

UFRRJ

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

TESE

**Genômica Funcional da Bactéria Fixadora de
Nitrogênio *Nitrospirillum amazonense* em Interação
com o Fluido do Apoplasto de Cana-de-açúcar:
Abordagens Transcriptômica e Proteômica**

Leonardo Araujo Terra

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA.**

**GENÔMICA FUNCIONAL DA BACTÉRIA *NITROSPIRILLUM
AMAZONENSE* EM INTERAÇÃO COM O FLUIDO DO APOPLASTO
DE CANA-DE-AÇÚCAR: ABORDAGENS TRANSCRIPTÔMICA E
PROTEÔMICA**

LEONARDO ARAUJO TERRA

Sob Orientação do Professor
Stefan Schwab

e Co-orientação da Pesquisadora
Márcia Soares Vidal

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. Área de concentração: Agrobiologia.

Seropédica, RJ
Abril, 2018

T324g	<p>Terra, Leonardo Araujo, 1980- Genômica Funcional da Bactéria fixadora de Nitrogênio <i>Nitrospirillum amazonense</i> em Interação com o Fluido do Apoplasto de Cana-de-açúcar: Abordagens Transcriptômica e Proteômica / Leonardo Araujo Terra. - 2018. 130 f.</p> <p>Orientador: Stefan Schwab. Coorientador: Marcia Soares Vidal. Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, PPGCTIA, 2018.</p> <p>1. Transcriptômica. 2. Proteoma. 3. Interação bactéria-planta. I. Schwab, Stefan, 1975-, orient. II. Vidal, Marcia Soares, 1973-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PPGCTIA. IV. Título.</p>
-------	--

É permitida cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
AGROPECUÁRIA**

LEONARDO ARAUJO TERRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de Concentração em Agrobiologia.

TESE APROVADA EM 27/04/2018

Stefan Schwab. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Verônica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia

Gonçalo Apolinario de Souza Filho. Dr. UENF

Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses. Dr. UEPB

Marcelo de Freitas Lima. Dr. UFRRJ

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro”.

[O encontro marcado] – Fernando Sabino.

Aos meus pais: Maria de Fátima Araujo Terra e Sebastião Cardozo Terra (*in memoriam*).

A minha esposa, Priscila e meu querido filho Bento.

Dedido

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha caminhada até aqui.

Ao meu tão amado Pai Seu Sebastião (*in memoriam*) sempre tão carinhoso que me incentivou a buscar sempre os meus objetivos, Saudades Paizinho. E a minha mãe Fátima, Te amo.

À minha esposa, pela paciência, carinho e amor. Os dias contigo são sempre os melhores.

Ao meu filhinho Bento que acabou de chegar, um dia você vai ler isso.

Ao meu orientador Stefan Schwab, pela grande orientação e pela vontade incasável de fazer ciência, isso contagia. Sem você nunca teria conseguido, muito obrigado.

À minha co-orientadora Marcia Vidal pelas discussões e por sempre me ajudar.

Ao Dr. Ivo Baldani, pelas orientações e sugestões.

Aos meus amigos do Laboratório e Genética de Bioquímica pelo convívio, vocês são os melhores. Em especial Cleiton, Paula, Jéssica.

As analistas do laboratório, por sempre ter o reagente quando precisei. Obrigado.

Ao amigo Baraúna por ajudar nos meus experimentos, você não tinha obrigação alguma, mesmo assim, ajudou.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária – PPGCTIA.

Á todos os docentes e Coordenadores do PPGCTIA.

A todos os amigos e familiares que torceram ou contribuíram para conclusão deste trabalho.

A CAPES pelo apoio e bolsa concedida.

BIOGRAFIA

Leonardo Araujo Terra, filho de Maria de Fátima Araujo Terra e Sebastião Cardozo Terra, nasceu na cidade do Rio de Janeiro – RJ em 28 de maio de 1980. No ano de 2008 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde obteve o título de Bacharel em Ciências Biológicas em 2013. Em 2014 iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária – PPGCTIA da UFRRJ.

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

cDNA	DNA complementar
CDS	sequências codificantes
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups</i>
DGE	eletroforese em gel bidimensional
EPS	exopolissacarídeos
FBN	fixação biológica de nitrogênio
LGI-A	tratamento experimental contendo apoplasto
LGI-C	controle experimental somente com LGI
MCP's	proteína de quimiotaxia metil-receptora
N	nitrogênio
N ₂	nitrogênio molecular
Pb	pares de base nitrogenada
PDE	proteínas diferencialmente expressos
PGPR	rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
PHB	polihidroxibutirato
PSP	<i>phage shock protein</i>
RND	resistence-nodulation-division
RPKM	<i>reads per kilobase per million</i>
RTTL	reguladores transcricionais tipo LysR
Tat	<i>twin arginine translocation</i>
TDE	transcritos diferencialmente expressos
TDTB	transportadores dependents de TonB

RESUMO

TERRA, Leonardo Araujo. **Genômica funcional da bactéria *Nitrospirillum amazonense* em interação com o fluido do apoplasto de cana-de-açúcar: Abordagens transcriptômica e proteômica.** 2018. 130f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária). Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Nitrospirillum amazonense é uma bactéria fixadora de nitrogênio isolada de várias plantas, como arroz, milho, sorgo e cana-de-açúcar. A estirpe CBAmC de *N. amazonense* foi isolada de colmos de cana-de-açúcar variedade CB45-3 e tem sido relatado que esta bactéria promove o crescimento da variedade de cana RB867515, quando inoculada em condições de campo em consórcio com outras quatro bactérias fixadoras de nitrogênio. O apoplasto de cana-de-açúcar representa um provável nicho para o estabelecimento de várias bactérias, entre elas a *N. amazonense*. O presente trabalho teve por objetivo acessar a influência do fluido apoplástico da cana-de-açúcar sobre os perfis transcriptômico e proteômico globais. A bactéria foi cultivada em meio de cultura padrão LGI na presença ou ausência do fluido do apoplasto. Foram coletadas amostras na metade da fase exponencial de crescimento para extração de RNA e de proteínas. O RNA total foi extraído com tratamento de trizol em temperatura de 65°C e utilizado método de sequenciamento de alto rendimento (RNA-Seq). O extrato proteico foi obtido por sonicação e utilizado espectrometria de massa em tandem por cromatografia líquida (LC-MS/MS). A análise comparativa entre os perfis transcriptômico e proteômico mostrou forte consistência entre os resultados das duas abordagens. A análise de dados revelou que os níveis de expressão dos transcritos relacionados com quimiotaxia, biossíntese de flagelos bacterianos e transportadores TonB foram fortemente subexpressos na presença do fluido do apoplasto. Em contraste, no metabolismo de geração de energia, os níveis de expressão dos genes envolvidos no ciclo do Krebs foram superexpressos. Além disso, genes envolvidos com resposta a estresse osmótico e oxidativo e com transportadores efluxos multidrogas RND foram fortemente superexpressos, conforme detectado no transcriptoma e proteoma em presença do fluido. Em conclusão, os resultados mostraram que o estado metabólico de *N. amazonense* durante o cultivo do apoplasto é direcionado para proteínas capazes de suportar a adaptação em um novo ambiente complexo como o apoplasto da cana-de-açúcar. A investigação de análise comparativa entre o transcriptômica e proteoma na interação com o fluido de apoplasto ampliará uma melhor compreensão da interação entre a planta e a bactéria orientando futuros estudos com a estirpe CBAmC bem como o potencial desenvolvimento de um inoculante para a cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Transcriptômica. Proteoma. Interação bactéria-planta.

ABSTRACT

TERRA, Leonardo Araujo. **Functional genomics of nitrogen-fixing bacteria *Nitrospirillum amazonense* in interaction with sugarcane apoplast fluid: transcriptomic and proteomic approaches.** 2018. 130p. Thesis (Doctorate in Science, Technology and Innovation in Agriculture). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Nitrospirillum amazonense is a nitrogen-fixing bacterium isolated from several plants, such as rice, corn, sorghum and sugar cane. The CBAmC strain of *N. amazonense* was isolated from sugarcane stalks CB45-3 variety and it has been reported that this bacterium promotes the growth of the sugarcane variety RB867515 when inoculated under field conditions in consortium with four other bacteria nitrogen. The sugarcane apoplast represents a probable niche for the establishment of several bacteria, among them *N. amazonense*. The present work had the objective of accessing the influence of the sugarcane apoplastic fluid on the global transcriptomic and proteomic profiles. The bacterium was cultured in standard LGI culture medium in the presence or absence of apoplast fluid. Samples were collected in the middle of the exponential growth phase for extraction of RNA and proteins. Total RNA was extracted with trizol treatment at a temperature of 65°C and a high-throughput sequencing method (RNA-Seq) was used. The protein extract was obtained by sonication and tandem mass spectrometry was used by liquid chromatography (LC-MS / MS). The comparative analysis between the transcriptome and proteome profiles showed strong consistency between the results of the two approaches. Data analysis revealed that expression levels of transcripts related to chemotaxis, bacterial flagella biosynthesis and TonB transporters were strongly repressed in the presence of apoplast fluid. In contrast, in energy-generating metabolism, the expression levels of the genes involved in the Krebs cycle were induced. In addition, genes involved in response to osmotic and oxidative stress, RND multidrug efflux transporters were strongly overexpressed, as detected in the transcriptome and proteome in the presence of the fluid. In conclusion, the results showed that the metabolic state of *N. amazonense* during apoplast culture is directed to proteins capable of supporting adaptation in a new complex environment such as sugarcane apoplast. The investigation of comparative analysis between the transcriptome and proteome in the interaction with the apoplast fluid will expand a better understanding of the interaction between the plant and the bacterium guiding future studies with the CBAmC strain as well as the potential development of an inoculant for the cane-sugar.

Key-words: Transcriptome. Proteome. Bacteria-plant interaction.

