

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Metodologias para análise de experimentos de Dual RNA-seq: aplicação da melhor estratégia no estudo das interações entre *Azospirillum brasilense* e milho durante a inibição da produção de Ácido Indol-3-Acético pela planta

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Eliandro Espindula

Orientadora: Profa. Dra. Luciane M. P. Passaglia

Porto Alegre, agosto de 2019

Este trabalho foi desenvolvido nas Universidades Federais do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Paraná (UFPR), com financiamento da CAPES, CNPq/INCT-FBN e Fundo Newton (Brasil/Reino Unido).

Dedico este trabalho a Deus, que sempre guiou e iluminou meus passos, ao me mostrar sempre quais os melhores caminhos a seguir. Ele me segurou em seus braços quando fraquejei no caminho e sempre, quando eu mais precisei de apoio, veio em meu socorro, através de anjos maravilhosos que a gente por aqui chama de amigos.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus, por me manter sempre no caminho certo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me proporcionar a estrutura física e logística que me permitiram desenvolver este trabalho.

À minha orientadora, Luciane M. P. Passaglia, que além de minha orientadora, foi também minha conselheira, me trazendo de volta para o caminho quando eu parecia perder o foco. Me mostrando qual melhor direção quando tantas se fizeram presentes no curso dessa pesquisa. Me trazendo paz quando as coisas pareciam não dar certo, me lembrando que em ciência é assim, é tentativa e erro, até a gente conseguir fazer certo para conseguir produzir o ambiente científico certo para a investigação que pretendemos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, por proporcionar a oportunidade de poder participar do curso de doutorado oferecido por este órgão e, assim, me conceder a chance de ter acesso a todo o conhecimento disponível neste por meio dos renomados professores que fazem parte deste programa.

À CAPES, ao INCT/FBN e ao Fundo Newton por proporcionarem os recursos necessários para a execução deste trabalho.

Aos meus pais, pelo Amor a mim dedicado e pela lição de vida de que somente com trabalho, dedicação e fé nós podemos alcançar nossos objetivos na vida.

Aos meus pais, Alberi Espindula e Leda Maria Espindula, meu irmão, Heitor Espindula, à tia Noécia Espindula Bressan, ao tio Valter Bressan, à Tia Nera Espindula Cerva, ao tio Manoel (Maneco) Cerva, à tia Nelza (Dinda) Espindula Schieck e aos primos, frutos dessas uniões, por todo Amor e por me ensinarem o que significa ser uma família.

Aos amigos que sempre me apoiaram nos bons e maus momentos, me aconselhando e mostrando os caminhos em noites escuras e mal iluminadas.

À amiga, hoje ausente, Edilena Reis Sperb, que não foi somente uma parceira de trabalho, foi muito mais. Foi amiga daquelas que a gente sente falta, foi daquelas que olha no teu olho e te diz o que tu precisas ouvir, não o que você quer ouvir. Foi amiga parceira nas “indiadas”, como a gente diz aqui no RS. Foi a parceira daqueles dias que a gente somente quer ficar sentado, olhando para o longe sem dizer uma palavra, eu na minha cerveja e você na tua eterna Gin Tônica. Foi a parceira de trabalho, pois metade do que ele é hoje eu devo à tua visão de conseguir ver nele a potencialidade que eu não via.

À amiga Jacque(line) Barcelos pela incomparável e impagável paciência, amor e carinho. Tu és daquelas amigas que a gente conta nos dedos, que leva para a vida. Tu foste e ainda és um farol para mim, pois és dona de uma sabedoria e de uma visão de vida incríveis, que, apesar das dificuldades da vida, sempre consegue ver o melhor dela. Tu onde passas é luz, assim como tu és na minha. Te sou eternamente grato por tudo!

Ao amigo Rafael Rauber por todo o carinho, parceria em todos os momentos. Já defendestes e já estás a ensinar e, ainda assim, sempre encontras tempo para o amigo aqui. Seja por conselhos, seja por risadas ou aquela parceria na cerveja (onde eu tinha que convencer todo mundo que não sabia quem era tua namorada, porque vocês não queriam). Convivemos por mais ou menos um ano. Mas os laços que nos unem são aqueles de duas pessoas que parecem se conhecer de outra vida dado tamanho da cumplicidade na amizade.

Aos meus eternos mestres nas ciências e na vida. Até eu chegar aqui eles eram os prof^s Umberto Euzebio (UnB), Silviene Oliveira (UnB), Zulmira M. Lacava (UnB), Loreny Giugliano (UnB), e a pesquisadora da Embrapa Rose Gomes Monnerat Sólton de Pontes (CENARGEN) e, hoje, essa lista aumentou! Durante esses quatro anos que estive aqui, tive a honra e o prazer de conviver com as professoras Márcia Pinheiro Margis, Eliane Kaltchuk e a minha orientadora Luciane M.P. Passaglia. Assim, obrigado amados mestres que, com seu conhecimento e amizade, me ensinaram o que é ser um cientista: Pessoa que consegue, ao se deparar com o desconhecido, analisar a situação a ele posta e, por meio da experimentação e dos conhecimentos disponíveis, alcançar a explicação para a situação. Levarei sempre comigo todas as lições aprendidas até hoje e aquelas que vocês, todos os dias, continuam a me ensinar.

À vida, que me ensinou que o melhor é sempre seguir em frente, sem deixar que as pedras e buracos da estrada atrapalhem nossa caminhada e que, acima de tudo, devemos aprender com nossos acertos e, principalmente, com nossos erros.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

Índice

Abreviaturas:	8
Resumo	9
Abstract	10
1. Revisão bibliográfica.....	11
1.1. O Milho (<i>Zea mays</i>).....	11
1.2. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (PGPB):.....	12
1.3. <i>Azospirillum</i> spp.:	14
1.4. Auxinas.....	17
1.5. Transcritoma e o sequenciamento do RNA (RNA-seq):.....	21
2. Objetivo Geral	25
2.1. Objetivos Específicos	25
3. Material, Métodos e Resultados:	25
4. Artigo 1: The combined analysis as the best strategy for Dual RNA-Seq mapping.....	26
5. Artigo 2: The genetic interaction between <i>Azospirillum brasilense</i> and maize during the inhibition of indole-3-acetic acid production by the plant	77
6. Análise Complementar	78
7. Discussão	124
8. Tabelas suplementares.....	130
9. Referências Bibliográficas.....	139

Abreviaturas:

AIA/IAA = *Ácido Indol – 3 – Acético / Indole – 3 – Acetic Acid*

AIP / IPA = *Ácido Indol – 3 – Piruvato / Indole – 3 – Pyruvate*

ABA = *Abscysic Acid* (Ácido Abscísico)

DEGs = *Differentially Expressed Genes* (Genes Diferencialmente Expressos)

DNA = *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

GA = Giberelina

GO = *Gene Ontology* (Ontologia Gênica)

PGPB = *Plant-Growth Promoting Bacteria* (Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal)

RNA = *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico):

mRNA= RNA mensageiro

rRNA = RNA ribossômico

tRNA = RNA transportador

TF = *Transcription Factors* (fatores de transcrição)

Trp = Triptofano

Resumo

Uma forma de elevar a produção vegetal sem aumentar a área plantada é através do uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Entre essas bactérias estão as do gênero *Azospirillum*, encontradas na rizosfera de gramíneas e cereais, tanto em climas tropicais como em climas temperados. As principais características das bactérias desse gênero são a capacidade de fixar nitrogênio e a de produzir fitormônios, estimulando, assim, o crescimento das plantas. O presente estudo teve como objetivo melhorar a compreensão sobre a interação de *Azospirillum* e milho, em nível genético, em relação à ação do ácido indol-3-acético (AIA) nas plantas. Esse fitormônio é muito importante para o crescimento vegetal, principalmente através da estimulação da produção de raízes secundárias. Para esta finalidade, foi aplicado nas plantas o composto químico Yucasin [5-(4-chlorofenil)-4H-1,2,4-triazol-3-tiol], que é um potente inibidor de uma das enzimas da principal via de produção de AIA pelas plantas, a YUCCA. Plântulas de milho, inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* FP2, foram submetidas ao tratamento com Yucasin por 5 horas. Amostras de raízes de cada condição experimental foram utilizadas para a extração de RNA e para a construção das respectivas bibliotecas de cDNA. Uma vez que a metodologia utilizada foi de *Dual RNA-seq*, fez-se necessário o aprimoramento da forma de análise dos dados gerados após o sequenciamento das bibliotecas de cDNA, constituídas de amostras de RNA de ambos os organismos. Apesar de a maioria dos trabalhos de *Dual RNA-seq* utilizar a análise sequencial dos dados, a análise combinada, na qual se compara simultaneamente os dados, parece ser a mais indicada. Nesse tipo de análise, as bibliotecas são alinhadas contra um arquivo composto pelos genomas de ambos os organismos de forma concatenada, antes da etapa de mapeamento das sequências contra os respectivos genomas anotados. Para verificar a eficácia da metodologia combinada em relação à sequencial foram utilizadas bibliotecas de cDNAs disponíveis em bancos públicos e bibliotecas oriundas de um experimento prévio realizado em nosso laboratório. A metodologia sequencial atribuiu um número maior de sequências ao primeiro genoma utilizado (devido ao mapeamento cruzado) do que a metodologia combinada. Também, a quantidade de mapeamento cruzado foi menor na análise combinada do que na sequencial, evidenciando a importância da utilização da análise combinada em experimentos de *Dual RNA-seq*, a fim de se evitar a perda de informações, principalmente em relação ao organismo procariótico. A análise combinada foi aplicada para analisar as bibliotecas de cDNA do experimento *Azospirillum*-milho, na presença ou não de Yucasin. Com essa metodologia foi possível observar em milho genes diferencialmente expressos que codificam proteínas da via de resposta ao ácido abscísico (ABA) e fatores de transcrição envolvidos nas respostas a estresses bióticos e abióticos. Esses resultados indicam que a planta respondeu à presença da bactéria e do Yucasin. Dados fisiológicos mostraram que o AIA produzido pela bactéria foi suficiente para recuperar o fenótipo das plantas submetidas ao tratamento com Yucasin. Com relação à bactéria, foram identificados genes diferencialmente expressos que codificam proteínas que participam do transporte transmembrana e da biossíntese de terpenoides.

