-qPCR analyses.

The internal control genes for α - and β -tubulin presented constant transcription levels between the control and inoculated samples according to $2^{-\Delta\Delta CT}$. The genes *PHTP9* and *GAST* presented 29.5 and 5.1-fold-change between inoculated and control samples. According to results of the RT-qPCR analysis, these genes kept the same up-regulated pattern with 2.4 and 3.39-fold-change, respectively (Fig. 6).

The *HMTD* and *ERD4* genes were down-regulated in response to the inoculation, with -1.59 and -7.48-fold-changes, respectively, according to results of the transcriptomic analysis. Results of the validation analysis through RT-qPCR showed lower fold-changes of gene expression to these genes than transcriptome analysis results did (-0.4 and -0.38, respectively) (Figure 6).

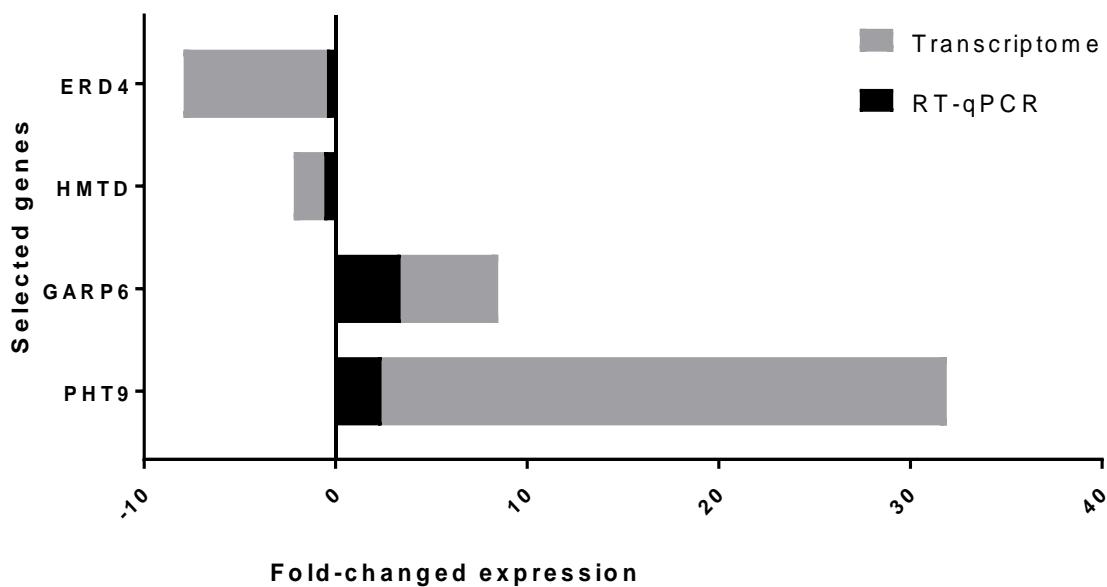


Figure 6: Validation of the gene expression of the selected genes by RT-qPCR. ERD4= Early responsive to dehydration protein; HMTD= Heavy metal transport detoxification; GARP6= Gibberelin regulated protein 6; PHT9= Phosphate transporter protein 9.

4 - DISCUSSION

The inoculation with *H. seropedicae* modulated the genic expression optimizing the promotion of phenomena as cellular expansion and division, phosphate input, increase of the capacity of photoprotection and increase of growth of the roots and shoots.

The results presented here show up-regulation of *CAMKs* (calmodulin kinase) expression in response to the inoculation of *H. seropedicae* HRC54; therefore, these proteins seem to play an important role in the signalization of the presence of plant-growth promoting rhizobacteria for root growth.

Plants can recognize cytoplasmatic Ca^{2+} alterations as a signal in response to different stresses. *CAMKs* controls the levels of Ca^{2+} , have many isoforms, and can be differently expressed in responses to cold, heat shock, light, touch stimulation, hormones such as auxin and oxidative stresses, some isoforms being specific to biotic stresses such as salicylic acid mediated defense (KNIGHT and KNIGHT, 2001).

Yang and Poovaiah (2003) suggested that *CAMKs* interacting with Ca^{2+} (*CCaMK*) expression is observed in root-tip as well as in tapetal and pollen mother cells during the microsporogenesis, playing a role in mitosis and meiosis.

Ribaudo et al. (2017) demonstrated that inoculation with the plant growth-promoter rhizobacterium *Azospirillum brasiliense* in rice seedlings increased the number of lateral roots and the activity of calcium dependent protein kinases (CDPK). Results of biochemical assays with suppressor (W-7) of calmodulin (CaM) in rice roots demonstrated a reduction in the activity of CDPKs, and a dose dependent decrease of development of lateral roots, or a disappearance of the root system.