RESUMEN AMPLIADO

TERRA, Leonardo Araujo. **Genómica funcional de bacteria fijadora de nitrógeno *Nitrospirillum amazonense* en interacción con el fluido de apoplasto de la caña de azúcar: enfoques transcriptômica y proteômica**. 2018. 130f. Tesis (Ciencia, Tecnología e Innovación en la Agricultura). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

1. Introducción

La especie *Nitrospirillum amazonense*, anteriormente *Azospirillum amazonense*, fue descrita en 1983 por Magalhães (1983) y aislada de gramíneas forrajeras cultivadas en la Amazonia y en el Estado de Río de Janeiro y posteriormente de plantas de arroz, maíz y sorgo cultivadas en En el presente trabajo se analizaron los resultados obtenidos en el análisis de los resultados obtenidos en el estudio de los resultados obtenidos en el estudio. La distribución ecológica fue posteriormente confirmada por la detección de bacterias en otras gramíneas, como raíces y colmos en la caña de azúcar en Brasil y raíces de caña de azúcar en Hawái y Thailand (BALDANI & BALDANI et al., 2005; BALDANI et al. (en el caso de las mujeres). *N. amazonense* (clase α -proteobacterias), abarca bacterias asociativas que pueden mejorar el crecimiento de vegetales de importancia económica. Estos microorganismos se consideran bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP). Varios aspectos de su fisiología están relacionados con efectos de crecimiento en las plantas, como la producción de fitohormonios, tales como auxinas y giberelinas y capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. La estirpe CBAmC de *N. amazonense* fue aislada de colmos de caña de azúcar variedad CB45-3 y abarca bacterias asociativas que pueden mejorar el crecimiento de vegetales de importancia económica. Se ha reportado que esta bacteria promueve el crecimiento de plantas de arroz en condiciones de vegetación (RODRIGUES et al., 2008) y de caña de azúcar variedad RB867515 cuando inoculada en condiciones de campo (OLIVEIRA et al., 2002, 2008). El respaldo de caña de azúcar representa un probable nicho para el establecimiento de varias bacterias, entre ellas el *N. amazonense*.

2. Material y Métodos

El líquido del apoplasto de caña de azúcar se obtuvo según lo descrito por Dong et al., (1994), utilizando la variedad comercial RB 867515 (responsable de la inoculación en términos de productividad) (REIS et al., 2009) en el campo experimental de la Embrapa Agrobiología (Seropédica - RJ) con 12 meses de cultivo. El fluido del apoplasto fue esterilizado en un filtro de 0,22 μm de porosidad, y almacenado a -20°C .

Nitrospirillum amazonense estirpe CBAmC fue inoculada en erlenmeyers de 125 mL con volumen de medio de cultivo de 25 mL. Los erlenmeyers fueron mantenidos en incubadora a una temperatura de 30°C y rotación orbital de 180 RPM. Al llegar a la mitad de la fase exponencial se añadieron partes iguales de medio líquido LGI y fluido de apoyo estéril para el control y tratamiento, respectivamente. Todos los tratamientos fueron en triplicada biológica. Después de dos horas de la aplicación del ensayo experimental se tomaron muestras para la extracción de ARN y proteínas.

Para la extracción de ARN se recogieron 5 mL de suspensión bacteriana para la extracción de ARN y centrifugados inmediatamente a 5000 xg durante 2 min a 4°C e inmediatamente se realizó la extracción de RNA total con trizol calentado a 65°C y el cDNA secuenciado de acuerdo con protocolo Ion PITM Secuencia 200 Kit v2. Para la extracción proteica fueron recolectados 40 mL de suspensión bacteriana y centrifugadas a 8.000 xg por 5 min a 4°C para la sedimentación de las células. Las proteínas fueron obtenidas por el método

de lisis por sonicación, analizado e identificado a través de espectrometría de masa en tándem acoplada a la cromatografía líquida (LC-MS / MS).

3. Resultados y Discusión

El análisis del transcriptómica identificó 1639 transcritos diferencialmente expresados representando un total del 26,3% del genoma de *N. amazonense* cepa CBAmC, de los cuales el 12,28% (764) transcritos fueron superexpresos y el 14,02% (867) transcritos fueron subexpresos. En este análisis las categorías "transcripción" y "modificación post-traducción, reciclaje de proteínas y chaperonas" fueron superexpresas, mientras que las categorías "mecanismos de transducción de señales", "motilidad celular" fueron subexpresos.

El análisis proteómico identificó 72 proteínas subexpresas y 82 proteínas superexpresas. Para las proteínas superexpresas, las categorías que se destacaron fueron "modificación post-traducción, reciclaje de proteínas y chaperonas" y "transcripción" y para las proteínas subexpresas fueron "biogénesis de la pared / membrana / sobre celular" y mecanismos de transducción de señales " .

El análisis comparativo entre los perfiles de transcriptómica y proteómica mostraron una fuerte consistencia entre los resultados de los dos enfoques. Los datos de este análisis revelaron chaperonas y transportadores efluentes multidrogas RND fueron superexpresos, mientras que los transportadores dependientes de TonB fueron subexpresos.

4. Conclusiones

Los resultados mostraron que el estado metabólico de *N. amazonense* durante el cultivo en presencia de apoplasto se dirige a proteínas capaces de soportar la adaptación en un ambiente complejo como el apoplasto de la caña de azúcar. El análisis comparativo del transcriptómica y proteoma orientará estudios futuros con la estirpe CBAmC, así como el potencial de desarrollo de un inoculante para caña de azúcar.

Palabras clave: Transcriptómica. Proteoma. Interacción bacteria-planta.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Apresentação esquemática do simplasto e apoplasto. Plasmodesmas conectam células vizinhas para formar o simplasto. Os espaços extracelulares entre as paredes celulares formam o apoplasto.....4
- Figura 2.** *Azospirillum brasilense* Sp245 colonizando o apoplasto. Setas pretas indicam a localização de bactérias. Adaptado de Hartmann e colaboradores, 1998.....5
- Figura 3.** Sítios de colonização de bactérias endofíticas na planta. As bactérias endofíticas formam colônias na superfície das raízes, podendo penetrar na planta através de ferimentos naturais ou de rachaduras que se formam na coifa ou em locais de emergência das raízes laterais (Adaptado de REINHOLD-HUREK, 1998 e HARDOIM et al., 2008).....6
- Figura 4.** Desenho experimental para obtenção das amostras de células cultivadas na presença do controle (LGI-C) e fluido do apoplasto (LGI-A).....15
- Figura 5.** Perfis de crescimento de *N. amazonense* em sete condições diferentes de cultivo em função dos valores obtidos pela densidade ótica, ao longo de 257 horas de incubação a 30 °C e 180 rpm.....25
- Figura 6.** Variação do pH no meio de cultura de *N. amazonense*, de acordo com a composição inicial do meio, ao longo de 257 horas de incubação a 30° C e 180 rpm.....26
- Figura 7.** Perfil de crescimento de *N. amazonense* em meio LGI + 10 mM de glutamato de sódio, em função dos valores obtidos para densidade óptica e unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹), ao longo de 53 horas de incubação a 30° C e 180 RPM. Seta 1 – Aplicação dos tratamentos 27 horas após a inoculação. Seta 2 – Coleta do RNA e Proteínas. UFC: unidades formadoras de colônias; DO: densidade ótica.....27
- Figura 8.** Perfil de restrição dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA da estirpe CBAmC. *TaqI* e *DdeI* foram usadas na primeira e segunda banda de cada amostra, respectivamente. Legendas: M. 50 pb DNA Step Ladder, código G4521, Promega. LGI-C: 1A, 1B, 1C; LGI-A: 2A, 2B, 2C.....28
- Figura 9.** Integridade das amostras de RNA total purificado de células sem a presença do apoplasto (canaletas 1A a 1C) e com a presença do apoplasto (2A a 2C). As bandas correspondem ao rRNA 23S e 16S (de cima para baixo). (M. Padrão molecular 1 kB RNA Century Marker-Plus ladder, código AM7145, ThermoFisher Scientific29
- Figura 10.** Avaliação da integridade do RNA total no Bioanalyzer (Agilent Technologies). Em A, está representada a separação das amostras de RNA total por eletroforese no *Agilent Bioanalyzer*. A coluna S representa a estimativa do tempo de corrida, a coluna M representa o marcador de tamanho, as amostras de RNA total purificadas de células sem a presença do apoplasto (colunas 1A a 1C) e com a presença do apoplasto (2A a 2C). Em B, correspondem à emissão de fluorescência medida durante a eletroforese das amostras, onde o eixo y exibe as unidades de fluorescência medidas e o eixo x o tempo da corrida em segundos. Os picos maiores apresentados na figura correspondem à fluorescência medida para o rRNA 16S e 23S, da esquerda para a direita. N/D: Não determinado.....30
- Figura 11.** Análise de qualidade das leituras em triplicata das seis bibliotecas sequenciadas. No eixo X têm-se as posições das leituras (pb) e no eixo Y tem-se o valor Phred associado para estas posições. A região verde, laranja e rosa correspondem a valores

Phred ótimo, subótimo e inapropriado, respectivamente. As barras amarelas correspondem a variação de qualidade em relação à posição de pb, sendo a linha vermelha, a mediana. A linha azul representa o valor da qualidade média.....31

Figura 12. Análise dos componentes principais construído com os valores dos níveis de expressão em RPKM da análise transcriptômica de *N. amazonense* estirpe CBAmC em duas condições de cultivo. O eixo X indica o componente principal 1 e o eixo Y indica o principal componente 2. Círculos verdes e vermelhos representam os tratamentos LGI-C e LGI-A, respectivamente.....32

Figura 13. Gráfico do tipo Volcano Plot mostrando diferença de expressão de transcritos em células de *N. amazonense* estirpe CBAmC. O eixo horizontal é o fold-change entre os tratamentos em Log₂ e o eixo vertical representa o valor de p ajustados para -Log₁₀. Os pontos acima da linha tracejada indicam valores de p < 0,05. Os pontos vermelhos indicam os transcritos subexpressos (mudança de expressão < -2 vezes), os pontos verdes indicam os transcritos superexpressos (mudança de expressão > 2 vezes), os pontos pretos indicam os transcritos não regulados e os pontos pretos não indicam mudança significativa.....33

Figura 14. Distribuição de transcritos diferencialmente expressos com valor de p < 0,05 para diferentes métodos estatísticos.....34

Figura 15. Matriz de correlação entre as réplicas biológicas e dendrograma de acordo com a identificação dos transcritos diferencialmente expressos com valor p ≤ 0,05. LGI-C: 1A, 1B, 1C. LGI-A: 2A, 2B, 2C.....34

Figura 16. Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos de acordo com a categorização do COG. Legenda: [C], produção e conversão de energia; [D], controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossômica; [E], transporte e metabolismo de aminoácidos; [F], transporte e metabolismo de nucleotídeos; [G], transporte e metabolismo de carboidratos; [H], transporte e metabolismo de coenzimas; [I], transporte e metabolismo de lipídios; [J], tradução, estrutura ribossômica e biogênese; [K], transcrição; [L], replicação, recombinação e reparo de DNA; [M], biogênese da parede / membrana / envelope celular; [N], motilidade celular; [O], modificação pós-tradução, reciclagem de proteínas e chaperonas; [P], transporte e metabolismo de íons inorgânicos; [Q], biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; [R], supostas funções gerais; [S], função desconhecida; [T], mecanismos de transdução de sinais; [U], tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; [V] mecanismos de defesa; [N / A], não classificado.....35

Figura 17. Matriz de correlação entre as réplicas biológicas e dendrograma de acordo com a identificação das proteínas diferencialmente expressas com valor p < 0,05. LGI-C: 1A, 1B, 1C. LGI-A: 2A, 2B, 2C.....36