Abstract

One way to increase crop yields without increasing planted area is through the use of plant growth-promoting bacteria. These include bacteria of the genus *Azospirillum* found in the grass and cereal rhizosphere in both tropical and temperate climates. The main characteristics of bacteria of this genus are the ability to fix nitrogen and to produce phytohormones, thus stimulating plant growth. The present study aimed to improve the genetic understanding of the interaction of *Azospirillum* and maize concerning the action of indole-3-acetic acid (IAA) on plants. This phytohormone is very important for plant growth, primarily through the stimulation of secondary root production. For this purpose, the chemical compound Yucasin [5-(4-chlorophenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-thiol], which is a potent inhibitor of one of the enzymes (YUCCA) of the major plant production AIA pathway, was applied to the plants. Corn seedlings, inoculated or not with *Azospirillum brasilense* FP2, were submitted to treatment with Yucasin for 5 hours. Root samples from each experimental condition were used for RNA extraction and construction of the respective cDNA libraries. Since the methodology used was Dual RNA-seq, it was necessary to improve the analysis of the data generated after the sequencing of cDNA libraries, consisting of RNA samples from both organisms. Although most Dual RNA-seq works use sequential data analysis, combined analysis, in which data are simultaneously compared, seems to be the most appropriate. In this type of analysis, libraries are aligned against a file composed of the genomes of both organisms in a concatenated manner prior to the sequence mapping step against their annotated genomes. To verify the effectiveness of the combined methodology in relation to the sequential, we used libraries of cDNAs available in public banks and libraries from a previous experiment performed in our laboratory. The sequential methodology assigned more sequences to the first genome used (due to cross-mapping) than the combined methodology. Also, the amount of cross-mapping was lower in the combined than in the sequential analysis, evidencing the importance of using the combined analysis in Dual RNA-seq experiments, in order to avoid information loss, especially about the prokaryotic organism. The combined analysis was applied to analyze the cDNA libraries of the *Azospirillum*-maize experiment, with or without Yucasin. With this methodology, it was possible to observe in maize differentially expressed genes that encode abscisic acid (ABA) response pathway proteins and transcription factors involved in responses to biotic and abiotic stresses. These results indicate that the plant responded to the presence of bacteria and Yucasin. Physiological data showed that the AIA produced by the bacterium was sufficient to recover the phenotype of plants subjected to treatment with Yucasin. For bacteria, differentially expressed genes that encode proteins that participate in transmembrane transport and terpenoid biosynthesis were identified.

1. Revisão bibliográfica

1.1. O Milho (*Zea mays*)

O milho (*Zea mays*) é uma planta originada no México e que possui variedades adaptadas a diversos ambientes terrestres, sendo uma das culturas de maior importância mundial (Fornasieri Filho, 1992). O Brasil, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2016), apresentou, em 2016, a terceira maior produção mundial de milho, atrás somente de Estados Unidos e China. O milho cultivado no Brasil é insumo para diversos produtos e seu principal uso (entre 70 e 80%) é como ração para suínos e aves (Duarte *et al.* 2015). Tal fato é importante na medida em que contribui, indiretamente, com a alimentação humana, pois, ao ser usado como alimento para suínos e aves, esse milho ingerido por estes animais auxilia na formação das reservas proteicas dos mesmos que serão, após o abate, consumidas por humanos. O milho, além de contribuir de forma indireta na alimentação humana, contribui também de forma direta ao ser consumido *in natura* ou processado.

A cultura do milho apresenta demandas nutricionais específicas para seu sucesso e para que apresente uma alta produtividade são necessários em média 104 Kg de nitrogênio por hectare (Hungria *et al.* 2010). O nitrogênio é um elemento essencial na constituição de todas as proteínas celulares. Dessa forma, a sua disponibilidade no ambiente em uma forma que possa ser prontamente absorvida e utilizada pelos seres vivos é primordial à manutenção da vida. Assim, o nitrogênio, juntamente com a água, é tido como um fator limitante de crescimento, tanto de plantas em ambientes naturais, quanto em plantas cultivadas, como o milho (*Zea mays*). Entretanto, a maior parte dos estoques de nitrogênio do solo se encontra em uma forma não disponível às plantas (inorgânica), dependendo de micro-organismos presentes no solo para a conversão deste nitrogênio nas suas formas minerais orgânicas (NH_4^+ e NO_3^-). Estas formas minerais são as formas prontamente absorvidas pelas plantas (Poletto, 2004). No entanto, a mineralização do nitrogênio não é suficiente para sustentar as altas demandas deste nutriente pelas culturas comerciais, sendo necessário realizar a adição de nitrogênio mineral (Weber and Mielniczuk, 2009), o qual, quando adicionado ao solo, não é imediatamente absorvido pelas plantas (Machado *et al.* 1998). Em condições normais, as plantas absorvem menos de 50% do nitrogênio mineral adicionado na forma de fertilizantes. Isso ocorre porque parte do nitrogênio é perdida por lixiviação deste na forma de nitrato, volatilização da amônia e pela emissão de N_2 e óxidos de nitrogênio (Bredemeier and Mundstock, 2000). O nitrogênio que se perde por lixiviação acaba por se tornar uma das principais fontes de poluição dos sistemas vegetais. Além da poluição causada pelo nitrogênio que é lixiviado, há também a poluição gerada pela produção industrial dos fertilizantes, a qual envolve

o consumo de combustíveis fósseis e a emissão de gases para a atmosfera (Weber and Mielniczuk, 2009).

1.2. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (PGPB):

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB – *Plant-Growth Promoting Bacteria*, em inglês) constituem um grupo de micro-organismos benéficos às plantas devido à sua capacidade de colonizar a superfície de raízes, a rizosfera, a filosfera e os tecidos internos da planta (Hungria *et al.* 2010) e de promover o crescimento vegetal (Verna *et al.* 2010). Essas bactérias são capazes de estimular um maior crescimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), da produção de fitormônios, principalmente ácido indol-3-acético (AIA), vitaminas e fatores de crescimento que estimulam o crescimento e a produção das plantas. Acredita-se que estas bactérias estimulam o crescimento vegetal por meio da combinação de vários desses mecanismos (Babalola, 2010; Hungria *et al.* 2010; Bashan and de-Bashan, 2010).

Dentre os fitormônios, o mecanismo de produção de AIA pelas PGPB tem sido um dos mais estudados (Yue *et al.* 2014; Baudoin, 2010; Spaepen *et al.* 2007; Spaepen and Vanderleyden, 2010). A principal via de produção desse hormônio em bactérias, assim como em plantas, usa o aminoácido triptofano (Trp) como precursor da síntese de AIA (Spaepen *et al.* 2007) (Figura 1). Apesar dessa similaridade, não são conhecidos homólogos em PGPB das enzimas envolvidas na principal via de produção em plantas. Tal fato indica que a via de produção de AIA evoluiu de forma independente em bactérias e plantas terrestres (Yue *et al.* 2014). Essa evolução convergente aponta a importância dessa substância em ambos os grupos. O AIA é usado pelas bactérias como uma molécula sinalizadora que permite às bactérias estimular o crescimento radicular e exsudação de carboidratos pelas plantas e, assim, criar um ambiente favorável para seu crescimento. Além disso, essa molécula está envolvida no processo de *quorum sensing* das bactérias. *Quorum sensing* é o uso de moléculas sinalizadoras capazes de se difundir pela membrana na comunicação entre as células (Crépin *et al.*, 2012). Isso permite que as bactérias percebam a densidade da população e controlem suas atividades com base nela. (Crépin *et al.*, 2012; Yue *et al.* 2014; Duca *et al.* 2014; Spaepen *et al.* 2007).

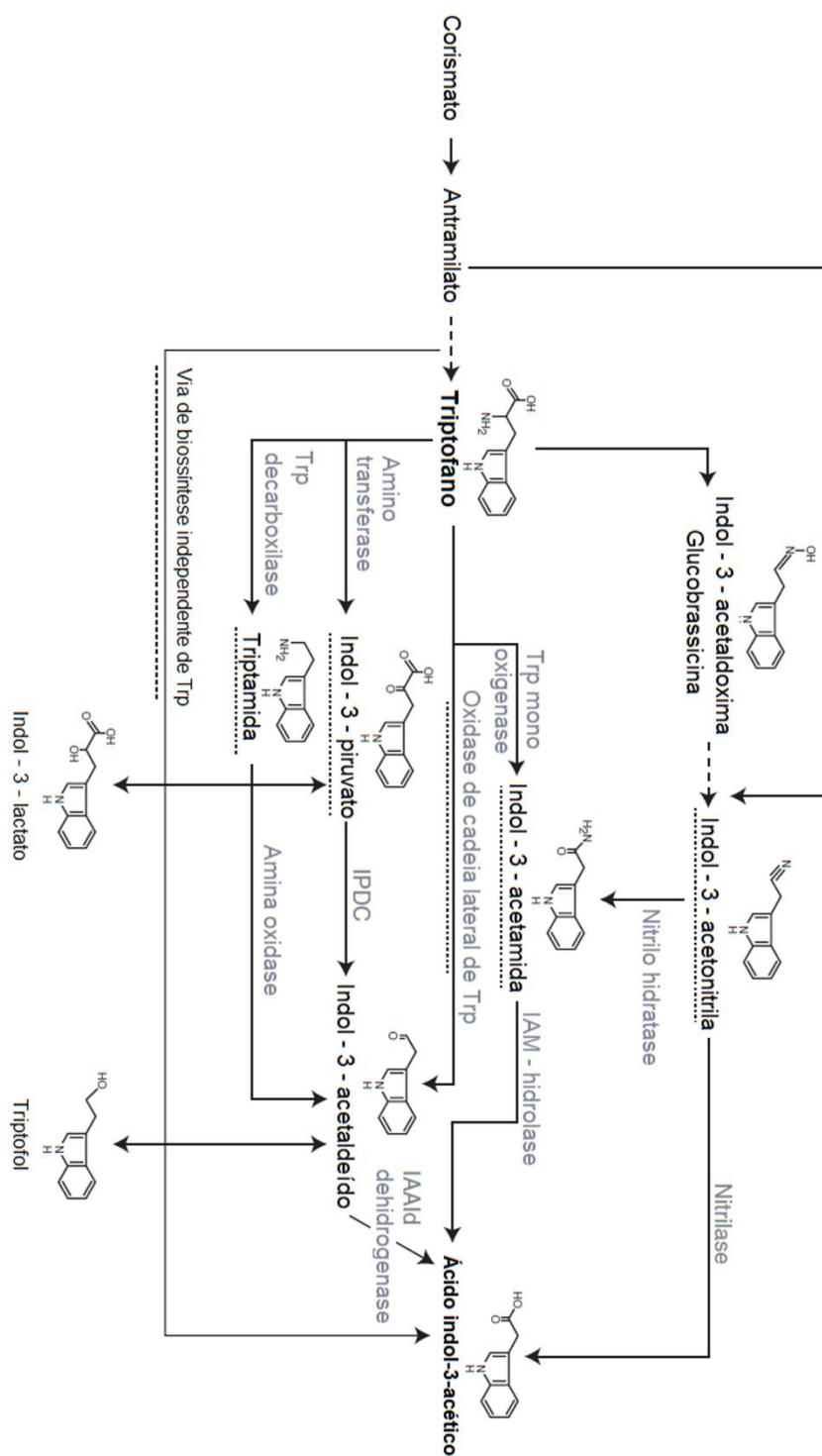


Figura 1. Visão geral das vias de produção de auxinas pelas bactérias. Os nomes sublinhados com linhas pontilhadas se referem aos nomes das vias de síntese. Os nomes em cinza se referem aos nomes das enzimas envolvidas nas reações. IAAId, Indol-3-acetaldeído; IAM, Indol-3-acetamida; IPDC, indol-3-piruvato descarboxilase; Trp, Triptofano. Adaptada de Spaepen and Vanderleyden (2010).