Similar results of *CAMKs* (expression has been seen during the biostimulation by *Sinorhizobium meliloti* 1021 inoculated in rice (WU et al. 2018). Yang e Poovaiah (2000) suggested that the expression of *CAMKs* can be modulated by auxin, and this can be associated with the inoculation of bacteria that produce this phytohormone.

The arabinogalactan proteins (AGPs) genes encode for glycoproteins of the cell wall, which are involved in protein-protein interactions and are implicated in many processes in growth and development. AGPs expression can be developmentally regulated in plant roots during the cell development (NGUEMA-ONA et al., 2012).

AGPs can be down regulated in the presence of growth regulators to stimulate cell division, or modulate receptor sensitivity (SEIFERT, ROBERTS, 2007).

The CNR genes are involved in plant growth and organ sizing through regulation of cell division and expansion. GUO et al (2010) showed that diverse CNRs are expressed along the maize plants and the CNR10 is expressed in the roots and leaves. Genes encoding the DCD domain mediate signals in processes of the plant development and programmed cell death usually being upregulated when these processes are activated (TENHAKEN et al., 2005). Up-regulation of these two genes in the maize seedlings inoculated with *H. seropedicae* implies modulation of seedlings growth, resulting in the biostimulation effects seen in the present work.

These above data indicate that the biostimulation effect of inoculation with *H. seropedicae* is linked to modulation of the expression plasmatic membrane constituents required for cell expansion and/or division.

The increase of phosphate transporters maybe could be related with colonization of *H. seropedicae* in the roots. This result is interesting since phosphate plays an important role in the development of plants and *H. seropedicae* can promote the solubilization of inorganic phosphate in soil (ESTRADA et al., 2013), increasing the uptake of this nutrient for plants.

Up-regulated and validated (through RT-qPCR) transcript, the phosphate transporter protein 9 has homology with the *Oryza sativa Phosphate Transporter 1, 2 and 3* (*OsPT1, 2 and 3*) and *Eleusine coracana Phosphate transporter 1 and 2* (*EcPT1 and 2*) (PUDAKE et al., 2017). In rice, *OsPT1* is highly induced by Pi starvation (SEO et al., 2008), while in roots and leaves of *Eleusine coracana* the *EcPT1* was induced fivefold higher after 6 days of growth under phosphate starvation, and the same gene was up-regulated when the plant was colonized by arbuscular mycorrhiza (PUDAKE et al., 2017).

Were obtained an early growth biostimulation in terms of fresh and dry weights of roots and shoots through the inoculation with *H. seropedicae* strain HRC54. This effect of biostimulation can be associated with the production of phytohormones such as auxin and gibberellins produced by *H. seropedicae*, as described by Bastian and collaborators (1998). Amaral et al., (2014) presented results of biostimulation in terms of numbers of lateral roots in maize seedlings after 7 and 10 DAI. Radwan et al., (2004) obtained results of biostimulation in wheat and rice seedlings, in terms of

superficial root area, and shoot and root length, through the production of Indole-3-acetic acid (IAA) by *Herbaspirillum spp.*

Promising results with *Herbaspirillum seropedicae* have been described since when it has been discovered. Perin et al (2003) showed that inoculation with *H. seropedicae* biostimulated the increase of root and shoot fresh weights from maize seedlings six DAI. In other experiments the inoculation with *H. seropedicae* exerted the biostimulation of growth of maize root area when combined with humic substances after 7 DAI (CANELAS et al., 2012).

The number of cells of *H. seropedicae* HRC54 found was higher in inoculated than uninoculated roots (10^6 to 10^2). The presence of *H. seropedicae* HRC54 in the maize roots five DAI shows the capacity of this microorganism to colonize the plant inner tissues. These results corroborate with the counts of *H. seropedicae* strain SmR1 inoculated in maize plants by Pereira et al. (2014). An explanation for this amount of cells in uninoculated plants could be the natural microbiome of the seeds that carry a few cells of *Herbaspirillum spp.* inside, and this number of cells can grow under some specific conditions.

The presence of IAA in plants triggers restarting of the cell cycle in the pericycle, establishing the lateral roots mitotic sites (CASIMIRO et al., 2001). The emergence of lateral roots can promote the endophytic colonization of *H. seropedicae* into the xylem vessels as has been demonstrated by Olivares et al. (1997), and James and Olivares (1998). This correlates with the results of cell quantification of *H. seropedicae* established in the roots from the inoculated plants, confirming the results of their growth promotion.