Figura 18. Gráfico do tipo Volcano Plot de proteínas diferencialmente expressas em células de *N. amazonense* estirpe CBAmC. O eixo horizontal representa as variações nos níveis de expressão (*fold-change*) entre os tratamentos em escala logarítmica na base 2, enquanto o eixo vertical representa os respectivos valores p ajustados em escala logarítmica negativa na base 10. Os pontos acima da linha tracejada indicam valores de p < 0,05. Os pontos vermelhos indicam as proteínas subexpressas (mudança nos níveis de expressão < -1,5 vezes), os pontos verdes indicam as proteínas superexpressas (mudança nos níveis de expressão > 1,5 vezes) e os pontos pretos indicam que não houve mudança estatisticamente significativa nos níveis de expressão.....36

Figura 19. Distribuição das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a categorização do COG. Legenda:[C], produção e conversão de energia; [D], controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossômica; [E], transporte e metabolismo de aminoácidos; [F], transporte e metabolismo de nucleotídeos; [G], transporte e metabolismo de carboidratos; [H], transporte e metabolismo de coenzimas; [I], transporte e metabolismo de lipídios; [J], tradução, estrutura ribossômica e biogênese; [K], transcrição; [L], replicação, recombinação e reparo de DNA; [M], biogênese da parede / membrana / envelope celular; [N], motilidade celular; [O], modificação pós-tradução, reciclagem de proteínas e chaperonas; [P], transporte e metabolismo de íons inorgânicos; [Q], biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; [R], supostas funções gerais; [S], função desconhecida; [T], mecanismos de transdução de sinais; [U], tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular; [V] mecanismos de defesa; [N / A], não classificado.....37

Figura 20. Comparação entre os resultados das análises transcriptômica e proteômica diferencial de *Nitrospirillum amazonense* cultivada no fluido de apoplasto de cana-de-açúcar. A) Diagrama de Venn para o número de proteínas superexpressas (> 1,5 vezes); proteínas subexpressas (< -1,5 vezes); transcritos superexpressos (> 2,0 vezes); transcritos subexpressos (< -2,0 vezes). (B) Parcelas de dispersão de 88 “transcritos e proteínas” referentes as interseções do diagrama de Venn, com 80 “transcritos e proteínas” que apresentam padrões coincidentes de expressão (ambos super- ou subexpressos) e 8 “transcritos e proteínas” com padrões opostos de expressão. Círculos verdes: transcritos e proteínas superexpressos; círculos vermelhos: transcritos e proteínas subexpressos; círculos laranjas: transcritos superexpressos e proteínas subexpressas; círculos amarelos: transcritos subexpressos e proteínas superexpressas.....38

Figura 21. Diagrama de cordas mostrando transcritos e proteínas que foram diferencialmente expressos de acordo com os resultados das análises transcriptômica e proteômica da *N. amazonense* cultivada no líquido do apoplasto. Os retângulos à esquerda indicam se um gene ou proteína foi diferencialmente expresso. As conexões (cordas) esquerda-direita indicam associações de genes com os termos de ontologia gênica pelo Blast2Go. As estrelas são representadas pela formação de agrupamentos. As letras entre parênteses são fornecidas pela análise de ontologia gênica pelo servidor WebMGA.....39

Figura 22. Motilidade de *N. amazonense* CBAmC em semi-sólido LGI na ausência (A) ou presença (B) de fluido de apoplasto incubado em temperatura de 30°C durante 24 horas.....40

Figura 23. Análise transcriptoma de genes envolvidos na montagem flagelar e na via de sinalização de quimiotaxia de *N. amazonense* CBAmC cultivada durante duas horas no fluido do apoplasto.....43

Figura 24. Desenho esquemático de proteínas constituintes dos sistemas de secreção em *Nitrospirillum amazonense*. Os genes que estão em caixa verde, vermelha e cinza indicam que foram superexpressos, subexpressos e não validados estatisticamente, respectivamente.....45

Figura 25. Quadro geral das principais vias metabólicas de genes e proteínas de *Nitrospirillum amazonense* CBAmC diferencialmente expressos cultivada na presença do fluido de apoplasto da cana-de-açúcar RB867515. A linha contínua verde indica superexpressão e a linha vermelha tracejada subexpressão.....57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características químicas do líquido do apoplasto utilizado no cultivo da estirpe CBAmC.....	28
Tabela 2. Estatística das sequências obtidas das bibliotecas transcriptômicas utilizando o programa CLC Genomics Workbench.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A Importância da Cana-de-açúcar no Brasil	3
2.2 Apoplasto em Plantas Superiores e na Cana-de-açúcar	4
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)	7
2.4 FBN em Gramíneas e na Cana-de-açúcar	8
2.5 <i>Nitrospirillum amazonense</i>	9
2.6 Aplicações da Abordagem Transcriptômica para Avanços de Conhecimento sobre a Interação Planta-bactéria	10
2.7 Aplicações da Abordagem Proteômica para Avanços de Conhecimento sobre a Interação Planta-bactéria	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Obtenção do Líquido do Apoplasto de Cana-de-açúcar	12
3.2 Estirpe, Meios, Condições de Cultivo	12
3.3 Ensaio de Motilidade Bacteriana em Meio Semi-sólido e Extração Proteica	13
3.4 Análises Químicas do Fluido do Apoplasto	13
3.5 Extração e Avaliação de DNA Genômico de <i>Nitrospirillum amazonense</i> Estirpe CBAmC	13
3.5.1 Extração de DNA para sequenciamento PacBio	13
3.5.2 Extração de DNA	13
3.5.3 Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA)	14
3.5.4 Digestão de DNA por enzimas de restrição	14
3.6 Eletroforese	14
3.6.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose	14
3.6.2 Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante	14
3.7 Coleta de Material para as Análises de Transcriptômica e Proteoma	15
3.8 Transcriptômica	16
3.8.1 Obtenção das amostras	16
3.8.2 Sequenciamento	19
3.8.3 Pré-processamento Ion Proton	19
3.8.4 Mapeamento das leituras do Ion Proton	20
3.9 Análises Estatísticas	20
3.10 Proteômica	20
3.10.1 Obtenção das amostras	20
3.10.2 Bioinformática	22
3.11 Análises de Genes Ortólogos	22
3.12 Análise de correlação entre Transcriptômica e Proteoma	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Perfil de Crescimento	24
4.2 Perfil Químico do Líquido do Apoplasto da Cana-de-açúcar RB867515	27
4.3 Confirmação da Identidade de <i>Nitrospirillum amazonense</i> estirpe CBAmC	28
4.4 Qualidade das Amostras de RNA	29
4.5 Genoma da Estirpe CBAmC	30
4.6 Transcriptoma em Presença do Fluido do Apoplasto	30
4.7 Análise Proteômica	35
4.8 Comparação entre os Resultados de Transcriptômica e Proteômica	38

4.9	Ontologia dos Genes Diferencialmente Expressos	38
4.10	Ensaio de Motilidade Bacteriana.....	39
6.	CONCLUSÕES.....	56
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9.	ANEXOS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos são normalmente encontrados em regiões intercelulares internas à epiderme de vários tecidos das plantas, incluindo folhas, tubérculos, raízes e frutos. Nestes locais, conhecidos como sítios endofíticos, as bactérias endofíticas podem estimular o crescimento vegetal e contribuir para a nutrição de seu hospedeiro. Esses microrganismos ao colonizar o hospedeiro podem ter acesso a nutrientes e água mais facilmente em comparação àqueles que colonizam a superfície, além de serem menos afetados por flutuações ambientais (HALLMAN et al., 2001).

A espécie *Nitrospirillum amazonense* (classe alfa-proteobactérias) abrange bactérias associativas que podem melhorar o crescimento de vegetais de importância econômica, principalmente cereais. Estes microrganismos são considerados bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). Vários aspectos de sua fisiologia estão relacionados com efeitos de crescimento nas plantas, como a produção de fitohormônios, tais como auxinas e giberelinas e capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (BASHAN e BASHAN, 2010).

A bactéria *N. amazonense* foi inicialmente isolada de gramíneas forrageiras cultivadas na Amazônia e no estado do Rio de Janeiro (MAGALHÃES et al., 1983). Posteriormente, também foi isolada de plantas de arroz, milho e sorgo cultivadas em Seropédica-RJ, além de cana-de-açúcar no Havaí e na Tailândia, de palmeiras na região amazônica e também de abacaxi e banana. A inoculação de *N. amazonense* estirpe CBAmC em consórcio com outras quatro espécies endofíticas tem demonstrado o potencial de promover o crescimento de cana-de-açúcar e aumentar sua produtividade (OLIVEIRA et al., 2002).

Muitos efeitos positivos da estirpe CBAmC já foram descritos (RODRIGUES et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2008), porém, muitos aspectos de sua interação com a planta hospedeira precisam ser elucidados, como, por exemplo, o mecanismo de colonização e invasão dos tecidos vegetais e as vias metabólicas da bactéria envolvidas na interação com o vegetal. Logo, é importante estudar os genes relacionados à adaptação nas plantas e entender melhor os perfis de transcrição e tradução globais em *N. amazonense* cultivada na presença de fluido do apoplasto de cana-de-açúcar.

Diversas abordagens transcriptômicas foram reportadas como análise do transcriptoma da bactéria rizosférica *Azospirillum lipoferum* 4B associada às raízes de arroz (DROGUE et al., 2014) e às raízes de cana-de-açúcar colonizadas pela bactéria *Burkholderia* Q208 (PAUNGFOO-LONHIENE et al., 2016). A análise transcricional dupla de RNA-seq de raízes de trigo colonizadas por *A. brasilense* revelou uma mudança notável nos níveis de expressão de genes envolvidos na atividade de transporte no trigo, refletindo em um efeito direto na absorção de nutrientes, como o nitrogênio, além da divisão celular e a replicação de DNA (CAMILIOS-NETO et al., 2014).

A abordagem proteômica permite a identificação de proteínas expressas em uma determinada condição. Em interações planta-bactéria, a *Rhizobium leguminosarum* em contato com hidroxiflavona apresentou regulação positiva em proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, flagelos e energia (GUERREIRO et al., 1997). Após 21 dias em contato simbiótico com a soja, a *Bradyrhizobium japonicum* apresentou proteínas envolvidas na tradução, regulação pós-transducional e complexo nitrogenase (DELMOTTE et al., 2009).

Como hipótese científica propõe que, em *N. amazonense* estirpe CBAmC, o fluido de apoplasto de cana-de-açúcar afeta, em termos de transcritos e proteínas, os níveis de expressão de genes potencialmente envolvidos com a colonização daquele nicho na planta hospedeira.