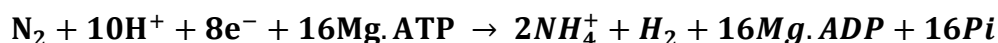
Por fim, as raízes das plantas excretam substâncias capazes de interagir com o sistema de *quorum-sensing* das bactérias, atraindo-as para a rizosfera. As PGPB, ao chegarem à rizosfera, colonizam esta região e começam a produzir substâncias que favorecem o crescimento das plantas (fitormônios, vitaminas, aminoácidos, fatores de crescimento, regulação da produção de etileno, entre outras) (Babalola, 2010).

Os seguintes gêneros bacterianos possuem membros que fazem parte do grupo das PGPB: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Zoogloea* (Verna *et al.* 2010). Com exceção das bactérias do gênero *Rhizobium*, as mais estudadas dentre as PGPB conhecidas são as pertencentes ao gênero *Azospirillum* (Bashan and de-Bashan, 2010)

1.3. *Azospirillum* spp.:

Azospirillum é um gênero de bactéria cujos representantes são encontrados em praticamente todos os locais do planeta (Hungria *et al.* 2010). São bactérias gram-negativas de vida livre que podem ser isoladas da rizosfera de gramíneas e de cereais, cultivados tanto em climas tropicais como em climas temperados (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). Essas bactérias possuem como características principais serem capazes de fixar o nitrogênio gasoso (N₂) e produzirem fitormônios (Cassán *et al.* 2009). *Azospirillum* spp. são capazes de fixar o nitrogênio gasoso (N₂) em condições microaeróbicas e o converter em amônia (NH₄⁺) (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000), que é uma das formas minerais do nitrogênio que é prontamente absorvida pelas plantas (Fornasieri, 1992). Tal forma mineral é excretada por estas bactérias, o que torna o nitrogênio disponível às plantas.

A fixação biológica de nitrogênio ocorre por meio do complexo da nitrogenase. Esse complexo é formado por duas metaloproteínas: a dinitrogenase redutase (ou Fe-proteína, produto do gene *nifH*) e a dinitrogenase (Mo-Fe proteína, que contém um cofator ferro-molibdênio, FeMoco, produto dos genes *nifDK*) (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000). O complexo da nitrogenase reduz o N₂ à NH₄⁺, como mostra a equação abaixo (Huergo, 2006):



A Fe-proteína se liga a duas moléculas de MgATP, o que altera a conformação desta, e, assim, permite que a Fe-proteína se ligue à Mo-Fe proteína. Uma vez formado o complexo da nitrogenase, a Fe-proteína transfere um elétron para o cofator Fe-Mo da Mo-Fe proteína. Durante

a transferência do elétron ocorre a hidrólise das duas moléculas de MgATP, liberando dois fosfatos inorgânicos. O MgADP permanece ligado à Fe-proteína oxidada e o complexo da nitrogenase é desfeito. A Fe-proteína é, então, reduzida por um doador de elétrons e os dois MgADP são substituídos por outras duas moléculas de MgATP, reiniciando o processo. Esta sequência de reações é repetida até que sejam transferidos elétrons suficientes para que o N_2 possa ser reduzido à NH_4^+ (Huergo, 2006), em número de oito (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000, Huergo, 2006).

Após a redução do N_2 a NH_4^+ ou da obtenção de amônia a partir do meio, a bactéria assimila essa amônia por meio da produção de glutamina e glutamato, compostos que irão atuar como doadores de nitrogênio nas reações celulares (Arcondeguy *et al.* 2001).

Segundo Machado *et al.* (1998), em experimentos em que se inoculou plantas de milho com uma mistura de bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. amazonense*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*) em dois regimes de adubação nitrogenada (10 kg ha^{-1} e 100 kg ha^{-1}), em que se consideraram as médias dos tratamentos com e sem inoculação, houve aumento no número de grãos, no conteúdo de nitrogênio nos grãos e no total de nitrogênio presente nas plantas. Conforme resultados obtidos por Junior *et al.* (2008), a inoculação com a bactéria *Azospirillum amazonense* em dois híbridos de milho, sob três regimes de adubação nitrogenada (100% NH_4^+ , 100% NO_3^- e sem Nitrogênio), produziu um aumento na quantidade de matéria seca e nitrogênio nas raízes das plantas inoculadas, quando comparadas com as não inoculadas.

Além de fixar o nitrogênio atmosférico, bactérias do gênero *Azospirillum* também produzem fitormônios (ácido indol-3-acético – AIA; giberelinas – GA_3 – Ácido Abscísico, etileno e poliaminas) que se acredita serem responsáveis, juntamente com a fixação de nitrogênio, por estimular o aumento na massa seca final das plantas (Bashan and de-Bashan, 2010; Perrig *et al.* 2007). Por essa razão, desde a sua redescoberta na metade da década de 1970, pela pesquisadora Johanna Döbereiner e seus colaboradores (Bashan and de-Bashan, 2010), a interação entre a planta e as bactérias do gênero *Azospirillum* e sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico tem sido amplamente estudada. Desde então, os trabalhos objetivaram elucidar o funcionamento das vias metabólicas desta bactéria de forma a entender os processos realizados por ela para fixar o nitrogênio atmosférico e para produzir fitormônios (Elmerich *et al.* 1997; Cassán *et al.* 2001; Santos *et al.* 2010; Molina-Favero *et al.* 2008).

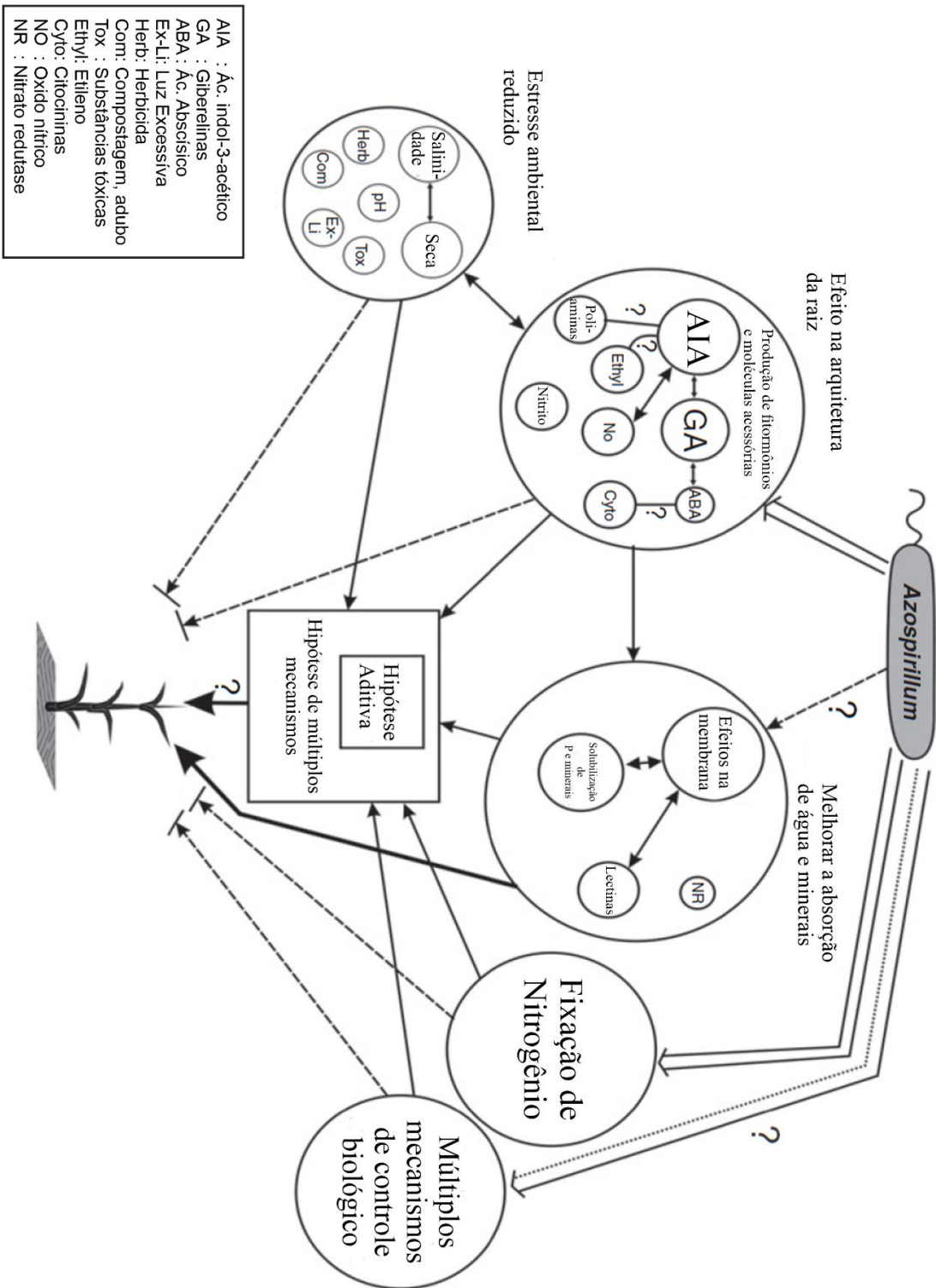


Figura 2. Mecanismos pelos quais *Azospirillum* spp. pode melhorar o crescimento das plantas e suas possíveis interações agrupadas como processos biológicos. Círculos representam processos contendo dados experimentais. Quadrados representam teorias. O tamanho do círculo representa a importância relativa de acordo com os dados atuais. Seta sólida: mecanismo(s) que pode(m) criar totalmente a promoção de crescimento observada; seta pontilhada: mecanismo(s) que pode(m) apenas explicar parcialmente a promoção de crescimento observada. Setas simples: interações comprovadas entre diferentes mecanismos; seta de linha dupla: produção direta de moléculas ou processos realizados pela célula bacteriana. “?” : não provado ainda, ou provado parcialmente. Adaptado de Bashan e de-Bashan, 2010.

É bem conhecido que o triptofano (Trp) é o precursor da síntese de AIA em *Azospirillum brasilense*, sendo a enzima indol-3-piruvato descarboxilase (IPDC) a principal responsável por esta síntese, e que baixas concentrações de Trp favorecem a síntese do AIA (Reynders e Vlassak, 1979; Zimmer *et al.* 1998; Malhotra e Srivastava, 2006; Malhotra e Srivastava, 2008). Segundo Ona *et al.* (2005), a biossíntese de AIA ocorre quando há limitação nutricional (baixas concentrações de nitrogênio e de fontes de carbono) e a bactéria se encontra associada com as raízes de plantas, o que resulta em baixos níveis de oxigênio e na presença de Trp. Segundo Ribaudó *et al.* (2006), o AIA produzido por *A. brasilense* durante a interação com o tomate, juntamente com o AIA produzido pela planta, é capaz de estimular a síntese de etileno pela planta em níveis que não inibem a elongação da raiz e a formação de raízes laterais. Por fim, segundo Duca *et al.* (2014), o AIA é uma molécula de sinalização usada na interação planta-bactéria que sustenta a relação simbiótica entre plantas e bactérias benéficas que evoluiu ao longo dos tempos.