Plants can recognize microorganisms via flagellins (*FLS2*), through receptors like kinases (*RLK*) that consist of an extracellular LRR and intracellular serine/threonine kinase domains (CHISHOLM et al., 2006). In accordance to this, in the present work *H. seropedicae* inoculation modulated the expression of five genes encoding LRRs in the roots of maize seedlings after five days of inoculation.

Results with *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* inoculated in sugarcane showed Expressed Sequence Tags (ESTs) encoding proteins containing LRRs/kinases domain exclusively expressed in inoculated plants (NOGUEIRA et al., 2001). Similar results were shown by Wu and

colleagues (2018) in rice inoculated the growth promoting *Sinorhizobium meliloti*, and Leandro (2016) with *Arabidopsis* inoculated with *H. seropedicae*.

This may indicate that in addition to recognizing the presence of *H. seropedicae* colonization, plants are able to express receptors to prepare them for possible biotic stresses after having sensed the *Herbaspirillum* presence.

The growth-promotion effect in plants by beneficial bacteria is known as phytostimulation, and a crosstalk between plant and bacteria that involves auxin has been demonstrated (SPAEPEN, VANDERLEYDEN 2011). The results presented here shows that four Indol-3-acetaldehyde oxidases (*IAA/d*) were up-regulated in the roots colonized by *H. seropedicae*. These gene products participate in the final conversion of indole-3-acetaldehyde to Indole-3-acetic acid (SPAEPEN, VANDERLEYDEN 2011).

Brusamarello-Santos et al. (2012) demonstrated that the auxin responsive factor 2-like gene (ARF2-like), IAA18-like and IAA11-like are repressed in response to the inoculation of *H. seropedicae* in rice suggesting that regulation of specific auxin-related genes are important for effective plant colonization by non pathogenic organisms.

The SAURs are a group of early auxin-response genes in plants encoding short transcripts that accumulate rapidly and specifically when treated with auxin. CAMKs can bind to SAURs transcripts modulating cell functions such as cell elongation (YANG and POOVAIAH, 2000).

The auxin exerts its effects on meristematic zones of tissues that is active in cell division and presents accelerated growth (TAIZ et al., 2017). These results can explain the effects of biostimulation of inoculation of *H. seropedicae* promoting the development of the roots and shoots, increasing the nutrient uptake.

Inoculation of *Herbaspirillum* induces an increase in the expression of the light-harvesting complex-like protein *OHP1*, chloroplastic gene. This encodes a protein that binds to the membrane of the thylakoid with protective function to light stress (JANSSON et al., 2000), this can indicate that inoculation can increase the photoprotection, allowing a better use of the light.

The *FBPase* plays a important role in the metabolism of carbohydrate, converting fructose-1,6-biphosphate into fructose-6-phosphate to synthesize starch in the chloroplast, and sucrose in the cytosol. *FBPase* is involved in the sucrose

synthesis and gluconeogenesis. The chloroplastidial isoforms (*cFBP1* and *cFBP2*) play a role in the Calvin-Benson (photorespiration) pathway and is involved in the regeneration of ribulose-1,5-biphosphate (*RuBP*) in the starch synthesis pathway (ROJAS-GONZÁLES et al., 2015).

By understanding these routes, it can propose that the Calvin-Benson cycle is suppressed to attend sucrose production in the cytosol, thus providing more energy for the seedlings.

The gene *Gibberellin regulated protein 6* (GARP6) is a homolog from the *Gibberellin Stimulated Transcript 1*, first identified in tomato. This transcript is upregulated by external application of GA in *Arabidopsis*, repressed by ABA and has an important role in biological processes such as cell elongation, expansion, and division, and defense to pathogens (QU et al., 2016).

Amaral et al. (2014) showed that *H. seropedicae* SmR1 inoculated in maize seedlings (DKB240 variety) lead to an increase of the transcript *ent-kaurene oxidase* (*Zmko1*), involved in the gibberellin pathway, after 4 DAI, but after 7 and 10 DAI no significant differences were seen, suggesting an early response of the plant to colonization.

In this work, GARP6 was upregulated in the maize seedlings inoculated with *H. seropedicae* 5 DAI; however, after observing the results from Mapman and Blast2Go analysis, no genes of the gibberellin biosynthesis pathway were transcriptionally regulated. Thus, this transcript could be differently expressed in response to the exogenous production by *H. seropedicae*, as described by Bottini et al (2004), or this could be a variety-specific response.

5 - CONCLUSION

The association of *Herbaspirillum seropedicae* strain HRC54 in maize roots can promote plant growth through the action of phytohormones produced by the bacteria, inducing changes in cell division and expansion.

The colonization by *H. seropedicae* can induce the biosynthesis of proteins on the plasmatic membrane of the roots, such as those of defense receptors preventing the plants of attacks of other organisms, and transporters, increasing the nutrient uptake.