Na busca de entender determinadas vias metabólicas e sistemas biológicos na interação planta-bactéria, as técnicas transcriptômica e proteômica auxiliam para a elucidação durante o processo de interação biológica bacteriana e vegetal direcionando para estudos mais específicos. Este trabalho teve por objetivo avaliar e correlacionar os perfis de transcrição e tradução globais de *N. amazonense* cultivada na presença do fluido de apoplasto da cana-de-açúcar RB867515.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Importância da Cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) era conhecida até recentemente como um membro da família das gramíneas pela classificação taxonômica antiga de Engler (1887). Novos estudos taxonômicos de Cronquist (1981) determinaram ser ela uma representante da família Poaceae, mantendo-se as demais denominações abaixo na chave taxonômica (tribo, subtribo, gênero e espécie). É uma planta perene e própria de climas tropicais e subtropicais. Há várias espécies pertencentes ao gênero *Saccharum*: *S. officinarum*, L., *S. spontaneum* L., *S. robustum* J., *S. sinnensis* R., *S. barberi* J. Diversos pesquisadores afirmam que *S. sinense* e *S. barberi* são originárias de retro cruzamento de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, mas as variedades hoje em cultivo comercial são híbridas de várias espécies (CLAYTON & DANIELS, 1975).

Os relatos mais antigos da introdução da cana-de-açúcar no país ocorreram em 1502, com o cultivo de mudas originárias da Ilha da Madeira (CORRÊA, 1926). Entretanto, foi a partir de 1532 que a cana-de-açúcar foi efetivamente cultivada comercialmente na Capitania de São Vicente, São Paulo, sob a liderança de Martim Afonso de Souza (DE CARLI, 1936).

Ao longo de séculos, diversas variedades de cana-de-açúcar foram introduzidas no Brasil visando à resistência a doenças e produtividade da cana-de-açúcar. Somente no século XIX se deu início ao melhoramento genético da planta, tendo o primeiro registro no Brasil, o trabalho de Gervásio Caetano Peixoto Lima, de 1842 com o trabalho de sementes férteis de cana-de-açúcar.

Atualmente, a planta é bastante difundida no país e representa a principal matéria-prima para a fabricação do açúcar, etanol, aguardente, açúcar mascavo, rapadura, melado, e também, na alimentação animal. A produção de cana-de-açúcar na safra 2017/2018 está estimada em 646,4 milhões de toneladas, com redução de 1,7% em relação à safra anterior. A área a ser colhida prevista deverá ficar em 8,77 milhões de hectares, redução prevista de 3,1% se comparada com a safra de 2016/17. A estimativa na produção de açúcar deve atingir 39,4 milhões de toneladas, com aumento de 1,8% da última safra. A produtividade de etanol foi de 15,02 bilhões de litros, com queda de 10,2%. A produção de etanol anidro deverá ter aumento de 0,2%, estimativa em 11,1 bilhões de litros. Para a produção de etanol hidratado a estimativa é de 18,19 bilhões de litros, aumento de 7,4% ou 1,25 bilhões de litros. Os maiores produtores são os estados de São Paulo, seguido Goiás e Minas Gerais. (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB, 2017).

No Brasil, são aplicados, em média, 45 kg.ha⁻¹ de N na cana planta e 80 kg ha⁻¹ nas socas, ao passo que o acúmulo de N total nas folhas verdes e secas e nos colmos pode chegar a 260 kg ha⁻¹ na cana-planta (VITTI et al., 2011) e, em média, a 120 kg ha⁻¹ nas socas (VITTI et al., 2008; BAPTISTA et al., 2014).

NEVES et al. (2010) fizeram levantamento da cadeia produtiva de açúcar e álcool no Brasil e constataram que a cana-de-açúcar respondeu por cerca de 14% das vendas dos fertilizantes agrícolas, totalizando US\$ 2,3 bilhões (3.140 mil toneladas). Segundo NEVES et al (2010), a necessidade de expansão da cultura, seja pelo aumento da área ou pelo aumento da produtividade irá acarretar o aumento do consumo de fertilizantes.

A fertilização nitrogenada apresenta baixa eficiência na cultura, com pequeno aproveitamento do N (nitrogênio) aplicado, principalmente no ciclo de cana-planta (VITTI et al., 2008; SCHULTZ et al., 2012). Nas socas, as respostas à adubação nitrogenada são mais frequentes; entretanto, as diferenças entre as doses aplicadas e a quantidade de N acumulado pela cultura ainda são expressivas.

A cana-de-açúcar é uma cultura altamente extrativa em nitrogênio. A cana-planta, com produtividade de 100 Mg.ha⁻¹ de colmos, acumula entre 180 e 250 kg.ha⁻¹ de nitrogênio, e no

caso da cana-soca este valor apresenta menor rendimento com média de 120 a 180 kg .ha⁻¹ de nitrogênio (ORLANDO FILHO et al., 1980; SAMPAIO et al., 1984; URQUIAGA et al., 2003).

Embora as doses de nitrogênio aplicado possam ser consideradas baixas quando comparadas às de outros países, o Brasil ainda apresenta forte dependência na importação de fertilizante nitrogenado, o que onera a produção de diversas culturas de importância econômica (ANDA, 2016). Além disso, os fertilizantes de nitrogênio demandam grandes quantidades de energia durante sua síntese, e são responsáveis pelas emissões de N₂O decorrentes de sua aplicação (BODDEY et al., 2008).

Diante disso, torna-se de interesse a utilização da fixação biológica de nitrogênio, um processo que ocorre naturalmente e depende da interação de grupos de bactérias conhecidos como diazotróficas e algumas espécies de plantas. Além da FBN, efeitos benéficos no crescimento das plantas têm sido observados com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR), que aumentam o desempenho da planta através de maior resiliência ao estresse abiótico e biótico, vigor radicular, absorção de nutrientes (YANG et al, 2009), produção de fitormônios (FUENTES- RAMÍREZ et al., 1993; SUMAN et al., 2001), solubilização de fosfatos (SINGH et al., 2007; SHUKLA et al., 2008), aumento no teor de carbono orgânico do solo, aumento de N e retenção de nutrientes essenciais na rizosfera (YADAV et al., 2009).

2.2 Apoplasto em Plantas Superiores e na Cana-de-açúcar

O compartimento externo à membrana plasmática vegetal, incluindo a parede celular e a matriz extracelular, é conhecido como apoplasto (HASLAM et al., 2003), enquanto os protoplastos interconectados e seus plasmodesmas são conhecidos como simplasto. O movimento de água e solutos de uma célula para a outra através dos plasmodesmas é denominado transporte simplasto (RAVEN et al, 2007) (Figura 1). Foi relatado que o apoplasto desempenha papel importante na defesa, desintoxicação, transporte de água e solutos, desenvolvimento, além de atuar como habitat para microrganismos (GRIGNON e SENTENAC, 1991; SHOWALTER, 1993; DIETZ, 1997, DONG et al., 1994).

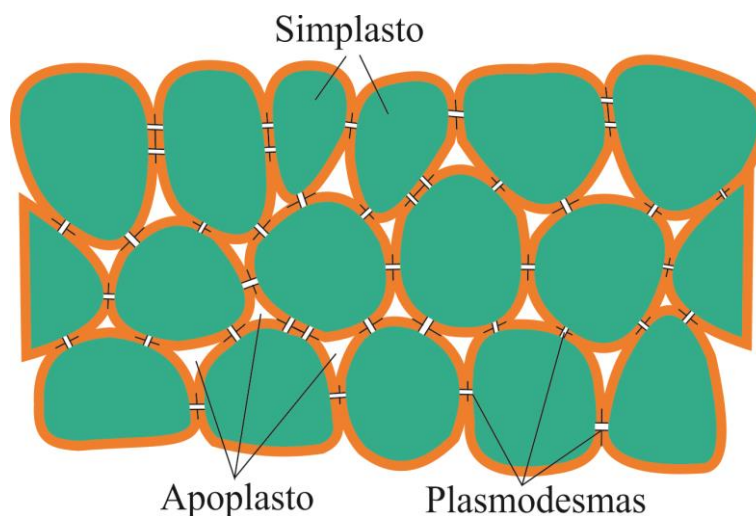


Figura 1. Apresentação esquemática do simplasto e apoplasto. Plasmodesmas conectam células vizinhas para formar o simplasto. Os espaços extracelulares entre as paredes celulares formam o apoplasto.

As bactérias presentes nas raízes e na rizosfera se beneficiam de exsudatos radiculares, porém, algumas bactérias e fungos são capazes de colonizar os tecidos internos da planta como endófitos não causadores de danos, podendo estabelecer uma associação mutualista (BALDANI et al., 1999; AZEVEDO et al., 2000).

O processo de colonização bacteriana na planta não envolve necessariamente mecanismos ativos, por exemplo, endófitos que secretam enzimas que degradam a parede celular (JAMES et al., 2002) e, virtualmente, todas as bactérias da rizosfera podem ser consideradas endofíticas em um estágio de sua vida (HARDOIM et al., 2008). A penetração passiva pode ocorrer em fissuras, tais como as que ocorrem nos locais de emergência das raízes, ou criadas por micro (bactéria e fungos) ou mesofauna (exemplo, nematoides), os quais podem colonizar a região do apoplasto radicular (Figura 2).

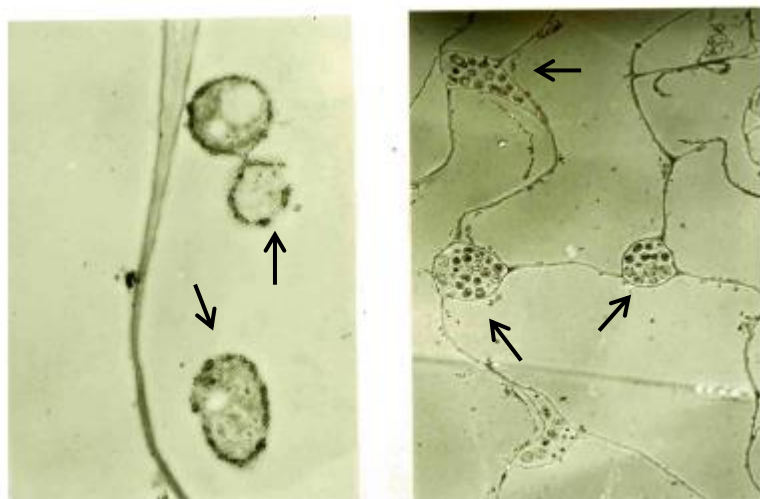


Figura 2. *Azospirillum brasilense* Sp245 colonizando o apoplasto. Setas pretas indicam a localização de bactérias. Adaptado de Hartmann e colaboradores, 1998.