Outros estudos apontaram a capacidade de *A. brasilense* de produzir as formas ativas de giberelinas (GA₁ e GA₃) (Bottini *et al.* 2004; Perrig *et al.* 2007; Salazar-Cerezo *et al.* 2018) e de realizar a 3-β-hidroxição das formas inativas das 3-β-deoxi GA presente em raízes (Cassán *et al.* 2001)

1.4.Auxinas

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm estudado os mecanismos de ação dos fitormônios no crescimento e desenvolvimento vegetal. Entre os principais grupos de fitormônios estudados estão as auxinas (especialmente o ácido indol-3-acético, AIA) (Blakeslee *et al.* 2005; Carraro *Et al.* 2006; Chen and Gallie, 2010; Hirano *et al.* 2008; Simon and Petrsek, 2011; Burg and Thimann, 1959; Ljung *et al.* 2001; Ljung *et al.* 2005; Tanimoto *et al.* 1995). As Auxinas são um grupo de hormônios responsáveis por regularem vários aspectos do desenvolvimento vegetal, como o crescimento e a diferenciação celular, estabelecimento da dominância apical, diferenciação do xilema, supressão da abscisão na formação dos meristemas apical radicular e caulinar (Bishopp

et al. 2006; Yue *et al.* 2014). Segundo, Simon and Petrusek (2011), o mecanismo de ação da auxina inclui respostas rápidas que não envolvem a expressão gênica e respostas mais lentas que requerem a expressão de genes regulados pela auxina, mediada pelas proteínas F-box.

As auxinas são sintetizadas, principalmente, nos meristemas apicais e em folhas jovens (Tomas and Perrot-Rechenmann, 2010) e, também, no meristema apical das raízes, especialmente durante a fase de alongação da raiz. Entretanto, a raiz ainda depende da auxina produzida nas partes aéreas da planta (Ljung *et al.* 2001; Ljung *et al.* 2005). Nas plantas, a principal via de produção do AIA é a partir do aminoácido triptofano (Trp). Ao longo dos anos, várias rotas de produção de AIA a partir de Trp foram propostas (Zhao, 2010). Nesses estudos, as enzimas pertencentes às famílias das Triptofano-aminotransferases de *Arabidopsis* (TAA) e as das YUC flavino-mono-oxigenases eram posicionadas em rotas metabólicas diferentes. Entretanto, estudos recentes indicaram que essas duas enzimas fazem parte da principal via de produção de AIA nas plantas. A TAA converte o triptofano em Indol-3-piruvato (IPA), que é convertido em AIA pela YUC (Figura 3) (Zhao, 2012; Zhao, 2014; Won *et al.* 2011; Mashiguchi *et al.* 2011; Yue *et al.* 2014). Por fim, foi observado por Nishimura *et al.* (2014) que a substância conhecida como Yucasin [5-(4-clorofenil)-4H-1,2,4-triazol-3-tiol] é um inibidor competitivo de IPA, impedindo a descarboxilação deste pela YUC. Por inibir de forma sinérgica a produção de AIA por esta via e o crescimento da planta, o Yucasin pode ser usado em estudos de modulação da produção de AIA pela planta ao longo do tempo (Zhao, 2014).

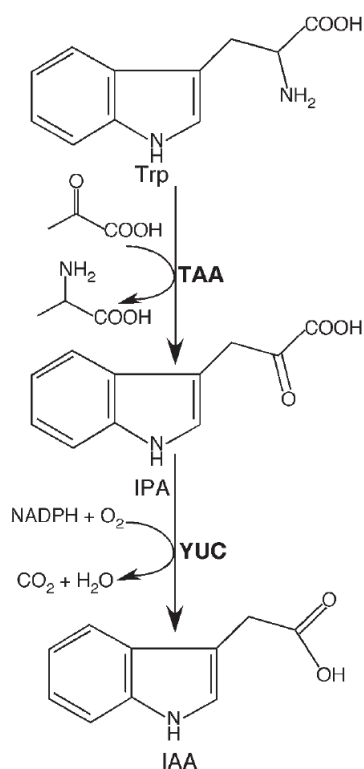


Figura 33. Via de biossíntese de auxinas dependente de triptofano em plantas. A primeira etapa é catalisada pelas TAAs que transferem o grupo amina do Trp para um ácido ceto-alfa, como o piruvato, para formar o IPA e outro aminoácido. A segunda etapa é uma reação dependente de NADPH e oxigênio que tem como produtos CO₂, H₂O e AIA. Essa reação é catalisada pelas YUC flavina-mono-oxigenases. Adaptada de Zhao (2012).

Além das plantas, bactérias e fungos também são capazes de produzir AIA a partir de vias dependentes de Trp (Zhao, 2010; Yue *et al.* 2014). Nesse contexto, não se sabe se e como as vias metabólicas de plantas e

bactérias estão relacionadas, pois foram achadas tanto similaridades quanto diferenças em nível molecular nas vias de produção de AIA por plantas e bactérias. Em relação à biossíntese desse hormônio por fungos, essa parte continua pendente de mais estudos. Assim, apesar da importância desse hormônio no desenvolvimento das plantas, nosso conhecimento sobre a evolução das vias biossintese de auxinas pelas plantas continua limitada (Yue *et al.* 2014).

Muito desse desconhecimento sobre a evolução da biossíntese das auxinas foi causada pela falta de conhecimento da via de produção de AIA por si só. Muitos caminhos foram sugeridos ao longo dos anos (Yue *et al.* 2014). Entretanto, a recente descoberta da via TAA/YUC para produção de AIA a partir de Trp e que essa é a principal via de produção em plantas (Won *et al.* 2011; Mashiguchi *et al.* 2011) permitiu uma nova análise sobre a origem da via de produção das auxinas nas plantas. Um fato interessante é que em algas marrons foram encontrados vários genes homólogos aos genes de planta para a biossíntese de AIA. Isso sugere a possibilidade desse hormônio ser produzido em várias linhagens de algas (Yue *et al.* 2014; ver Refs 15-16 dessa revisão para maiores detalhes), e inclusive já era conhecido que homólogos dos genes envolvidos no transporte das auxinas e o do seu receptor estavam presentes nas algas verdes (Yue, 2017). Entretanto, outros componentes da maquinaria de resposta às auxinas, como o Fator de Resposta às Auxinas (ARF), são específicos das plantas terrestres. Apesar disso, vários genes homólogos da via biossintética de AIA dependente de Trp foram identificados nas algas verdes. Tal fato indica

uma origem mais antiga da via de produção de AIA. Assim, tomando por base a via metabólica composta pelas famílias gênicas das Triptofano amino-transferases de *Arabidopsis* (TAA) e das YUC flavinas mono-oxigenases (YUC) para produção de AIA a partir de Trp (Figura 4), Yue *et al.* (2014) fizeram estudos filogenéticos para verificar as origens dessas duas enzimas. Segundo esses autores, os genes codificantes das TAAs estão relacionados a homólogos em eucariotos fotossintéticos secundários (ex.: coanoflagelados e seus parentes próximos apusozoários e ichthyosporos) que não produzem AIA, que é consistente com o fato deles não possuírem genes homólogos da YUC relacionada com a síntese de AIA. Por outro lado, Yue *et al.* (2014) encontraram homólogos da família de genes YUC em bactérias e em alguns eucariontes, entre eles algas marrons e algas verdes clorofiladas. Entretanto, os mesmos autores não encontraram homólogos de YUC em carófitas, que é o grupo de algas verdes mais próximo das plantas terrestres. A explicação mais aceitável para esse fato, segundo estes pesquisadores, é de que as YUCs necessárias para a produção de AIA foram adquiridas pelo ancestral comum das plantas terrestres por transferência horizontal de genes a partir de bactérias. Assim, para esses autores, a origem mosaica dessa via de produção indica que essa via é uma inovação das plantas terrestres, assim como a importância da transmissão lateral de genes na geração e otimização de novidades evolutivas nos eucariotos.

Após entrarem nas células, as auxinas desencadeiam um conjunto de respostas celulares mediadas por um grupo de proteínas presentes no núcleo da célula vegetal. O receptor de auxina, *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (TIR1), interage com a proteína Culina (em inglês, *Cullin*), com a *Arabidopsis* SKP1 (ASK1/ASK2) uma proteína quinase tipo SKP1 (em inglês *S-phase kinase-associated protein*) e com a proteína com domínio em anel RBX1 (sigla em inglês para *Ring Box 1*) para formar o complexo do tipo SCF (SKP – Culina – F-box) com atividade de ubiquitina ligase (Moon *et al.* 2004; Bishopp *et al.* 2006). Esse tipo de complexo transfere uma ubiquitina para a proteína alvo, o que marca esta para ser degradada pelo proteossomo 26S. O complexo SCF^{TIR1}, quando ligado à auxina, marca para degradação um conjunto de reguladores de transcrição dependentes de auxina (Aux/IAA). Esses reguladores de transcrição, na ausência de auxina, reprimem a atividade transcricional de FATORES DE RESPOSTA A AUXINA (*AUXIN RESPONSE FACTORS* – ARF, em inglês). Assim, na presença da auxina, a Aux/IAA é marcada para degradação pelo complexo SCF^{TIR1}, o que libera ARF para promover a transcrição dos genes associados à resposta à auxina (Figura 4) (Bishopp *et al.* 2006)