It seems that the interaction with *Herbaspirillum* modulates the energy production in the plant, which can be explained by the fact that the promoted growth requires more energy.

These results may help to elucidate how *Herbaspirillum seropedicae* promotes plant growth and serves as the basis for further research contributing to the consolidation of the use of this bacterium in bioinoculants.

Acknowledgments

This present study was financially supported by Newton Foundation, CAPES and FAPERJ.

REFERENCES

- ALVES, G. C. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- AMARAL, F. P., et al. Gene expression of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promote bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Symbiosis**. v. 62, p.41-50, 2014.
- BALDANI, J. I., et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986.
- BASTIÁN, F., et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, n.24, p.7–11, 1998.
- BOTTINI, R., CASSAN, F., PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology Biotechnology**. n. 65, p.497–503, 2004.
- BRUSSAMELO-SANTOS, L. C. C., et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant soil**, v.356, p.113-125, 2012.
- CANELLAS, L. P., et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil**. v.366 p.119-132, 2013.
- CASIMIRO, I., et al. Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. **The Plant Cell**, V.13, p.843–852, 2001.
- CHISHOLM, S. T., et al. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. **Cell**. v.124, p.803-814, 2006.
- COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**. v.407, n.6802, p.321-326, 2000.
- DOBBELAERE. S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, n.22, p.107–149, 2003.
- DÖBEREINER, J.; et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI: Seropédica: Embrapa- CNPAB, 1995. 60 p.

ESTRADA, G. A., et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant Soil.** n.369, p.115–129, 2013.

GÖTZ S., et al. "High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite", **Nucleic Acids Research.** v.36, p. 3420-3435, 2008.

GYANESHWAR, P., et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil,** v. 245, n. 1, p. 83-93, 2002.

GUO, M., et al. Cell Number Regulator1 Affects Plant and Organ Size in Maize: Implications for Crop Yield Enhancement and Heterosis. **The Plant Cell,** v. 22, p.1057–1073, 2010.

JAMES, E. K., OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Science.** n. 17, p. 77–119, 1998.

JANSSON, S., et al. An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins. **Plant Mol Biol.** v.42, n.2, p.345-351, 2000.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M, R. Abiotic stresses signalling pathways: specificity and cros-talk. **Trends in Plant Science.** v.6, n.6, p.262-267, 2001.

LAMBRECHT, M., et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. **Trends Microbiology.** n.8 p.298–300, 2000.

LEANDRO, M. R. **Colonização endofítica de *Arabdopsis thaliana* por *Herbaspirillum seropedicae* e seus efeitos na promoção do crescimento vegetal e na regulação diferencial de proteínas.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2016.

LIN, Y., et al. Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. **Plos One,** v.9, n.5, p.1-11, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods.** n.4, p.402-408, 2001.

MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu Rev Genomics Hum Genet.** v. 9, p. 387–402, 2008a.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet,** v.24, p. 133–141, 2008b.

NGUENA-ONA, E., et al. Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. **Annals of Botany.** v.110, p.383-404, 2012.

NOGUEIRA, E. M., et al. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.199-206, 2001.

OLIVARES, F. L., et al. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**. n. 135, p.723–737, 1997.

OLIVARES, F. L., et al. Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. **Chemical and biological technologies in agriculture**, v.4, p.1-13, 2017.

OLIVEIRA, A. L. M., et al. The effect of inoculating endophytic N₂ –fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and soil**. n. 242, p.205-215, 2002.

OLIVEROS, J.C. (2007-2015) **Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.** <http://bioinfoqb.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

PERIN, L., et al. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* E *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v.37, n. 2, p 47-53, 2003.

PEREIRA, T. P., et al. Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropediae* strain SmR1 in maize roots. **Molecular Biotechnology**. v.56, n.7, p.660-670, 2014.

PUDAKE, N. R., et al. Expression of four phosphate transporter genes from Finger millet (*Eleusine coracana* L.) in response to mycorrhizal colonization and Pi stress. **3 Biotech**, v.7, n.17, p.1-13, 2017.

QU, J., et al. Molecular and cellular characterization of GA-Stimulated Transcripts GASA4 and GASA6 in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**. v.246, p.1-10. 2016.

RADWAN, T. EL-S. EL-D., et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.**, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

RIBAUDO, C. M., et al. Activation of a calcium-dependent protein kinase involved in the *Azospirillum* growth promotion in rice. **World J Microbiol Biotechnol**. v.33, n.:22, p.1-9, 2017.

ROBINSON, M. D., et al. “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data” **Bioinformatics** v.26, n.1, p.139-140. 2009

RODRIGUES NETO, J., MALAVOLTA JR., V. A., VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 2, p.16, 1986.