No entanto, é provável que os endófitos capazes de passar através da endoderme possam secretar celulases que degradam a parede celular vegetal, permitindo-lhes continuar a colonização dos tecidos internos da planta (JAMES et al., 2002). Em condições naturais, algumas bactérias deletérias podem perturbar a endoderme, permitindo a entrada de bactérias endofíticas para o cilindro central (Figura 3). Depois de passarem pela barreira endodérmica, as bactérias endofíticas podem penetrar no periciclo para alcançar os vasos do xilema da raiz dos seus hospedeiros (Figura 3). Isto foi demonstrado, por exemplo, para *Herbaspirillum seropedicae* Z67 em arroz (JAMES et al., 2002), para *B. phytofirmans* estirpe PsJN em videira (COMPANT et al., 2005b; 2008a), sendo possível ocorrer também em muitas outras bactérias endofíticas.

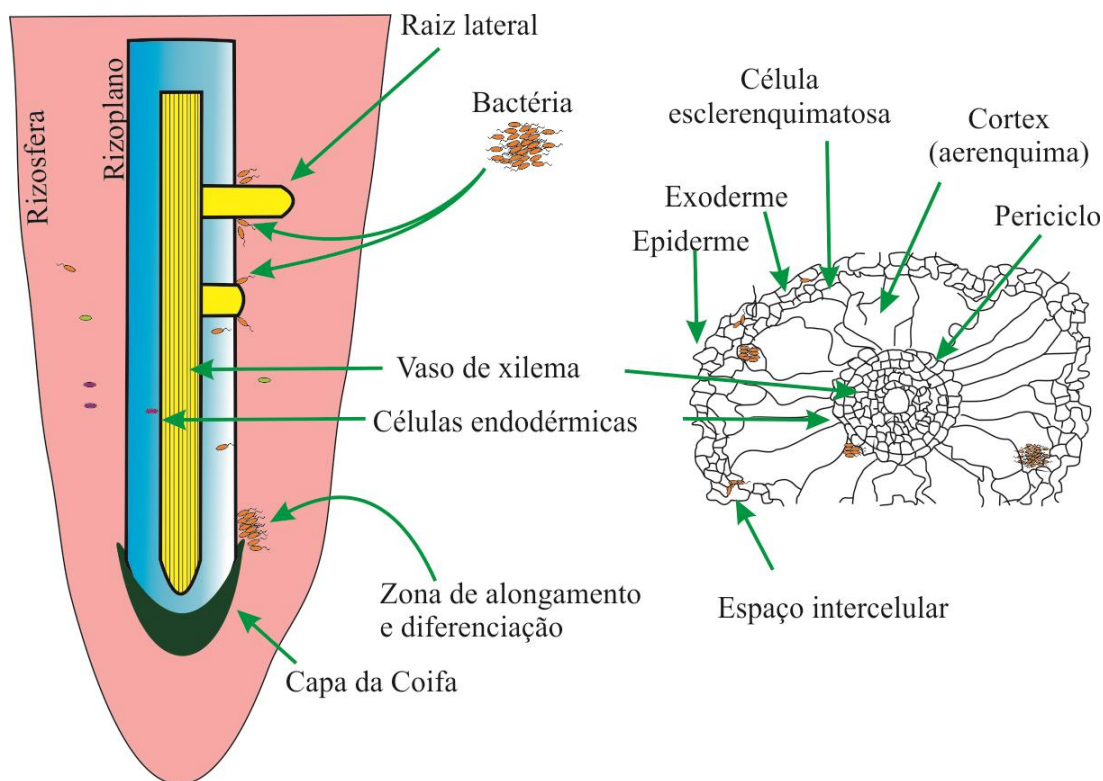


Figura 3. Sítios de colonização de bactérias endofíticas na planta. As bactérias endofíticas formam colônias na superfície das raízes, podendo penetrar na planta através de ferimentos naturais ou de rachaduras que se formam na coifa ou em locais de emergência das raízes laterais (Adaptado de REINHOLD-HUREK, 1998 e HARDOIM et al., 2008).

Um papel um tanto surpreendente para a sacarose apoplástica em cana-de-açúcar é que a mesma pode atuar como fonte de carbono para suportar o crescimento de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (CANNY, 1995), as quais são encontradas tanto nas raízes quanto nos colmos. As bactérias *N. amazonense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* foram isoladas da cana-de-açúcar e utilizam a sacarose como fonte de carbono em crescimento *in vitro* (BALDANI et al., 1999; CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988). O fluido de apoplasto também é composto por carboidratos, sendo predominantemente sacarose, mas também frutose e glicose, além de ácidos orgânicos, aminoácidos, amônio, nitrato, proteínas, íons inorgânicos, lignina e água, que podem servir como fonte de nutrientes para os microrganismos (WELBAUM e MEINZER, 1990; HASLAM et al., 2003; TEJERA et al., 2006). O apoplasto é também o principal local para o transporte de curta distância de hormônios, por exemplo, a citocinina (HIROSE et al., 2008). Na interação entre plantas e rizóbios fixadores de nitrogênio, os compostos orgânicos isoflavonas, pertencentes à classe de flavonoides, são liberados no apoplasto radicular auxiliando o processo simbiótico entre a planta e a bactéria (SUZUKI et al., 2006).

Alguns dos solutos apoplásticos são fontes de carbono para as bactérias endofíticas, que persistem por gerações (DONG et al., 1994, FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999, ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Como a cana-de-açúcar é propagada vegetativamente, os endófitos são transmitidos através de propágulos vegetativos para a próxima geração e não requerem reinfecção em cada geração (JAMES et al., 1994; REIS et al., 1994, DONG et al., 1994) Algumas das bactérias conhecidas por formarem associações endofíticas com a cana-de-açúcar incluem: *G. diazotrophicus* (anteriormente *Acetobacter diazotrophicus*), *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisulbalbicans*, *Klebsiella*

variicolab, *Burkholderia* spp., *Pantoea* spp., *Pseudomonas* spp., e *Microbacterium* spp. (ROSENBLUETH e MARTINEZ-ROMERO 2006; MENDES et al., 2007). Enquanto a maioria dos endófitos é considerada mutualista com seus hospedeiros, alguns podem ser autógenos latentes, causando infecções sob certas condições. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* pode causar uma doença de estria suave em algumas cultivares de cana-de-açúcar, mas é assintomático na maioria dos hospedeiros (JAMES e OLIVARES, 1997).

Os endófitos bacterianos podem oferecer vários benefícios à planta hospedeira, particularmente em relação à promoção do crescimento e à proteção contra agentes patogênicos. Em condições ambientais diversas as bactérias endófitas são capazes de comunicar e interagir com a planta de forma mais eficiente do que as bactérias rizosféricas (ALI et al., 2012; COUTINHO et al., 2015). As bactérias endofíticas, uma vez estabelecidas dentro dos tecidos da planta hospedeira, não estão mais sujeitas às adversidades das condições do solo, como, por exemplo, variações de temperatura, pH, conteúdo de água do solo e presença de bactérias do solo que podem competir por locais de ligação em superfícies de raízes de plantas hospedeiras e obtenção de nutrientes (GLICK, 2015).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

O aumento progressivo da população mundial, que deve atingir oito bilhões de pessoas em 2030, demanda maior recurso nas áreas de energia e de alimentos, parte dos quais vem sendo alcançados através do cultivo em áreas novas, frequentemente marginais e impróprias para a agricultura.

A necessidade de desenvolvimento e utilização de tecnologias que garantam a segurança alimentar, mas que preservem o meio ambiente é importante para manter os recursos naturais. Nas últimas décadas estima-se que cerca de dois dos 8,7 bilhões de hectares de terras agricultáveis, pastagens permanentes e florestas do mundo tenham sido degradadas. (HUNGRIA, 2007)

O nitrogênio (N) é um elemento químico constituinte principal de proteínas e ácidos nucleicos, macromoléculas biológicas fundamentais para todos os processos essenciais às células, sendo o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas. Embora o nitrogênio molecular (N_2) seja o gás mais abundante na atmosfera, compondo cerca de 80% de sua totalidade, é um composto extremamente estável, fazendo com que o mesmo não possa ser prontamente utilizado como fonte de N pela maioria dos seres vivos. A estabilidade do gás N_2 se deve à presença de uma forte ligação triplíce, entre os dois átomos de N e requer uma grande quantidade de energia para quebrar esta ligação para reduzir a amônia, para se tornar acessível à maioria dos organismos vivos.

A reação de redução do N_2 para amônia (NH_3) ocorre em três rotas principais. A primeira, fixação não biológica, é independente da ação de organismos vivos e resultam de processos naturais, como a reação de descargas elétricas nas moléculas de N_2 . A segunda rota, fixação não biológica, ocorre pelo processo Haber-Bosch, utilizado na produção de fertilizantes nitrogenados sintéticos (FINAN et al., 2002). Este processo industrial requer altas temperaturas (300° a 600°C) e altas pressões (200 a 800 atm), além de catalisadores contendo ferro (CHERKASOV et al., 2015). A terceira rota é representada pelas bactérias e bactérias ancestrais diazotróficas, que são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia graças à ação da enzima nitrogenase (IGARASHI e SEEFELDT, 2003). Essa enzima é capaz de romper a tripla ligação do N_2 , um composto muito estável devido à força da ligação tripla entre os átomos de nitrogênio, reduzindo-o a NH_3 da mesma forma obtida no processo industrial. Ao que se refere ao meio ambiente e à agricultura mundial, esse processo é extremamente vantajoso, já que repõe o conteúdo de nitrogênio na biosfera e compensa as perdas que ocorrem devido ao processo de desnitrificação (DIXON & KAHN, 2004).

Tendo em vista que a disponibilidade de nitrogênio é um fator limitante à produtividade agrícola, há um aumento cada vez maior na utilização de fertilizantes (GALLOWAY, 1998; DIXON e KAHN, 2004). Conseqüentemente, nos últimos 60 anos, a atividade humana está acelerando a taxa de produção do nitrogênio através da produção industrial de fertilizantes nitrogenados associados à combustão de combustíveis fósseis (VITOUSEK et al., 1997; GALLOWAY, 1998). Os fertilizantes nitrogenados representam a forma assimilada com maior rapidez pelas plantas, porém, a um custo muito elevado. O gasto de fontes energéticas por tonelada de amônia sintetizada é cerca de seis barris de petróleo, inviabilizando a manutenção de qualquer programa energético. (REIS et al., 2009)

No que diz respeito à inoculantes contendo bactérias formadoras de nódulos nas raízes das plantas, é uma prática biotecnológica consolidada em todo o mundo (BASHAN et al., 2014). No Brasil, em média 25 milhões de doses de inoculantes são comercializadas a cada ano, sendo 95% delas para a soja (*Glicina max* [L.] Merr.) (HUNGRIA e MENDES, 2015).