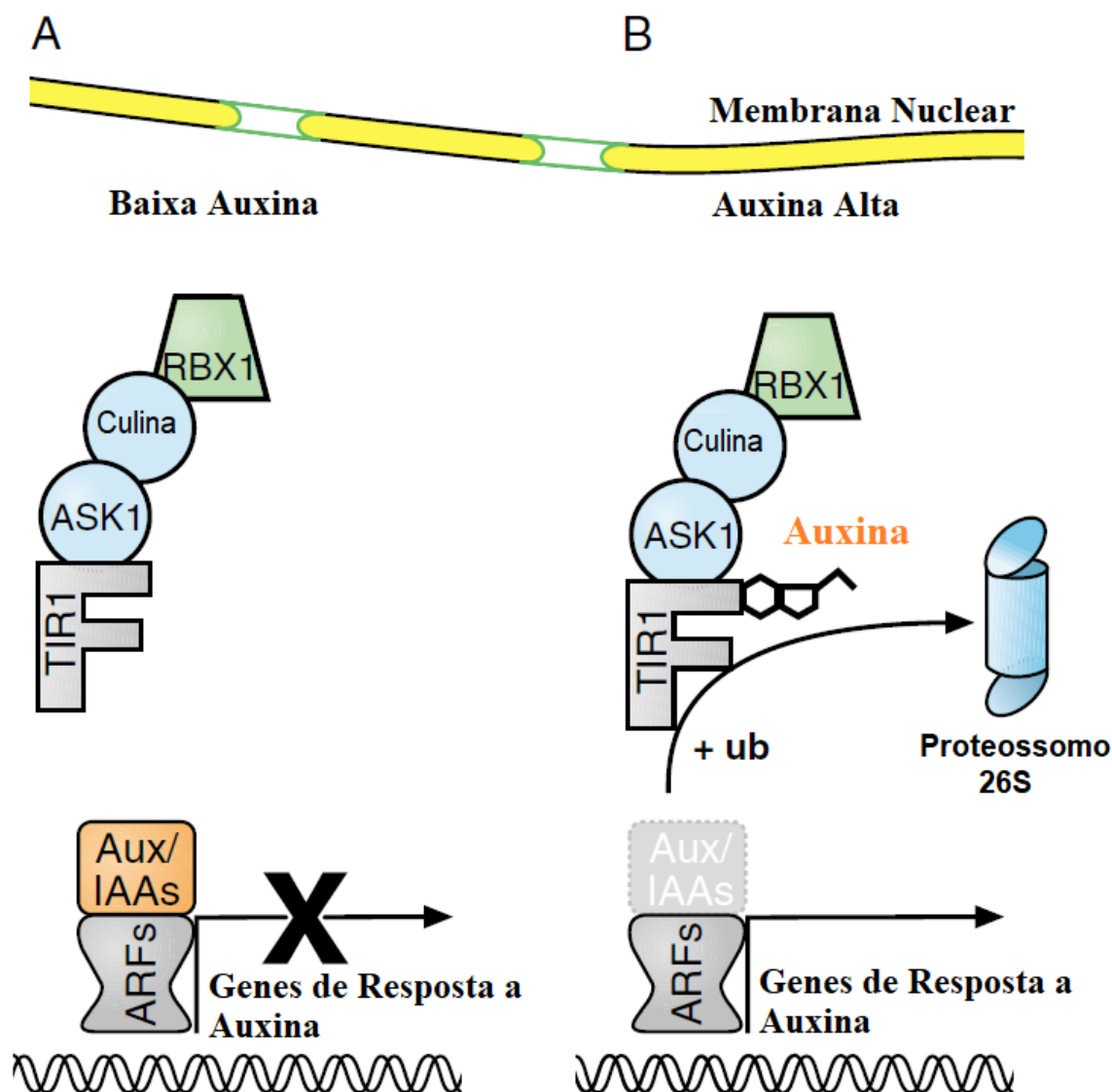


Figura 4. Mecanismo de ação das auxinas em plantas. (A) Em baixas concentrações de auxinas, a transcrição dos genes de resposta à auxina é bloqueada pela Aux/IAA. (B) Em altas concentrações de auxina, em *Arabidopsis*, esta se liga ao complexo SCF^{TIR1} pela TIR1. A ligação da auxina no complexo estimula a interação desse com a Aux/IAA. SCF^{TIR1} marca Aux/IAA para degradação por meio da ubiquitinação, que é feita pelo proteossoma 26S. Essa destruição libera as ARFs de seus repressores. Adaptada de Bishop *et al.* 2006.

1.5. Transcritoma e o sequenciamento do RNA (RNA-seq):

Transcritoma é o conjunto formado por todos os transcritos de uma célula em um estágio desenvolvimental específico ou uma dada condição fisiológica. Estudar e entender o transcriptoma

é essencial para se compreender os elementos funcionais do genoma e seus constituintes, além de permitir estudar os estágios do desenvolvimento de dado organismo e aspectos relacionados a doenças. O estudo do transcrito tem por objetivos (Wang *et al.* 2009):

- Catalogar os tipos de transcritos (RNA mensageiro, RNA não codante, pequenos RNAs, etc);
- Determinar a estrutura transcricional dos genes (por exemplo: sítios de início da transcrição, padrão de “splicing” e edição do RNA);
- Quantificar as mudanças nos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento ou sob determinada condição.

Dentre as tecnologias usadas para se estudar o transcrito, a mais recente é a técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq). Essa técnica surgiu a partir do desenvolvimento de uma nova técnica de sequenciamento de DNA com alto rendimento. Nessa metodologia, uma população de RNA é convertida em uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores ligados em ambas ou somente uma das extremidades do mesmo. Depois, cada fragmento, com ou sem amplificação prévia, é sequenciado e se obtém pequenas sequências. O sequenciamento é feito a partir de uma das extremidades (*single-end sequencing*) ou de ambas (*pair-end sequencing*). As leituras apresentam comprimento de 30 a 400 pares de bases (pb), dependendo da tecnologia de sequenciamento de DNA usada. As vantagens dessa metodologia frente às anteriores são (Wang *et al.* 2009):

- Diferentemente das metodologias baseadas em hibridização, RNA-seq não necessita de prévio sequenciamento do genoma do organismo sob estudo;
- RNA-seq pode revelar de forma precisa onde se localiza os limites dos transcritos com a resolução de 1 pb;
- RNA-seq também pode ajudar a identificar variações na sequência (por exemplo, polimorfismo de nucleotídeo único ou, em inglês, *single nucleotide polymorphism* – SNP) nas regiões transcritas.

Recentemente, com o auxílio dessa técnica, se começou a estudar a expressão de organismos que interagem no ambiente, em relações como o comensalismo, mutualismo e hospedeiro-patógeno (Wolf *et al.* 2018). A esse tipo de experimento que analisa, de forma simultânea, o transcrito de ambos os organismos durante a interação e como estes influenciam a expressão um do outro, se deu o nome de Dual RNA-seq (Westermann *et al.* 2012; Westermann *et al.* 2016; Westermann and Vogel, 2018). Os experimentos de Dual RNA-seq são compostos das seguintes etapas (Wolf *et al.* 2018):

- I. Execução do experimento onde dois ou mais organismos interagem;
- II. Extração do RNA total, que contém RNA de ambos os organismos sob estudo;
- III. Sequenciamento das bibliotecas de cDNAs geradas a partir das amostras de RNA total obtidas;
- IV. Controle de qualidade e trimagem das sequências;
- V. Mapeamento das sequências contra os genomas de referência;
- VI. Determinação da quantidade de “reads” por gene;
- VII. Identificação dos genes que estão sendo diferencialmente expressos nas condições do experimento.

As etapas de I a III correspondem às etapas de construção das bibliotecas e as demais correspondem ao processamento e análise dos dados obtidos. A etapa mais complicada neste tipo de análise é a separação *in silico* das sequências de cada organismo. Essa separação ocorre durante o mapeamento e pode ser feita usando duas técnicas de análise diferentes: sequencial e combinada (Wolf *et al.* 2018; Westermann *et al.* 2012; Westermann *et al.* 2016; Westermann and Vogel, 2018; Aprianto *et al.* 2016; Daly *et al.* 2017; Camilios-Neto *et al.* 2014; Pankievicz *et al.* 2016; Verwaaijen *et al.* 2017).

A análise sequencial consiste em mapear a biblioteca de cDNA primeiro contra o genoma de referência de um dos organismos. As sequências que não mapearem no primeiro genoma são consideradas como pertencentes ao outro organismo. Assim, essas sequências são mapeadas contra o outro genoma de referência (Verwaaijen *et al.* 2017; Packard *et al.* 2017; Camilios-Neto *et al.* 2014). Variantes desse método são a análise paralela e a combinada. Na primeira, a biblioteca é mapeada contra ambos os genomas de referência (Westermann *et al.* 2012; Westermann *et al.* 2016; Westermann and Vogel, 2018). Na análise combinada, as bibliotecas são mapeadas contra um genoma de referência quimérico, contendo ambos os genomas (Aprianto *et al.* 2016). Em ambos os casos, as sequências que alinham em ambos os genomas são eliminadas, pois não há consenso sobre o uso ou descarte dessas sequências.

Outro fato a se considerar quando da análise das bibliotecas oriundas de experimentos de Dual RNA-seq é como serão tratadas as sequências que alinham em mais de um local. Essas sequências podem ser de dois tipos: as que alinham em mais de um local no genoma e as que alinham em mais de um genoma. As sequências que podem alinhar em mais de um local no genoma de referência (Conesa *et al.* 2016) ou em ambos os genomas de referência (mapeamento cruzado) (Westermann *et al.* 2012; Westermann and Vogel, 2018) são chamadas de “multireads”. De acordo com Conesa e colaboradores (2016), sequências que podem alinhar em mais de um local no

genoma (“multireads” genômicos) são principalmente devidas a sequências repetidas ou domínios compartilhados por genes parálogos no genoma. Essas sequências correspondem a uma fração significativa das sequências mapeadas e, por isso, não devem ser descartadas (Conesa *et al.* 2016), sob pena de se perder informação sobre a expressão gênica, caso sejam eliminadas. Com relação às sequências que podem alinhar em mais de um genoma, deve-se levar em consideração o fato que procariotos e eucariotos que vivem no mesmo ambiente e interagem entre si podem trocar sequências de DNA através da Transferência Horizontal de Genes (HGT –*Horizontal Gene Transfer*, em inglês). Esse fato deve ser levado em conta, uma vez que há evidências de que DNA pode ser transferido de bactérias para eucariotos (Husnik and McCutcheon, 2017; Quispe-Huamanquispe, Gheysen and Kreuze, 2017) e de plantas para bactérias (Pontiroli *et al.* 2009). Dessa forma, a existência de similaridades entre algumas das sequências de ambos os genomas é esperada. Essas similaridades podem dificultar a atribuição correta da sequência ao genoma de referência. Por essa razão, segundo Wolf e colaboradores (2018), no caso de bibliotecas formadas pelos transcritos de dois ou mais organismos a análise combinada é a mais recomendada, pois permite à ferramenta de mapeamento analisar em qual genoma de referência a sequência alinha melhor.

Assim, dada a importância da cultura do milho e da necessidade de se compreender melhor como ocorre a interação entre este e a PGPB *Azospirillum brasilense* se realizou o estudo apresentado nesta tese de doutoramento. Esse estudo foi desenvolvido para entender melhor como o ácido indol – 3 – acético produzido por esta bactéria pode alterar a expressão gênica da planta.

2. Objetivo Geral

Analisar os efeitos na expressão gênica durante a interação de milho (*Zea mays*) com *Azospirillum brasilense* durante a inibição da produção do Ácido Indol-3-Acético pela planta.

2.1. Objetivos Específicos

- 1) Desenvolver de uma metodologia para a análise de bibliotecas de RNA compostas por dois ou mais organismos.
- 2) Avaliar a alteração da expressão gênica de plântulas de milho e da bactéria *Azospirillum brasilense* em condições de inoculação planta-bactéria e na presença de um inibidor da via de síntese de Ácido-Indol-3-Acético (Yucasin) em amostras de raízes.

3. Material, Métodos e Resultados:

Os materiais e métodos, e resultados serão apresentados no formato de artigo nos próximos dois tópicos. O artigo 1 foi submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*, dessa forma foi escrito e apresentado de acordo com as normas desta revista. O artigo 2 será submetido à revista *Molecular Plant – Microbe Interactions* e por isso foi escrito e apresentado de acordo com as normas desta revista.

4. Artigo 1: The combined analysis as the best strategy for Dual RNA-Seq mapping

5. Artigo 2: The genetic interaction between *Azospirillum brasilense* and maize during the inhibition of indole-3-acetic acid production by the plant

6. Análise Complementar

7. Discussão

O milho é uma das culturas mais importantes para alimentação humana e animal. Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2016), em 2016, o Brasil apresentou a 3^a maior produção mundial. Dada a importância nutricional e econômica desta cultura, pesquisar formas de aumentar sua produção se faz necessária. Uma alternativa para se aumentar a produção desta cultura sem aumento na adição de nitrogênio é o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB). Essas bactérias são capazes de estimular um maior crescimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), da produção de fitormônios, vitaminas e fatores de crescimento, que estimulam o crescimento e a produção das plantas (Babalola, 2010; Hungria *et al.* 2010; Bashan and de-Bashan, 2010).