ROJA-GONZALES, J. A., et al. Disruption of both chloroplastic and cytosolic *FBPase* genes results in a dwarf phenotype and important starch and metabolite changes in

Arabidopsis thaliana. **Journal of Experimental Botany**, v.66, n.9 p.2673–2689, 2015.

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

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters** n.278, p.1–9, 2008.

SEIFERT, G. J.; ROBERTS, K. The Biology of Arabinogalactan Proteins. **Annu. Rev. Plant Biol.** v.58, p.137–161, 2007.

SEO, H., et al. Increased expression of OsPT1, a high-affinity phosphate transporter, enhances phosphate acquisition in rice. **Biotechnol Lett.** v.30, p.1833–1838, 2008.

SPEAPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v.3, n.4, p.1-14, 2011.

TAIZ, L., et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6 ed, Porto Alegre, Artmed, 2017.

TENHAKEN, R.; DOERKS, T.; BORK, P. DCD – a novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. **BMC Bioinformatics**, v.6, p.1-6, 2005.

TRAPNELL, C., et al. Differential Gene and Transcript Expression Analysis of RNA-Seq Experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**, n. 7, v.3, p. 562–578, 2012.

WEBER, O. B.; FREIRE, F. C. O. Contribuição de bactérias diazotróficas na cultura da bananeira: perspectivas de utilização na produção integrada. **Embrapa**. n.16, 29p. 2003.

WINGETT, S. W.; SIMON A. “FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control”. **F1000Research**. v.7, n.1338, p.1-13, 2018.

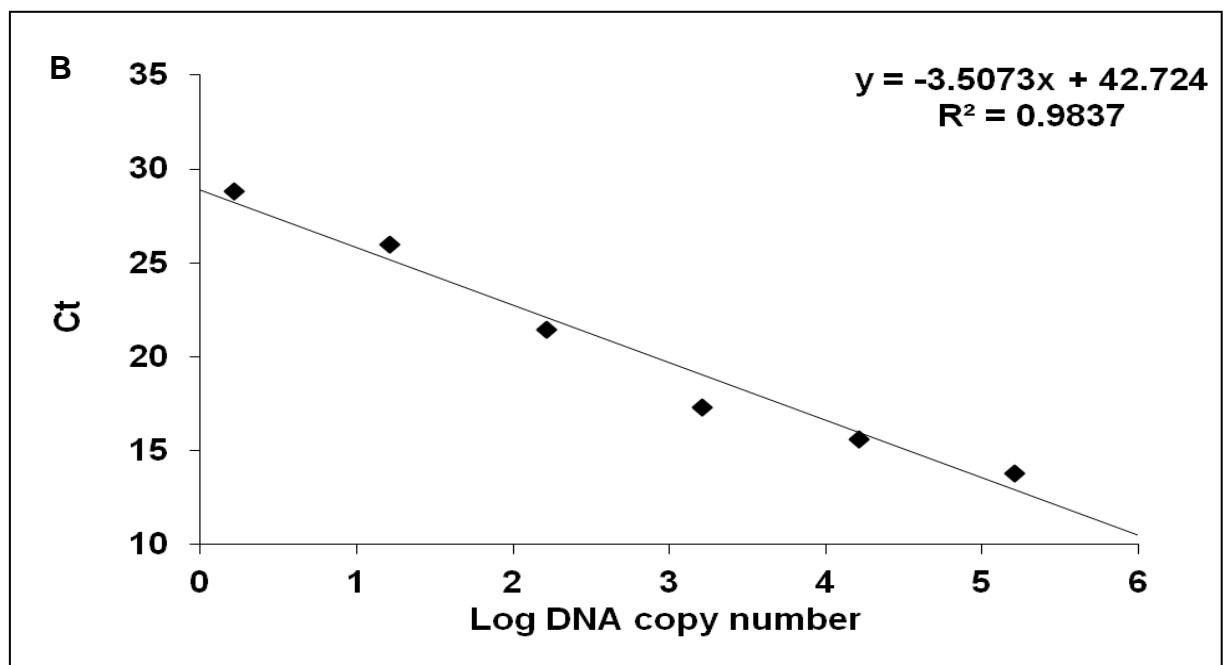
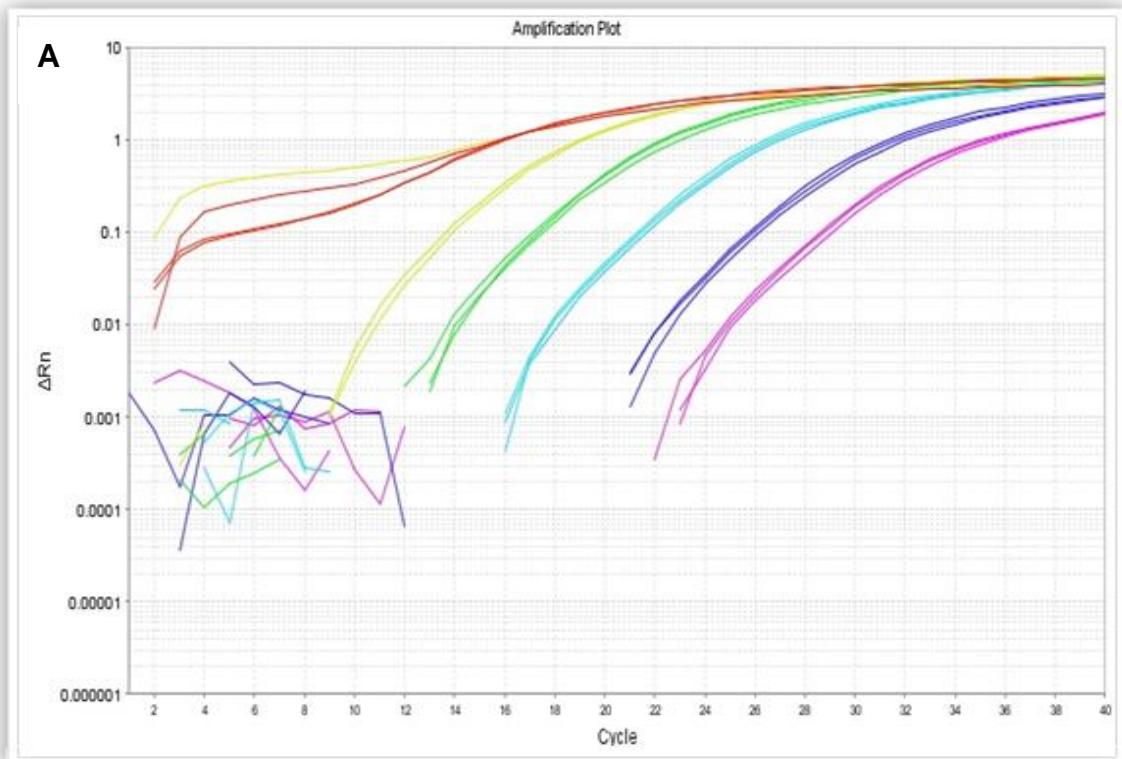
WU, Q., et al. Rhizobia promote the growth of rice shoots by targeting cell signaling, division and expansion. **Plant Molecular Biology**. v. 97, n. 6, p. 507-523, 2018.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Molecular and Biochemical Evidence for the Involvement of Calcium/Calmmodulin in Auxin Action. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. v.275, n.5, p.3137–3143, 2000.

YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. **Trends in Plant Science**. v.8, n.10, 2003.

SUPPLEMENTARY

Figure S1: (A) Construction of standard curve of *Herbaspirillum seropedicae* DNA by qPCR. (B) Standard curve of *Herbaspirillum seropedicae* DNA dilutions versus C_T average. (C) Amplification of the *Herbaspirillum seropedicae* DNA in the maize roots uninoculated. (D) Amplification of the *Herbaspirillum seropedicae* DNA in the maize roots uninoculated Three replicates were used for the dilutions.



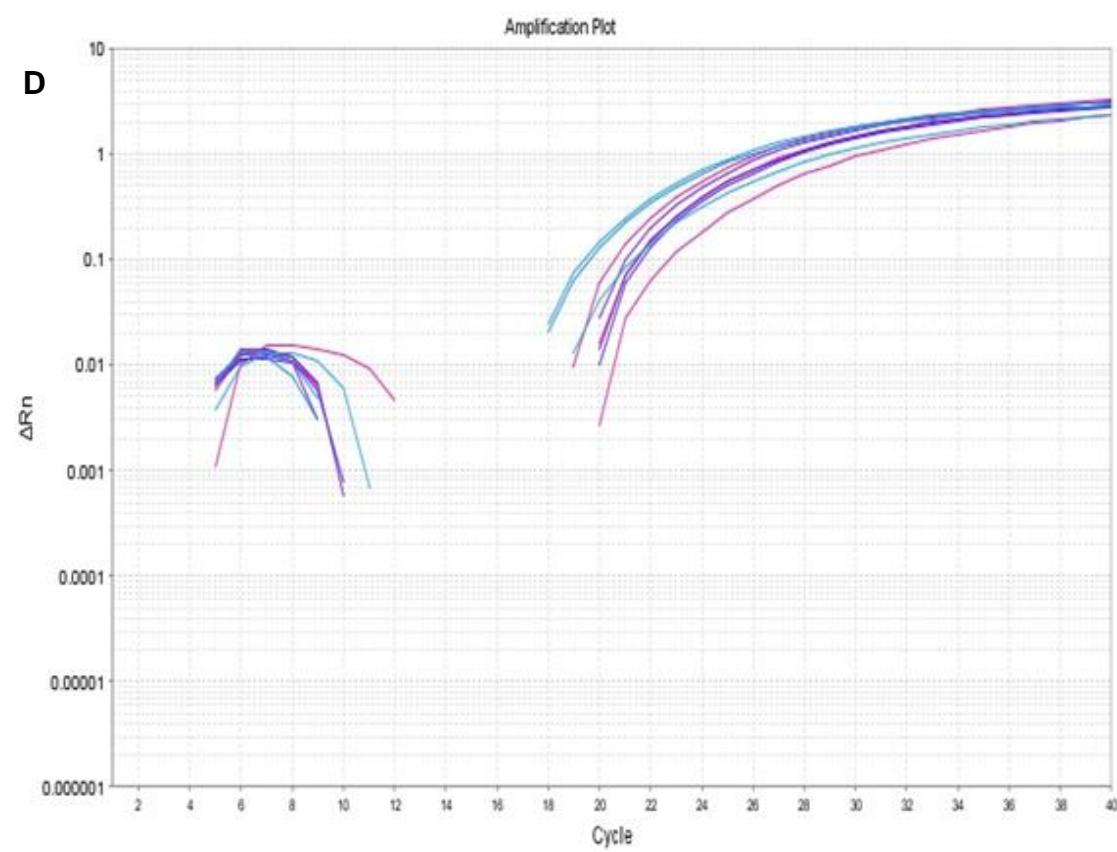
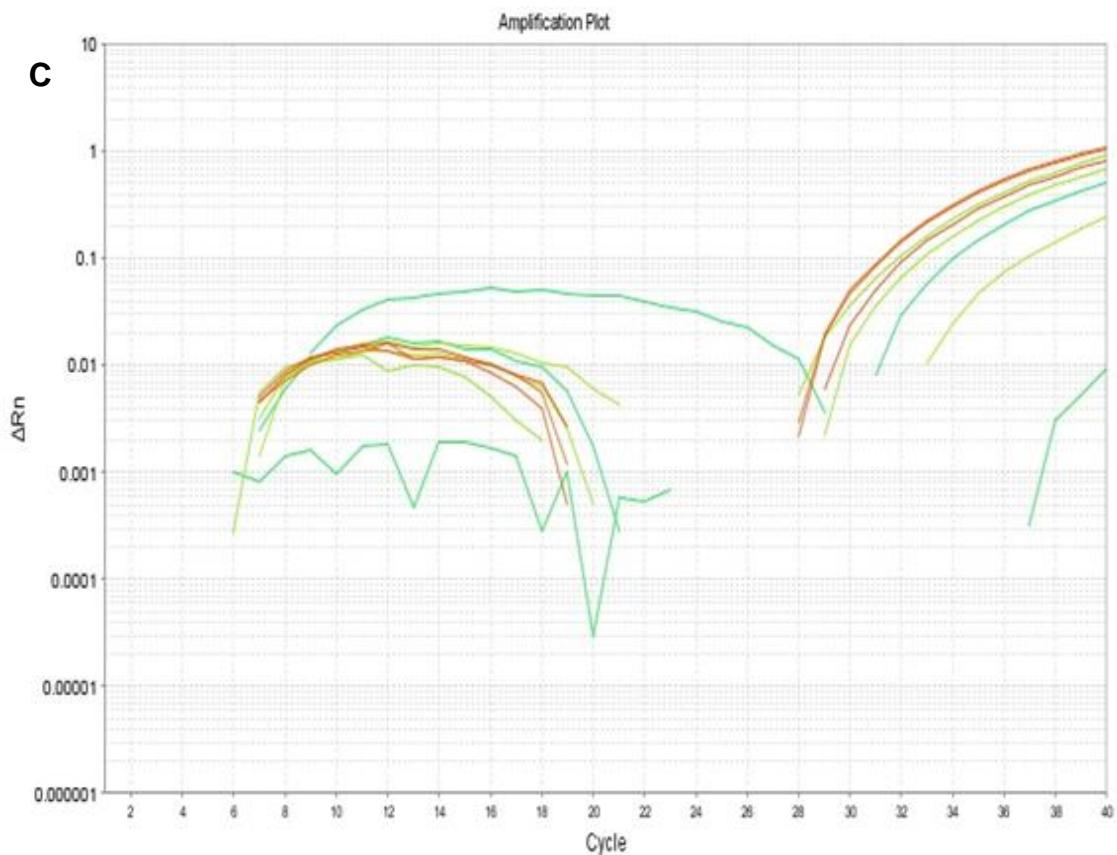


Figure S2: Functional annotation of differently expressed genes based on Gene Ontology (GO) classification. Pie chart representing **(A)** up-regulated genes corresponding Molecular Function and **(B)** up-regulated genes corresponding Biological process in maize seedlings inoculated with *H. seropedicae* strain HRC54 after five days.