A FBN representa um dos principais fatores de competitividade da cultura da soja. Com a exploração desta tecnologia, que é prática amplamente difundida e utilizada pelos produtores de soja no Brasil, estima-se a economia de fertilizantes nitrogenados em três bilhões de dólares anuais (HUNGRIA et al., 2005), e obtém-se alta produtividade de grãos (ZILLI et al., 2006).

2.4 FBN em Gramíneas e na Cana-de-açúcar

A caracterização de espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à poaceas tem despertado interesse em seu potencial uso como inoculante nessas culturas, para além do já estabelecido uso de *Bradyrhizobium* na soja.

Especificamente na cultura da cana-de-açúcar, a planta acumula quantidades elevadas de N, podendo chegar a 210 kg.ha⁻¹ durante o ciclo da cana-planta e de 120 a 180 kg.ha⁻¹ nas soqueiras (ORLANDO FILHO et al., 1980; URQUIAGA et al., 1992). Estudos indicam que, do nitrogênio assimilado pelas raízes, cerca de 50% é exportado para os colmos. TRIVELIN e colaboradores (1995) mencionam que para uma produtividade de 100 Mg.ha⁻¹ de colmo, são colhidos cerca de 200 a 300 kg.ha⁻¹ de nitrogênio. As quantidades de N colhidas através dos colmos são semelhantes ou até menores do que as doses aplicadas por fertilização ao longo do ciclo, sem contar as perdas de N do sistema (CANTARELLA et al., 2007). Embasado nisso, há fortes evidências da ocorrência da fixação biológica de nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar (TSAI et al., 1993; BODDEY et al., 2003). Se as perdas de nitrogênio do sistema solo-planta são maiores que a reposição, ocorre a reposição natural de N na cultura (URQUIAGA et al., 2012). Baseando-se nestas evidências e pressupostos, vários estudos sugerem que esta reposição de N seja oriunda do processo de FBN (LIMA et al., 1987, DÖBEREINER, 1992; URQUIAGA et al., 1992, 2012; BODDEY et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2002, 2006).

No século passado, Johanna Döbereiner verificou a ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Azotobacter paspali* associada à rizosfera de *Paspalum notatum*, cultivar batatais (DÖBEREINER, 1966) e *Beijerinckia fluminensis* associada à rizosfera da cana-de-açúcar (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958), sendo esta última encontrada em solos de cana-de-açúcar e mostrando-se favorável para o seu crescimento.

Efeitos benéficos no crescimento das plantas têm sido observados com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR), que aumentam o desempenho da planta através de maior resiliência ao estresse abiótico e biótico, aumentam o vigor radicular e a absorção de nutrientes (YANG et al, 2009).

O inoculante para a cultura de cana-de-açúcar foi lançado pela EMBRAPA, sendo a *Nitrospirillum amazonense* uma das bactérias que o constitui (REIS et al., 2009). Além desta bactéria, também constituem o inoculante *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H.*

rubrisubalbicans e *Paraburkholderia tropica*, inoculante esse que tem demonstrado efeito de promoção do crescimento vegetal em cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2006). Por essa razão, esse consórcio de bactérias tem sido recomendado pela Embrapa como inoculante para a cana-de-açúcar.

2.5 *Nitrospirillum amazonense*

A espécie *Nitrospirillum amazonense*, anteriormente *Azospirillum amazonense*, é uma bactéria fixadora de nitrogênio, Gram-negativa, aeróbica, tem célula em forma de bastonete, com 0,9 – 1,0 µm de largura e 3,5 µm de comprimento, flagelo polar e ausência de flagelo lateral, mótil, algumas vezes com movimento em espiral, apresenta metabolismo aeróbico, forma colônias com coloração creme, demonstra forma da colônia circular e superfície da colônia rugosa em meio 79. Apresenta crescimento ótimo à temperatura de 35°C, pH variando entre 5,7 – 7,8, e concentrações menores de 3 % de NaCl (p/v) (LIN et al., 2014). *N. amazonense* não desenvolve células pleomórficas quando crescidas em meio semi-sólido LGI quando o pH é mantido em torno de 6. Neste mesmo meio, as células permanecem móveis e vibróides (BALDANI et al., 2005). São capazes de utilizar succinato, malato, lactato, fumarato, mio-inositol, D-ribose, L-ramnose, frutose, maltose, D-manose, D-galactose, L-arabinose, malato, sacarose, glutamato, α-ciclodextrina, dextrina, D-melibiose (BALDANI et al., 2005a, BALDANI et al.; 2014. LIN et al., 2014) como fontes de carbono. Quantidades significativas de polihidroxibutirato (PHB) são observadas quando a bactéria sobrevive em condições de estresse nutricional, sendo confirmada a síntese de PHB pela estirpe CBAmC (SCHWAB et al., 2018). Apresenta resistência aos antibióticos penicilina e ampicilina, relativamente tolerante a clorafenicol e tetraciclina, e sensíveis a gentamicina, canamicina e eritromicina (MAGALHÃES et al., 1983, REIS et al., 2011).

De acordo com a literatura, o principal nicho de colonização da bactéria na planta é a rizosfera, tendo sido já isolada de raízes de cana, palmeiras, arroz, sorgo, milho, além de fruteiras como abacaxizeiro, bananeira e colmo de cana (MAGALHÃES et al., 1983; BALDANI e BALDANI, 2005; BALDANI et al., 2005a).

N. amazonense possui flagelo polar, como mencionado anteriormente, e possui genes para a produção de EPS, como *noeJ* e *noeL* (manose-6-fosfato isomerase e GDP-manose 4,6-deidratase, respectivamente) (SCHWAB et al., 2018). Além disso, a *N. amazonense* mostrou benefícios quando inoculada em arroz, mostrando produção de fitohormônios e significativa fixação de N como responsável pelo crescimento vegetal (RODRIGUES et al., 2008).

Alguns estudos sobre o metabolismo e genética da fixação de nitrogênio em *N. amazonense* têm sido conduzidos e englobam diferentes categorias funcionais. Reguladores centrais no metabolismo de nitrogênio como as proteínas PII (*glnB*, *glnK* e *glnK2*), grupos de genes responsáveis pela transferência de elétrons para a nitrogenase (*fixABC*, *fixLJ*, *fixK* e *fixNOQP-fixGHIS*) e grupos de genes para o complexo da enzima nitrogenase (*nifHDK*, *nifUSV*, *nifENX*, *nifA*) (POTRICH et al., 2001, SANT'ANNA et al., 2011). O DNA genômico da estirpe CBAmC foi sequenciado, revelando genes envolvidos na fixação de N₂ e metabolismo geral de N, biossíntese de auxinas, sensores de quórum, formação de biofilme, quimiotaxia e motilidade importantes para a interação planta-bactéria (SCHWAB et al., 2018).

Portanto, é importante estudar os genes da bactéria relacionados a adaptação durante a colonização nas plantas usando da genômica funcional, ferramenta de investigação importante para ampliar os conhecimentos sobre a fisiologia e bioquímica da interação bactéria-planta.

2.6 Aplicações da Abordagem Transcriptômica para Avanços de Conhecimento sobre a Interação Planta-bactéria

As moléculas de RNA são componentes vitais de todas as células vivas. As moléculas de RNA fornecem uma descrição rápida e abrangente do estado fisiológico de uma célula. A análise do perfil de RNAs, ou transcriptômica, representa todas as moléculas de RNA, incluindo os mRNAs codificadores, bem como o rRNA não codificante, tRNAs, sRNAs, etc. Entretanto, o principal foco das pesquisas transcriptômicas é baseado em mRNA que codificam para proteínas e sRNAs (pequenos RNA) que controlam a expressão gênica ao nível pós-transcricional (KIMBREL et al., 2011).

Usa-se o termo RNA-seq (sequenciamento indireto de RNA) para se referir aos procedimentos experimentais em que transcritos são convertidos em cDNA (DNA complementar) para sequenciamento de nova geração. O sequenciamento direto do RNA já foi demonstrado em *Saccharomyces cerevisiae*, mas esta abordagem não foi amplamente adotada (OZSOLAK et al., 2009).

Diversas abordagens transcriptômicas foram reportadas como a análise transcriptômica de sRNAs do patógeno vegetal *Xanthomonas campestris* e a análise dupla de RNA-seq para análise simultânea entre raízes de trigo colonizadas pela bactéria endófito *Azospirillum brasilense* (CAMILIOS-NETO et al., 2014) e raízes de cana-de-açúcar colonizadas pela bactéria *Burkholderia* Q208 (PAUNGFOO-LONHIENE et al., 2016).

A partir da análise do transcriptoma da bactéria rizosférica *Azospirillum lipoferum* 4B associada às raízes de arroz durante sete dias, verificou-se estresse por espécies reativas de oxigênio na bactéria. Esses compostos tóxicos podem estar envolvidos na resposta da planta hospedeira (DROGUE et al., 2014).

A planta de cana-de-açúcar pode atuar ativamente no estabelecimento da associação com bactérias diazotróficas endofíticas, uma vez que foram identificados genes na planta que são exclusivamente ou preferencialmente expressos na associação com cada espécie bacteriana, *G. diazotrophicus* e/ou *H. rubrisubalbicans* (NOGUEIRA et al., 2001).

A análise simultânea de RNA-seq de raízes de plantas durante o cultivo de *A. brasilense* resultou na mudança notável em genes expressos envolvidos na atividade de transporte nas plantas, refletindo em um efeito direto na absorção de nutrientes, como o nitrogênio, além da divisão celular e a replicação de DNA (CAMILIOS-NETO et al., 2014). Os autores concluíram que essas mudanças na expressão gênica provavelmente estão correlacionadas com a melhoria no crescimento de mudas de trigo colonizadas por *A. brasilense* em condições axênicas.

Outra análise transcriptômica foi realizada com a bactéria endofítica *Burkholderia* Q208 associada a raízes de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram que durante a interação com raízes de cana-de-açúcar, as bactérias expressam genes envolvidos na formação de biofilme, produção de polihidroxibutirato, além de suprimir fatores de virulência que tipicamente desencadeiam resposta imune em plantas (PAUNGFOO-LONHIENE et al., 2016).

O estudo transcriptômico da estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* na presença do flavonóide naringenina mostrou que genes envolvidos na quimiotaxia e montagem flagelar foram subexpressos, mostrando efeitos negativos na motilidade bacteriana. Entretanto genes envolvidos no efluxo multidrogas foram superexpressos (TADRA-SFEIR et al., 2015).

2.7 Aplicações da Abordagem Proteômica para Avanços de Conhecimento sobre a Interação Planta-bactéria

As bactérias respondem a mudanças em seu ambiente por meio de mudanças nos padrões de proteínas estruturais, proteínas de transporte, toxinas e enzimas, para se adaptarem

a um habitat específico (BOLLER e FELIX, 2009). As proteínas são de natureza constitutiva (são sempre produzidas) ou induzíveis (produzidas em determinadas condições ambientais ou fases do ciclo de vida).