Apesar de já estar bem estabelecido o benefício de *Azospirillum* para as plantas, pouco é sabido em relação à expressão gênica dos organismos durante a interação. Para lançar um pouco de luz nessa relação e como o AIA produzido pela bactéria influencia a planta, estudamos as alterações no transcrito da planta e da bactéria durante na presença de Yucasin, que é um potente inibidor competitivo na planta da conversão de AIP em AIA pela via TAA/YUC.

O primeiro desafio desse trabalho foi separar os transcritos dos dois organismos que estavam interagindo, uma vez que as amostras de RNA continham materiais tanto do milho como da bactéria. A literatura recomenda que essa separação seja feita *in silico*, durante a fase de mapeamento dos mRNA (Wolf *et al.* 2018). Para tanto, há duas metodologias que podem ser escolhidas: sequencial e combinada. Apesar de Wolf *et al.* (2018) recomendarem a segunda alternativa, por permitir que o programa de mapeamento defina em qual dos genomas a sequência irá se alinhar de forma mais eficiente, a análise sequencial ainda é a mais usada na maioria dos trabalhos de *Dual RNA-seq* (Kovalchuk *et al.* 2019; LaMonte *et al.* 2019; Mateus *et al.* 2019; Montoya *et al.* 2019; Mutha *et al.* 2019). Acreditamos que isso ocorra devido ao fato de que, para se criar uma referência concatenada com os genomas dos organismos presentes na amostra, para que os programas de mapeamento mais utilizados possam usá-la no mapeamento, é necessário um conhecimento mais apurado de programação. Aprianto *et al.* (2016), por exemplo, adicionaram o genoma de *Pseudomonas* como um cromossomo extra no genoma de referência de *Homo sapiens*, fato que exigiu um conhecimento mais aprofundado de bioinformática. Para contornar esse problema, desenvolvemos uma abordagem de mapeamento combinada, usando o programa CLC Genomics Workbench, utilizando bibliotecas de RNA disponíveis em bancos de dados públicos e de um experimento conduzido no nosso laboratório. Graças às características do programa, realizamos a separação *in silico* durante a etapa de mapeamento dos *reads* obtidos. Durante essa

etapa foi usado um arquivo contendo os dois genomas de referência, que foram previamente concatenados usando o terminal do Linux. Depois de mapeados, o programa nos permitiu extrair as sequências que mapearam em cada genoma (Capítulo 1, Figura S3). Feito isso, cada biblioteca pode ter suas sequências contadas usando o genoma de referência com as respectivas anotações.

Nossos resultados mostraram que a metodologia combinada é, de fato, a melhor opção para análises de dados de *Dual RNA-seq*, visto que devido ao uso dela houve a diminuição do número de reads que mapearam cruzado. Além disso essa abordagem oferece uma alternativa para a realização deste procedimento em um ambiente amigável ao usuário e sem a necessidade de grandes habilidades na área da programação.

Uma vez definida a forma de análise, foram realizados os isolamentos dos RNAs totais e as bibliotecas de cDNA obtidas foram sequenciadas. As sequências foram mapeadas contra os respectivos genomas de referência e os *loci* em que essas sequências mapearam foram determinados. Por fim, foram identificados, entre os *loci* que tiveram sequências atribuídas a eles, os genes diferencialmente expressos entre os grupos experimentais. Dessa análise foram identificados genes diferencialmente expressos no milho que codificam proteínas envolvidas na resposta a estresses bióticos e abióticos e envolvidas na síntese e resposta a fito-hormônios.

Da análise dos genes envolvidos na resposta e síntese de fito-hormônios foram identificados genes pertencentes às vias do ácido abscísico (ABA) e das giberelinas (GA). Com relação à via de resposta ao ABA, foram identificados três genes diferencialmente expressos. Com base na análise da expressão desses genes, elaboramos uma proposta de como a presença de *A. brasilense* na planta melhora a resposta dessa ao estresse abiótico (Capítulo 2, Figura 4). Também foi identificado um gene que codifica o receptor de GA *GID1L2* (GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1). Esse receptor, quando está ligado à GA, se liga à proteína DELLA, marcando-a para degradação pelo proteossoma 26S (Hirano *et al.* 2008). A expressão do gene *GID1L2* em ambas as situações em que ele foi identificado (grupos II e IV em relação ao grupo I) estava reprimida. No grupo IV, onde também havia a presença de *Azospirillum*, a repressão foi uma ordem de grandeza menor. Na comparação do grupo IV com o grupo I também foi identificado que o gene que codifica a *Gibberellin 20-oxidase 4* (GA20oxi4), que, apesar de ter um valor válido de p-ajustado, esse gene apresentou um valor de expressão muito próximo do limite estabelecido por nós, ficando em 1,9. Com base nas expressões observadas para esses dois genes e pelo fato de que *A. brasilense* sintetiza AIA durante a interação com a planta (Duca *et al.* 2014), podemos sugerir que a auxina produzida pela bactéria de alguma forma estimulou a síntese de *GID1L2*, visto que na comparação do grupo que somente recebeu Yucasin (grupo II), essa repressão foi mais forte do que no grupo que recebeu

Yucasin na presença da bactéria (grupo IV). Com relação ao observado para o gene *ZmGA20ox4*, levando em consideração que a presença da bactéria e de Yucasin estimulou a síntese de ABA (Capítulo 2, figura 4), podemos supor que, com base no que postula Hirano *et al.* (2008), o ABA produzido interagiu com DELLA, estabilizando-a, e, assim, permitiu a expressão de *ZmGA20ox4*. Estes dois genes não foram incluídos na discussão do artigo no segundo capítulo devido ao fato de que novas análises são necessárias para confirmar nossas observações para *ZmGA20ox4*.

Com relação aos genes envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos, vale destacar a expressão dos genes *TYFY 3B* e *WIN1*. Ambos, quando analisamos o grupo que somente recebeu a bactéria (III) contra o grupo controle (I), estavam reprimidos. Isso indica que, de alguma forma, a presença de *A. brasilense* reprimiu a expressão desses genes. Como eles estão relacionados com a resposta a estresses bióticos podemos supor que sua repressão facilita a colonização da planta pela bactéria.

Em nossas análises também foi identificado o gene que codifica o receptor *GASSHO 1* (*GSO1*). Esse receptor é um tipo de quinase receptora rica em resíduos de leucina (*leucine-rich repeat receptor-like kinase* – LRR-RLK). Esse gene foi identificado em mutantes de *Arabidopsis* e atua junto com *GSO2* (Tsuwamoto *et al.* 2008). Um duplo mutante para esses genes apresentou diversos danos na raiz, entre eles, o aumento da permeabilidade da epiderme das raízes (Racolta *et al.* 2014; Tsuwamoto *et al.* 2008). Como não foram observadas alterações na expressão de *GSO2* e como *GSO1* estava reprimido somente nos grupos que em que havia a presença da bactéria, postulamos que esse receptor possa estar envolvido na facilitação das trocas de substâncias entre a planta e a bactéria. Esse envolvimento pode se dar através do aumento da permeabilidade celular sem, contudo, haver dano ao crescimento das raízes, como observado por Racolta *et al.* (2014), visto que o grupo III apresentou tamanho de raiz compatível com os tamanhos de raízes das plantas dos grupos I e IV. As raízes das plantas do grupo IV, inclusive, apresentaram crescimento maior que aquelas dos grupos I e II (Capítulo 2, Figura 2A).

Por fim, vale destacar que, graças à abordagem de análise conjunta desenvolvida nesse trabalho, foi possível a detecção de genes diferencialmente expressos em *A. brasilense*. Apesar da quantidade de genes detectados ter sido pequena, os genes identificados indicaram que a bactéria estava ativa. Essa pequena quantidade de genes detectados provavelmente ocorreu porque antes de se preparar as bibliotecas de cDNA para o sequenciamento foi usado um *kit* para a remoção de rRNA exclusivo para plantas (RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq - Invitrogen). Muito provavelmente esta estratégia não foi suficiente para eliminar o rRNA bacteriano. Levantamos essa hipótese porque, segundo Petrova *et al.* (2017), a quantidade de rRNA é muito maior que a de

mRNA nas amostras bacterianas e a metodologia de remoção utilizada pode alterar a qualidade dessa remoção e, conseqüentemente, afetar as subseqüentes análises. Isso foi observado em nossas amostras na medida em que a maior parte das seqüências bacterianas alinharam em regiões correspondentes aos genes codificadores de rRNA. Assim, para futuros estudos de *Dual RNA-seq* que envolvam a interação eucarionte – procarionte recomenda-se que, antes de se preparar o cDNA, sejam realizadas duas etapas de depleção para remover tanto rRNA procarionte quanto eucarionte, a fim de aumentar a eficiência no sequenciamento do mRNA bacteriano.

8. Conclusões Finais e Perspectivas

Na primeira parte deste trabalho foi aprimorada uma abordagem de análise que foi posteriormente utilizada para analisar as bibliotecas de cDNA obtidas. Dessa parte do trabalho foi possível concluir que em experimentos de *Dual RNA-seq*, que são formados por sequências de RNA de dois ou mais organismos, é preferível o uso da metodologia combinada para analisar esses dados. A metodologia sequencial pode levar a erros de sub e/ou super-estimação da expressão de genes em cada um dos organismos a depender de qual deles foi usado primeiro no mapeamento. Outro resultado obtido foi mostrar uma forma de executar esta metodologia em um ambiente amigável para o usuário e que demanda pouco conhecimento de informática para ser realizada.

Na segunda parte do trabalho foi estudada a interação entre *Z. mays* e *A. brasilense* FP2 durante a inibição da produção de AIA pela planta causada pelo composto Yucasin. Com base nos dados fisiológicos obtidos foi possível observar que os efeitos benéficos de *A. brasilense* FP2 foram capazes de reverter o fenótipo das raízes de milho causado pelo Yucasin (Capítulo 2, Figura S2-D). Da análise dos dados de expressão gênica foi possível concluir que a presença de *A. brasilense* provavelmente melhorou a resposta da planta a estresses abióticos, através da via de resposta dependente de ABA. Também foi observado, na presença somente da bactéria, que os genes que codificam o fator de transcrição *TYF 3B* e a proteína *WIN1*, envolvidos na resposta a estresse biótico, estavam com sua expressão reprimida. Concluímos que, de alguma forma, a presença da bactéria causou esta repressão, o que, provavelmente, facilitou a colonização da planta pela bactéria.

Por fim, identificamos que um dos genes da via de síntese de GA estava com sua expressão estimulada, mas abaixo dos parâmetros usados no nosso experimento. Entretanto, esse valor estava somente 0,1 ponto abaixo do limite, o que nos leva a crer que esse estímulo poderia corresponder à realidade. Também foram identificados em nossas análises um total de 55 genes não caracterizados em todas as situações experimentais.