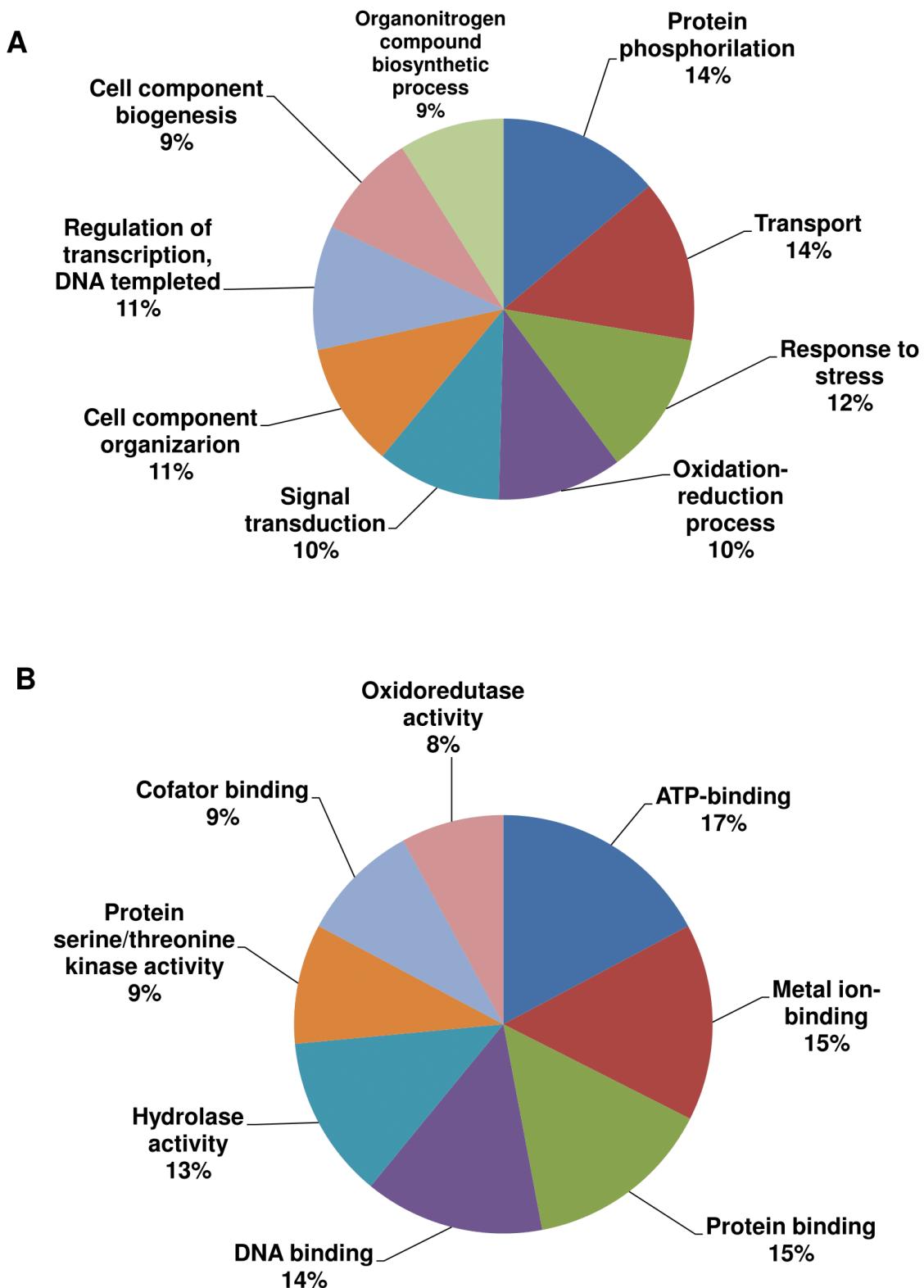


Figure S3: Functional annotation of differently expressed genes based on Gene Ontology (GO) classification. Pie chart representing **(A)** down-regulated genes corresponding Molecular Function and **(B)** down-regulated genes corresponding Cellular Components in maize seedlings inoculated with *H. seropedicae* strain HRC54 after five days.