A abordagem proteômica permite a identificação de proteínas expressas em uma determinada condição. O desenvolvimento de várias tecnologias proteômicas, como as técnicas baseadas em gel incluem 1DGE, 2DGE, 2DE-DIGE (eletroforese em gel bi-dimensional-diferencial), permitem a detecção de algumas centenas de proteínas (ROSEN et al., 2004; CHUNG et al., 2007). Entretanto, as abordagens livres de gel ou *shotgun* incluem a marcação isotópica estável por aminoácidos em cultura de células (SILAC, do inglês: *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*), marcador de afinidade enriquecido isotopicamente (ICAT, do inglês, *isotope coded affinity tag*), marcador isobárico para a quantificação relativa e absoluta (iTRAQ, do inglês, *isobaric tag for relative and absolute quantitation*), tecnologia multidimensional para identificação de proteínas (MudPIT, do inglês, *multidimensional protein identification technology*).

Na estratégia independente de gel, as sequências de aminoácidos peptídicos são obtidas pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS, do inglês, *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). Esta análise abrange a extração de proteínas totais ou proteínas de interesse digeridas com tripsina para formação de peptídeos, separadas por HPLC e os peptídeos ionizados são detectados e ainda fragmentados. As sequências peptídicas serão obtidas comparando os espectros em tandem com os espectros teóricos de fragmentação peptídica.

Diversos estudos proteômicos envolvendo interações planta-vírus (PEREZ-BUENO et al., 2004), planta-bactéria patogênica (ASHWIN et al., 2017), planta-fungo (MURAD et al., 2006) foram relatados. No que diz respeito à interação entre plantas e bactérias promotoras crescimento, a bactéria *Rhizobium leguminosarum* em contato com hidroxiflavona apresentou regulação positiva de proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, flagelos, energia (GUERREIRO et al., 1997). Após 21 dias em contato com a soja, *Bradyrhizobium japonicum* apresentou proteínas envolvidas na tradução, regulação pós-transducional e complexo nitrogenase (DELMOTTE et al., 2009). A análise proteômica de *Mesorhizobium loti* em interação com *Lotus japonicus* levou à identificação de 722 proteínas em comum sob condições de vida livre e simbióticas, enquanto 125 proteínas foram identificadas exclusivamente sob condições simbióticas. Proteínas relacionadas com a biossíntese de peptidoglicano e proteínas relacionadas ao sistema flagelar foram detectadas somente em condições de vida livre, sugerindo que em processo simbiótico, simplificam sua superfície celular (TATSUKAMI et al., 2013). Durante um experimento de 24 horas com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* PAL5 colonizando a cana-de-açúcar SP70-1143, foram identificadas proteínas com funções envolvidas em quimiotaxia, diferenciação celular, e regulação no estresse oxidativo e osmótico (LERY et al., 2010). Através de um experimento de inoculação da bactéria fixadora de nitrogênio *H. seropedicae* em raízes de milho, foi possível identificar proteínas do milho responsivas à presença da bactéria (FERRARI et al., 2014).

Definir um mapa preciso de todos os genes e proteínas envolvidos em interações complexas no processo de associação entre plantas e bactérias ou em contato com os fluidos vegetais pode elucidar informações sobre genes regulados pela bactéria, auxiliando o conhecimento do potencial genético da bactéria e fornecendo informações para o desenvolvimento biotecnológico futuro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Líquido do Apoplasto de Cana-de-açúcar

O fluido do apoplasto de cana-de-açúcar foi obtido conforme descrito por Dong et al., em 1994, utilizando a variedade comercial RB 867515 (responsiva à inoculação em termos de produtividade) (REIS et al., 2009a) e, plantada no campo experimental da Embrapa Agrobiologia (Seropédica – RJ) com 12 meses de cultivo. Os colmos foram superficialmente esterilizados através de flambagem utilizando álcool 70%. Os entrenós dos colmos foram cortados transversalmente em pedaços de 3 a 4 cm e transferidos para tubos de fundo cônico de 50 ml, e então submetidos a centrifugação de 3000 x g, temperatura de 4°C com duração de 20 min, com o objetivo de escoar o fluido do apoplasto. Cada tubo continha também, além do pedaço de colmo, uma ponteira de 200 µL em seu fundo para separar o colmo do líquido do apoplasto durante a centrifugação. Em seguida o fluido do apoplasto foi esterilizado em filtro de 0,22 µm de porosidade, e armazenado a -20° C até a realização das análises bioquímicas e de sua utilização nos meios de cultura bacterianos para as análises de expressão gênica e traducional.

3.2 Estirpe, Meios, Condições de Cultivo

A estirpe CBAmC (=BR11145) foi obtida no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) na Embrapa Agrobiologia.

A estirpe CBAmC de *N. amazonense* foi cultivada em meio LGI líquido contendo em L⁻¹: K₂HPO₄, 0,2 g; KH₂PO₄, 0,6g; MgSO₄.7H₂O, 0,2g; CaCl₂.2H₂O, 0,02g; Na₂MoO₄.2H₂O 0,002g; solução de FeEDTA (solução a 1,64%), 4ml; Solução de vitamina, 1ml (0,1 g/L de biotina; 0,2 g.L⁻¹ de piridoxol-HCl, pH 6); pH 6 (MAGALHÃES et al., 1983), suplementado com sacarose 5 g como fonte de carbono e 10 mmol de glutamato de sódio como fonte única de nitrogênio. Para contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi usado o meio sólido pela técnica de micro-gotas (ROMEIRO, 2001) e verificação de pureza, a bactéria *N. amazonense* foi cultivada em meio sólido batata suplementado com 2,5 g.L⁻¹ de glicose (BALDANI e DÖBEREINER, 1980).

A estirpe CBAmC de *N. amazonense* foi cultivada em tubos de ensaio com volume final de 5 mL de meio LGI padrão com adição de diferentes concentrações de cloreto de amônio ou glutamato de sódio e apoplasto como segue:

- LGI suplementado com 10 mM de glutamato de sódio
- LGI suplementado com 20 mM de glutamato de sódio
- LGI suplementado com 10 mM de cloreto de amônio
- LGI suplementado com 20 mM de cloreto de amônio
- 50% de LGI 10 mM de glutamato de sódio com 50% de fluido de apoplasto
- 50% de LGI 10 mM de cloreto de amônio com 50% de fluido de apoplasto
- 50% de água bidestilada com 50% de fluido de apoplasto

A quantificação da densidade celular bacteriana foi realizada em placas de 96 poços com fundo transparente com volume de suspensão bacteriana de 100 µL no espectrofotômetro leitor de placas de fundo transparente com comprimento de onda de 600 nm e o pH foi mensurado através de papel indicador (modelo 1095350001, Merck).

Para obtenção do perfil de crescimento da estirpe CBAmC somente com LGI padrão suplementado com 10 mM de glutamato de sódio, cultivou-se a bactéria em frascos de erlenmeyer de 250 mL com volume final de meio de 100 mL. A quantificação celular ao longo do tempo de cultivo foi realizada por meio da medida da densidade óptica em espectrofotômetro (600 nm), com repetição técnica e biológica.

3.3 Ensaio de Motilidade Bacteriana em Meio Semi-sólido e Extração Proteica

N. amazonense CBAmC foi cultivada em meio LGI suplementado com 10 mM de glutamato de sódio a 30°C, 180 rpm até $DO_{600\text{ nm}} = 1$. As células foram lavadas com solução salina [0,85% (p/v) de cloreto de sódio (NaCl) estéril], as células foram inoculadas em meio semi-sólido LGI (1,4 g.L⁻¹ de ágar) e LGI (2.8 g.L⁻¹) + fluido de apoplasto (1:1) no centro da placa de Petri e após 24 horas, as placas foram fotografadas pelo ColonyDoc-It Imaging Station. Após o período de incubação da cultura, o meio semi-sólido foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e agitado em vórtex. Em seguida, foi transferido 180 µL da amostra para um microtúbulo de 1,5 mL, adicionado 720 µL de água destilada e 100 µL de NaOH 5M. Incubou em banho-maria a 100° C por 5 min e foi agitado em vórtex. Transferiu 40 µL do lisado celular para uma microplaca de 96 poços e adicionou 160 µL do reagente Bradford comercial. Incubou por dois min no escuro em temperatura ambiente e mediu em A_{595} .

3.4 Análises Químicas do Fluido do Apoplasto

Neste trabalho foram quantificados os açúcares redutores do fluido do apoplasto da planta de cana-de-açúcar variedade RB867515 seguindo o método colorimétrico usando 3,5-dinitro-salicilato (VASCONCELOS, et al., 2013). A concentração de aminoácidos livres foi determinada usando o reagente de ninhidrina (MOORE, 1968) e uma curva padrão preparada com L-leucina. A concentração de proteína foi medida a 595 nm pelo método de BRADFORD (1976). Teor de amônio foi determinado pelo método colorimétrico de MITCHEL (1972) e FELKER (1977), enquanto o de nitrato foi pelo método de MIRANDA (2001). A determinação da concentração de sacarose foi utilizando refratômetro BRIX. Para a quantificação de carboidratos totais foi usando o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O pH foi medido usando pHmetro. O laboratório de química agrícola, localizado na Embrapa Agrobiologia, a partir do apoplasto liofilizado, determinou os teores de potássio, por fotometria de chama, de fósforo por colorimetria, e de cálcio e magnésio por espectrometria. O teor de N total foi determinado pelo método por digestão de ácido sulfúrico e destilação.

3.5 Extração e Avaliação de DNA Genômico de *Nitrospirillum amazonense* Estirpe CBAmC

3.5.1 Extração de DNA para sequenciamento PacBio

O DNA foi extraído para sequenciamento de todo o genoma. Coletou-se as células bacterianas entre $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$ e $0,8$ com volume de 5 mL em meio de cultura LGI contendo 10 mM de glutamato de sódio. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Wizard® Genomic DNA Purification Kit, A1120, PROMEGA com algumas modificações. Foram adicionados 300 µL de RNase A Solution (Sigma-Aldrich, R6148-25ML) para cada 5 mL de suspensão bacteriana incubado por 3 h. Adicionou-se um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, centrifugou-se entre 13.000 e 16.000 x g por 3 min, coletou-se a fase aquosa (fase superior) para outro tubo antes de adicionar o isopropanol. Para estimar a quantidade e avaliação de pureza de ácidos nucleicos foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop® 2000c utilizando as razões da absorvância 260/280 e 260/230 e para quantificar foi usado o kit Qubit® dsDNA HS Assay (Invitrogen, Carlsbad, CA). Todo o genoma foi sequenciado usando a plataforma PacBio RSII após se preparar biblioteca SMRTbell com kit PacBio SMRTbell pela Macrogen Inc., Seul, Coreia do Sul.