Como tivemos mais de 170 genes diferencialmente expressos entre genes de milho e de *Azospirillum* (Capítulo 2, Tabelas S1 e S2), análises complementares desses genes já estão sendo realizadas. Foram realizados até o presente momento o teste de enriquecimento para perfis funcionais de categorias ontológicas gênicas (GO) e o teste de enriquecimento das vias metabólicas usando o banco de dados KEGG (Tabelas Suplementares 1 e 2). Análises preliminares indicam que parte deles mapearam em rotas metabólicas e em categorias ontológicas, especialmente na de processos biológicos (Tabela Suplementar 2).

As próximas etapas envolverão a realização de análises complementares por PCR em tempo real do gene *Zm20ox4* e de outros da via das GA para comprovar os resultados apresentados.

Também serão finalizadas as análises dos testes de GO e de rotas metabólicas. Finalmente, alguns dos genes não caracterizados serão investigados. Será dada especial atenção nos DEGs não caracterizados identificados na comparação do grupo com a bactéria (III) com o grupo I. Com exceção de um, todos os demais DEGs não caracterizados estavam reprimidos nessa comparação.

8. Tabelas suplementares

9. Referências Bibliográficas

- Aprianto, R., Slager, J., Holsappel, S. and Veening, J.-W. (2016) Time-resolved dual RNA-seq reveals extensive rewiring of lung epithelial and pneumococcal transcriptomes during early infection, *Genome Biol*, 17(1), pp. 198.
- Arcondeguy, T., Jack, R. and Merrick, M. (2001) P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control, *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(1), pp. 80-105.
- Babalola, O. O. (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance, *Biotechnol Lett*, 32(11), pp. 1559-70.
- Baddal, B., Muzzi, A., Censini, S., Calogero, R. A., Torricelli, G., Guidotti, S., Taddei, A. R., Covacci, A., Pizza, M., Rappuoli, R., Soriani, M. and Pezzicoli, A. (2015) Dual RNA-seq of Non type able *Haemophilus influenzae* and Host Cell Transcriptomes Reveals Novel Insights into Host-Pathogen Cross Talk, *mBio*, 6(6), pp. e01765-15.
- Balsanelli, E., Tadra-Sfeir Michelle, Z., Faoro, H., Pankievicz Vânia, C. S., Baura Valter, A., Pedrosa Fábio, O., Souza Emanuel, M., Dixon, R. and Monteiro Rose, A. (2016) Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere, *Environ Microbiol*, 18(8), pp. 2343-2356.
- Barret, M., Frey-Klett, P., Guillerme-Erckelboudt, A.-Y., Boutin, M., Guerneq, G. and Sarniguet, A. (2009) Effect of Wheat Roots Infected with the Pathogenic Fungus *Gaeumannomyces graminis* var. tritici on Gene Expression of the Biocontrol Bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp, *Mol Plant Microbe In*, 22(12), pp. 1611-1623.
- Bashan, Y. and de-Bashan, L. E. (2010) How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment, 108, pp. 77-136.
- Baudoin, E. L., A.;Mirza, M. S.;El Zemrany, H.;Prigent-Combaret, C.;Jurkevich, E.;Spaepen, S.;Vanderleyden, J.;Nazaret, S.;Okon, Y.;Moenne-Loccoz, Y. (2010) Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene *ipdC* upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere, *Res Microbiol*, 161(3), pp. 219-26.
- Bishopp, A., Mahonen, A. P. and Helariutta, Y. (2006) Signs of change: hormone receptors that regulate plant development, *Development*, 133(10), pp. 1857-69.
- Blakeslee, J. J., Peer, W. A. and Murphy, A. S. (2005) Auxin transport, *Curr Opin Plant Biol*, 8(5), pp. 494-500.
- Bonato, P., Batista Marcelo, B., Camilios-Neto, D., Pankievicz Vânia, C. S., Tadra-Sfeir Michelle, Z., Monteiro Rose, A., Pedrosa Fabio, O., Souza Emanuel, M., Chubatsu Leda, S., Wassem, R.

- and Rigo Liu, U. (2016) RNA-seq analyses reveal insights into the function of respiratory nitrate reductase of the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*, *Environ Microbiol*, 18(8), pp. 2677-2688.
- Boscari, A., del Giudice, J., Ferrarini, A., Venturini, L., Zaffini, A.-L., Delledonne, M. and Puppo, A. (2012) Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide?, *Plant Physiol*, 161(1), pp. 425-39.
- Bottini, R., Cassan, F. and Piccoli, P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase, *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(5), pp. 497-503.
- Bredemeier, C. and Mundstock, C. M. (2000) Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas, *Ciência Rural*, 30(2), pp. 365-372.
- Bruto, M., Prigent-Combaret, C., Muller, D. and Moënne-Loccoz, Y. (2014) Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria, *Sci Rep - UK*, 4, pp. 6261.
- Burg, S. E. and Thimann, K. V. (1959) The physiology of ethylene formation in apples, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 45, pp. 335-344.
- Camilios-Neto, D., Bonato, P., Wassem, R., Tadra-Sfeir, M. Z., Brusamarello-Santos, L. C. C., Valdameri, G., Donatti, L., Faoro, H., Weiss, V. A., Chubatsu, L. S., Pedrosa, F. O. and Souza, E. M. (2014) Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes, *BMC Genomics*, 15.
- Carraro, N., Forestan, C., Canova, S., Traas, J. and Varotto, S. (2006) ZmPIN1a and ZmPIN1b encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize, *Plant Physiol*, 142(1), pp. 254-64.
- Cassán, F., Bottini, R., Schneider, G. and Piccoli, P. (2001) *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* Hydrolyze Conjugates of GA₂₀ and Metabolize the Resultant Aglycones to GA₁ in Seedlings of Rice Dwarf Mutants¹, *Plant Physiol*, 125, pp. 2053–2058.
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C. and Luna, V. (2009) *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.), *Eur J Soil Biol*, 45(1), pp. 28-35.
- Chen, J. F. and Gallie, D. R. (2010) Analysis of the functional conservation of ethylene receptors between maize and *Arabidopsis*, *Plant Mol Biol*, 74(4-5), pp. 405-21.

- Choi, Y.-J., Aliota, M. T., Mayhew, G. F., Erickson, S. M. and Christensen, B. M. (2014) Dual RNA-seq of Parasite and Host Reveals Gene Expression Dynamics during Filarial Worm–Mosquito Interactions, *PLOS Neglect Trop D*, 8(5), pp. e2905.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szczesniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X. and Mortazavi, A. (2016) A survey of best practices for RNA-seq data analysis, *Genome Biol*, 17(1), pp. 13.
- Crépin, A., Barbey, C., Beury-Cirou, A., Hélias, V., Taupin, L., Reverchon, S., Nasser, W., Faure, D., Dufour, A., Orange, N., Feuilloley, M., Heurlier, K., Burini, J.-F. and Latour, X. (2012) Quorum Sensing Signaling Molecules Produced by Reference and Emerging Soft-Rot Bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.), *PLOS ONE*, 7(4), pp. e35176.
- Daly, P., van Munster, J. M., Kokolski, M., Sang, F., Blythe, M. J., Malla, S., Velasco de Castro Oliveira, J., Goldman, G. H. and Archer, D. B. (2017) Transcriptomic responses of mixed cultures of ascomycete fungi to lignocellulose using dual RNA-seq reveal inter-species antagonism and limited beneficial effects on CAZyme expression, *Fungal Genet Biol*, 102, pp. 4-21.
- Duarte, J. d. O., Garcia, J. C. and Miranda, R. A. (2015) Economia da produção. Sistemas de Produção: Cultivo do Milho. Brasília,DF: Embrapa Milho e Sorgo. Available at: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1gal1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8658.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D. and Glick, B. R. (2014) Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions, *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, pp. 85-125.
- Elmerich, C., De Zamaroczy, M., Arsène, F., Pereg, L., Paquelin, A. and Kaminski, A. (1997) Regulation of NIF Gene Expression and Nitrogen Metabolism in *Azospirillum*, *Soil Biol Biochem*, 29(5/6), pp. 847-852.
- Faleiro, A. L., Pereira, T. P., Espindula, E., Brod, F. C. A. and Arisi, A. C. M. 2013. Real time PCR detection targeting *nifA* gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. *Symbiosis*, 61(3), pp. 125-133.
- FAO (2016) *FAOSTAT*: United Nations. Available at: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE> (Accessed: 14/09/2018 2018).
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T. and Pennington, J. S. (1971) Stage of Development Descriptions for Soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill1, *Crop Sci*, 11, pp. 929-931.

- Fornasieri Filho, D. (1992) *A Cultura do Milho*. Jaboticabal: FUNEP.
- Förstner, K. U., Vogel, J. and Sharma, C. M. (2014) READemption—a tool for the computational analysis of deep-sequencing–based transcriptome data, *Bioinformatics*, 30(23), pp. 3421-3423.
- Hayden, K. J., Garbelotto, M., Knaus, B. J., Cronn, R. C., Rai, H. and Wright, J. W. (2014) Dual RNA-seq of the plant pathogen *Phytophthora ramorum* and its tanoak host, *Tree Genet Genomes*, 10(3), pp. 489-502.
- Hegedűs, Z., Zakrzewska, A., Ágoston, V. C., Ordas, A., Rácz, P., Mink, M., Spink, H. P. and Meijer, A. H. (2009) Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to mycobacterium infection, *Mol Immunol*, 46(15), pp. 2918-2930.
- Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka, M. (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants, *Trends Plant Sci*, 13(4), pp. 192-9.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. (1938) The water culture method for growing plants without soil, *Circular California Agricultural Experiment Station*, 347(Revised 1950), pp. 32
- Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M. and Pedrosa, F. O. (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil, *Plant Soil*, 331(1-2), pp. 413-425.
- Husnik, F. and McCutcheon, J. P. (2017) Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes, *Nature Rev Microbiol*, 16, pp. 67.
- Jahn, C. E., Charkowski, A. O. and Willis, D. K. (2008) Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation, *J Microbiol Meth*, 75(2), pp. 318-324.
- Junior, F. B. d. R., Machado, C. T. d. T., Machado, A. T. and Sodek, L. (2008) Inoculação de *Azospirillum amazonense* em Dois Genótipos de Milho sob Diferentes Regimes de Nitrogênio, *R. Bras. Ci. Solo*, 32, pp. 1139-1146.
- Kovalchuk, A., Zeng, Z., Ghimire, R. P., Kivimäenpää, M., Raffaello, T., Liu, M., Mukrimin, M., Kasanen, R., Sun, H., Julkunen-Tiitto, R., Holopainen, J. K. and Asiegbu, F. O. (2019) Dual RNA-seq analysis provides new insights into interactions between Norway spruce and necrotrophic pathogen *Heterobasidionan nosum* s.l, *BMC Plant Biol*, 19(1), pp. 2.
- LaMonte, G. M., Orjuela-Sanchez, P., Calla, J., Wang, L. T., Li, S., Swann, J., Cowell, A. N., Zou, B. Y., Abdel-Haleem Mohamed, A. M., Villa Galarce, Z. H., Moreno, M., Tong Rios, C., Vinetz, J. M., Lewis, N. and Winzeler, E. A. (2019) Dual RNA-seq identifies human mucosal immunity protein Mucin-13 as a hallmark of *Plasmodium* exoerythrocytic infection, *Nat Comm*, 10(1), pp. 488.

- Lanubile, A., Ferrarini, A., Maschietto, V., Delledonne, M., Marocco, A. and Bellin, D. (2014) Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to *Fusarium verticillioides* infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance, *BMC Genomics*, 15(1), pp. 710.
- Li, Y., Wang, W., Feng, Y., Tu, M., Wittich, P. E., Bate, N. J. and Messing, J. (2019) Transcriptome and metabolome reveal distinct carbon allocation patterns during internode sugar accumulation in different sorghum genotypes, *Plant Biotechnol J*, 17(2), pp. 472-487.
- Ljung, K. and et al. (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots, *Plant Cell*, 17, pp. 1090-1104.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P. and Sandberg, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth, *Plant*, 1(29), pp. 465-474.
- Machado, A. T., Sodek, L., Döbereiner, J. and Reis, V. M. (1998) Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint, *Pesq. Agropec. Bras.*, 33, pp. 961-970.
- Malhotra, M. and Srivastava, S. (2006) Targeted engineering of *Azospirillum brasilense* SM with indole acetamide pathway for indoleacetic acid over-expression, *Can J Microbiol*, 52(11), pp. 1078-1084.
- Malhotra, M. and Srivastava, S. (2008) An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion, *Antonie van Leeuwenhoek*, 93(4), pp. 425-433.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K.-i., Kamiya, Y. and Kasahara, H. (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*, *P Natl Acad Sci USA*, 108(45), pp. 18512-18517.
- Mateus, I. D., Masclaux, F. G., Aletti, C., Rojas, E. C., Savary, R., Dupuis, C. and Sanders, I. R. (2019) Dual RNA-seq reveals large-scale non-conserved genotype \times genotype-specific genetic reprogramming and molecular crosstalk in the mycorrhizal symbiosis, *ISME J*, 13(5), pp. 1226-1238.
- Mela, F., Fritsche, K., de Boer, W., van Veen, J. A., de Graaff, L. H., van den Berg, M. and Leveau, J. H. J. (2011) Dual transcriptional profiling of a bacterial/fungal confrontation: *Collimonas fungivorans* versus *Aspergillus niger*, *ISME J*, 5(9), pp. 1494-1504.

- Molina-Favero, C., Creus, C. M., Simontacchi, M., Puntarulo, S. and Lamattina, L. (2008) Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato, *Mol Plant Microbe In*, 21(7), pp. 1001-1009.
- Montoya, D. J., Andrade, P., Silva, B. J. A., Teles, R. M. B., Ma, F., Bryson, B., Sadanand, S., Noel, T., Lu, J., Sarno, E., Arnvig, K. B., Young, D., Lahiri, R., Williams, D. L., Fortune, S., Bloom, B. R., Pellegrini, M. and Modlin, R. L. (2019) Dual RNA-Seq of Human Leprosy Lesions Identifies Bacterial Determinants Linked to Host Immune Response, *Cell Rep*, 26(13), pp. 3574-3585.e3.
- Moon, J., Parry, G. and Estelle, M. (2004) The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Plant Development, *Plant Cell*, 16(12), pp. 3181.
- Mutha, N. V. R., Mohammed, W. K., Krasnogor, N., Tan, G. Y. A., Wee, W. Y., Li, Y., Choo, S. W. and Jakubovics, N. S. (2019) Transcriptional profiling of coaggregation interactions between *Streptococcus gordonii* and *Veillonella parvula* by Dual RNA-Seq, *Sci Rep - UK*, 9(1), pp. 7664.
- Nishimura, T., Hayashi, K., Suzuki, H., Gyohda, A., Takaoka, C., Sakaguchi, Y., Matsumoto, S., Kasahara, H., Sakai, T., Kato, J., Kamiya, Y. and Koshiba, T. (2014) Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis, *Plant J*, 77, pp. 352–366.
- Ona, O., Van Impe, J., Prinsen, E. and Vanderleyden, J. (2005) Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled, *FEMS Microbiol Lett*, 246(1), pp. 125-32.
- Oshlack, A., Robinson, M. D. and Young, M. D. (2010) From RNA-seq reads to differential expression results, *Genome Biol*, 11(12), pp. 220.
- Packard, H., Burke, A. K., Jensen, R. V. and Stevens, A. M. (2017) Analysis of the in planta transcriptome expressed by the corn pathogen *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* via RNA-Seq, *PeerJ*, 5(e3237).
- Pankievicz, V. C. S., Camilios-Neto, D., Bonato, P., Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M. Z., Faoro, H., Chubatsu, L. S., Donatti, L., Wajnberg, G., Passetti, F., Monteiro, R. A., Pedrosa, F. O. and Souza, E. M. (2016) RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots, *Plant Mol Biol*, 90(6), pp. 589-603.
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassan, F. D. and Luna, M. V. (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 75(5), pp. 1143-50.

- Petrova, O. E., Garcia-Alcalde, F., Zampaloni, C. and Sauer, K. (2017) Comparative evaluation of rRNA depletion procedures for the improved analysis of bacterial biofilm and mixed pathogen culture transcriptomes, *Sci Rep - UK*, 7, pp. 41114.
- Poletto, N. (2004) *Adição de carbono e nitrogênio e sua relação com os estoques no solo e com o rendimento do milho em sistemas de manejo*. Master, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- Pontiroli, A., Rizzi, A., Simonet, P., Daffonchio, D., Vogel, T. M. and Monier, J. M. (2009) Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplastomic tobacco, *Appl Environ Microbiol*, 75(10), pp. 3314-22.
- Qispe-Huamanquispe, D. G., Gheysen, G. and Kreuze, J. F. (2017) Horizontal Gene Transfer Contributes to Plant Evolution: The Case of *Agrobacterium* T-DNAs, *Front Plant Sci*, 8, pp. 2015.
- Racolta, A., Bryan, A. C. and Tax, F. E. (2014) The receptor-like kinases GSO1 and GSO2 together regulate root growth in *Arabidopsis* through control of cell division and cell fate specification, *Dev Dynam*, 243(2), pp. 257-278.
- Reeder, S. M., Palmer, J. M., Prokkola, J. M., Lilley, T. M., Reeder, D. M. and Field, K. A. (2017) *Pseudogymnoas cusdestructans* transcriptome changes during white-nose syndrome infections, *Virulence*, 8(8), pp. 1695-1707.
- Reynders, L. and Vlassak, K. (1979) Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense*, *Soil Biol Biochem*, 11(5), pp. 547-548.
- Ribaudo, C. M., Krumpholz, E. M., Cassán, F. D., Bottini, R., Cantore, M. L. and Curá, J. A. (2006) *Azospirillum* sp. Promotes Root Hair Development in Tomato Plants through a Mechanism that Involves Ethylene, *J Plant Growth Regul*, 25(2), pp. 175-185.
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R. and Martínez-Contreras, R. D. (2018) Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria, *Microbiol Res*, 208, pp. 85-98.
- Santos, M. F., Padua, V. L. M., Nogueira, E. M., Hemerly, A. S. and Domont, G. B. (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets, *J Proteomics*, 73(5), pp. 917-31.
- Schurch, N. J., Schofield, P., Gierlinski, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., Wrobel, N., Gharbi, K., Simpson, G. G., Owen-Hughes, T., Blaxter, M. and Barton, G. J. (2016) How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use?, *RNA*, 22(6), pp. 839-51.

- Simon, S. and Petrasek, J. (2011) Why plants need more than one type of auxin, *Plant Sci*, 180(3), pp. 454-60.
- Somasegaran, P. and Hoben, H. J. (1994) *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology*. New York, NY: Springer.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2010) Auxin and Plant-Microbe Interactions, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, (3 : a001438).
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, *FEMS Microbiol Rev*, 31(4), pp. 425-448.
- Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J. (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects, *FEMS Microbiol Rev*, 24, pp. 487-506.
- Tanimoto, M., Roberts, K. and Dolan, L. (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, 08, pp. 943-948.
- Thakare, D., Yang, R., Steffen, J. G., Zhan, J., Wang, D., Clark, R. M., Wang, X. and Yadegari, R. (2014) RNA-Seq analysis of laser-capture microdissected cells of the developing central starchy endosperm of maize, *Genomics Data*, 2, pp. 242-245.
- Tomas, A. and Perrot-Rechenmann, C. (2010) Recent progress in auxin biology, *Comptes Rendus Biologies*, 333(4), pp. 297-306.
- Tsuwamoto, R., Fukuoka, H. and Takahata, Y. (2008) GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos, *Plant J*, 54(1), pp. 30-42.
- Verna, J.P., Yadav, J., Tiwari, K. N., Singh, L. and Singh, V. (2010) Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Crop Production, *Int J Agric Res*, 5(11), pp. 954-983.
- Verwaaijen, B., Wibberg, D., Kröber, M., Winkler, A., Zrenner, R., Bednarz, H., Niehaus, K., Grosch, R., Pühler, A. and Schlüter, A. (2017) The *Rhizoctonia solani* AG1-IB (isolate 7/3/14) transcriptome during interaction with the host plant lettuce (*Lactuca sativa* L.), *PLOS One*, 12(5).
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nat Rev Genet*, 10(1), pp. 57-63.
- Weber, M. A. and Mielniczuk, J. (2009) Estoque e Disponibilidade de Nitrogênio no Solo em Experimento de Longa Duração, *R. Bras. Ci. Solo*, 33, pp. 429-437.

- Westermann, A. J., Förstner, K. U., Amman, F., Barquist, L., Chao, Y., Schulte, L. N., Müller, L., Reinhardt, R., Stadler, P. F. and Vogel, J. (2016) Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host–pathogen interactions, *Nature*, 529, pp. 496-501.
- Westermann, A. J., Gorski, S. A. and Vogel, J. (2012) Dual RNA-seq of pathogen and host, *Nat Rev Microbiol*, 10, pp. 618-630.
- Westermann, A. J. and Vogel, J. (2018) Host-Pathogen Transcriptomics by Dual RNA-Seq, *Bacterial Regulatory RNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Humana Press.
- Wolf, T., Philipp, K., Brunke, S. and Linde, J. (2018) Twos company: studying interspecies relationships with dual RNA-seq, *Curr Opin Microbiol*, 42, pp. 7–12.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J. and Zhao, Y. (2011) Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by Tryptophan Aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*, *P Natl Acad Sci USA*, 108(45), pp. 18518.
- Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. and He, Q.-Y. (2012) clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters, *OMICS*, 16(5), pp. 284-287.
- Yue, J., Hu, X. and Huang, J. (2014) Origin of plant auxin biosynthesis, *Trends Plant Sci*, 19(12), pp. 764-770.
- Zhao, Y. (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development, *Annu Rev Plant Biol*, 61, pp. 49-64.
- Zhao, Y. (2012) Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants, *Mol Plant*, 5(2), pp. 334-338.
- Zhao, Y. (2014) Auxin Biosynthesis, *The Arabidopsis Book*, pp. e0173.
- Zimmer, W., Wesche, M. and Timmermans, L. (1998) Identification and Isolation of the Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene from *Azospirillum brasilense* Sp7: Sequencing and Functional Analysis of the Gene Locus, *Curr Microbiol*, 36(6), pp. 327-331.