3.5.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo padrão Wizard® Genomic DNA Purification Kit (código A1120, PROMEGA).

3.5.3 Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA)

O DNA genômico foi extraído com o objetivo de ser usado como molde para amplificação por PCR do gene para 16S rRNA.

O objetivo da amplificação do gene 16S rRNA e posterior digestão da região amplificada (amplicon) foi verificar se todas as amostras biológicas usadas no ensaio experimental apresentavam o perfil eletroforético esperado da estirpe CBAmC conforme descrito (REIS et al., 2013). Cada reação de amplificação por PCR com volume final de 50 µL foi realizado conforme indicado pelo manual do fabricante (Invitrogen, Cat. No. 11615010) e 0,5 µM de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador. Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 95°C por 60 segundos, uma etapa de anelamento a 60°C por 60 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 2 min. Ao final de 30 ciclos, foi efetuada a última etapa de extensão a 72°C por 8 min. Após a reação de amplificação, o gel foi corado e analisado conforme descrito no item 3.6.1.

3.5.4 Digestão de DNA por enzimas de restrição

As amostras de DNA foram digeridas utilizando as condições mais adequadas para a atividade das enzimas de restrição *TaqI* e *DdeI* em tubos separados, e seguida as instruções conforme o manual do fabricante (Invitrogen Life Technologies). Ao final da digestão, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,5-3,0% conforme descrito no item 3.6.1.

3.6 Eletroforese

3.6.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para verificar a qualidade da extração de DNA foi usada a eletroforese de DNA em gel de agarose. Géis de agarose 0,7-3,0% foram preparados em tampão TAE 1 X (40 mM de Tris base, 5 mM de acetato de sódio pH 7,8 e, 1 mM de EDTA). A amostra (e o padrão de tamanho molecular) de DNA foi aplicada no gel junto com o tampão de corrida 6× [(glicerol a 50 % (v/v), xileno cianol 0,25 % (p/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v)]. Em seguida, o gel foi corado através de banho em solução de brometo de etídeo (0,5 µg.mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak).

3.6.2 Eletroforese de RNA em gel de agarose desnaturante

A eletroforese em gel de agarose desnaturante foi utilizada para verificar a integridade do RNA extraído das amostras. Todas as soluções de uso foram preparadas com água bidestilada autoclavada com 0,1 % de dietil pirocarbonato (DEPC). O procedimento foi realizado em gel de agarose 0,7% (p/v) preparado em tampão desnaturante contendo 9,6 mL de tampão MOPS 10X [ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico (abreviado em inglês como MOPS); acetato de sódio a 3 M pH 7,0 e EDTA a 0,5 M] 9,6% (v/v) e 20,2 % de formaldeído. Cada amostra contendo 3 µg de RNA ajustado para 5 µL como água livre de RNase, foi misturada com (MOPS 10X) 12,5% (v/v), formaldeído 25% (v/v), formamida 62,5 % (v/v), brometo de etídeo a 0,5% (v/v). A mistura foi aquecida a 65°C por 5 min e transferida para banho de gelo. Posteriormente foram adicionados 1/6 do volume de tampão de corrida [glicerol 50 % (v/v), xileno cianol 0,25 % (p/v), azul de bromofenol 0,25 % (p/v)] e as amostras foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão MOPS 1X, em voltagem constante de 5 V.cm⁻¹. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em

fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak[®]) para avaliação da integridade do RNA.

3.7 Coleta de Material para as Análises de Transcriptômica e Proteoma

Inicialmente, foi feito o pré-inóculo da *Nitrospirillum amazonense* estirpe CBAmC em tubo de ensaio de vidro com 5 mL de meio líquido LGI suplementado com 10 mM de glutamato de sódio. Posteriormente, 100 µL da suspensão celular da cultura resultante foram inoculados em erlenmeyers de 125 mL com volume de meio de cultura de 25 mL e concentração final de 10^5 células.mL⁻¹. Os erlenmeyers foram mantidos em incubadora em temperatura de 30° C e rotação orbital de 180 RPM. Ao chegar à metade da fase exponencial, ou seja, com densidade ótica a 600 nm de cerca de 1,4, foram adicionadas partes iguais de cada tratamento e foram aplicados os tratamentos conforme esquematizado na Figura 4:

- LGI-C (C = Controle) = 25 mL de suspensão bacteriana mais 25 mL de meio LGI novo;
- LGI-A (A = Apoplasto) = 25 mL de suspensão bacteriana mais 25 mL de fluido de apoplasto estéril.

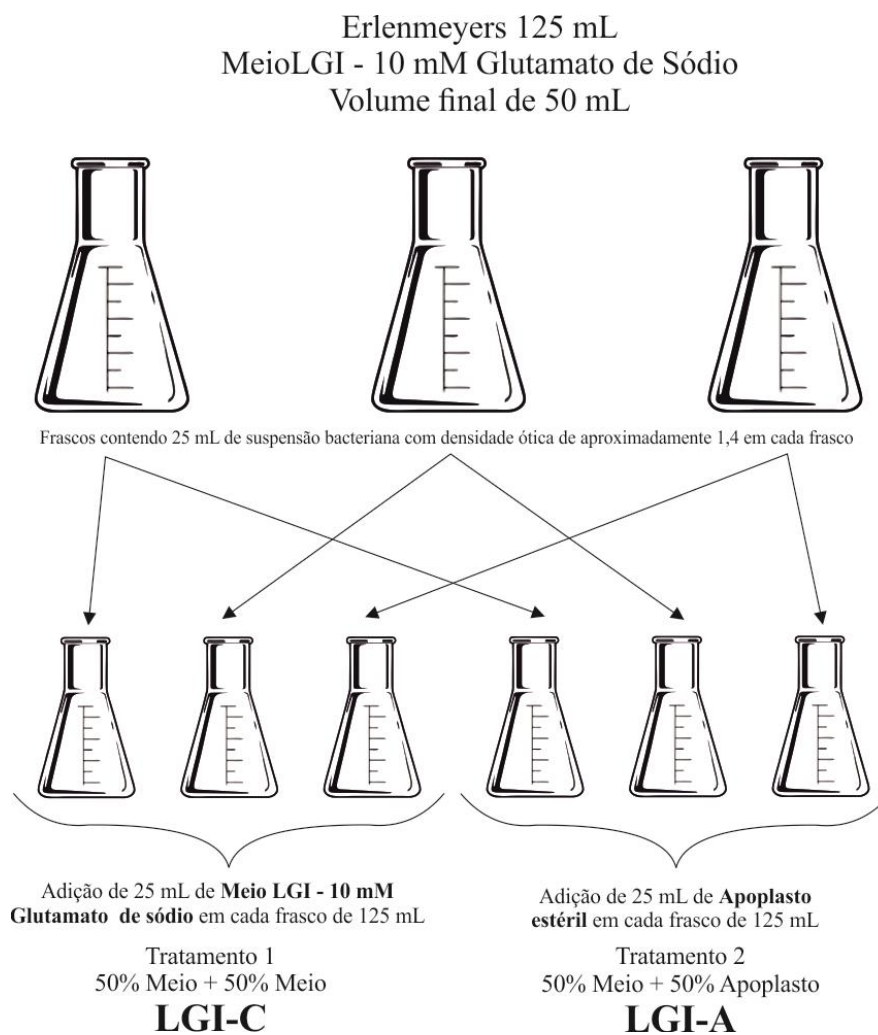


Figura 4. Desenho experimental para obtenção das amostras de células cultivadas na presença do controle (LGI-C) e fluido do apoplasto (LGI-A).

Os dois tratamentos foram em triplicata biológica, conforme indicado na Figura 4. Após duas horas da aplicação do tratamento, foram coletados 5 mL de suspensão bacteriana em

tubos de fundo cônico com capacidade de 15 mL livre de RNase para posterior extração de RNA. Os tubos foram centrifugados a 5000 x g por 2 min a 4°C e imediatamente foi realizada a extração de RNA total com as amostras frescas.

Para coleta de material biológico para análise proteica, o restante das amostras contendo aproximadamente 40 mL de suspensão bacteriana foram transferidas para tubos de fundo cônico com capacidade para 50 mL livre de protease e centrifugadas a 8.000 x g por 5 min a 4°C para a sedimentação das células e início do protocolo para extração de proteínas.

3.8 Transcriptômica

3.8.1 Obtenção das amostras

a) Extração do RNA total das células, realizada usando o reagente Trizol (Invitrogen / Life Technologies) e o RNeasy Mini Kit (Qiagen).

A quantificação e avaliação das amostras resultantes foram realizadas com auxílio do espectrofotômetro Nanodrop® 2000c utilizando as razões da absorbância 260/280 e 260/230.

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluídica (*On-Chip electrophoresis*), utilizando o aparelho *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)* e com *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (código 5067-1511, *Agilent Technologies*) de acordo com as especificações do fabricante.

O RNA total foi tratado com DNase I (Epicentre) durante 30 min, por 65 °C para remoção de eventual DNA genômico contaminante. Em seguida, foi aplicado o protocolo do RNeasy Mini Kit (Qiagen). No fim do procedimento, o RNA foi eluído em 35 µL de água livre de RNase. A quantificação e avaliação da amostra de RNA foi feita através da determinação da absorbância a 260, 280 e 230 nm em espectrofotômetro (Fisher Scientific, model 500). A integridade do RNA total purificado foi novamente avaliada no aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent* com o mesmo kit descrito acima (*Agilent Technologies*).

b) Para a remoção (depleção) do RNA ribossomal (23S e 16S) foi usado o kit *MICROBEExpress™* (Ambion) seguindo as instruções do fabricante. Com isto, ocorreu o enriquecimento do mRNA, rRNA 5S e sRNA. Na primeira etapa são adicionados 200 µL de tampão de ligação (*Binding Buffer*) para um tubo de micro centrífuga com capacidade para 1,5 mL, onde foram adicionados 7 µL de RNA total livre de DNA, que corresponde a 10 µg. Após intensa agitação dos tubos para efetiva mistura do conteúdo, foram adicionados 4 µL da mistura de oligonucleotídeos de captura (*Capture Oligo Mix*), seguindo de intensa agitação. A mistura foi submetida à incubação em temperatura de 70°C por 10 min para desnaturar as estruturas secundárias do rRNA 16S e 23S, com o objetivo de facilitar a máxima hibridização do rRNAs aos oligonucleotídeos de captura (*Capture Oligo Mix*). Os tubos foram incubados a 37°C por 15 min propiciando o anelamento dos oligonucleotídeos às sequências homólogas presentes das moléculas do 16S e 23S rRNAs. Durante este mesmo período de 15 min de incubação, as esferas magnéticas acopladas a oligonucleotídeos [*Oligo Mag Beads (OMBs)*] foram reconstituídas, ou seja, uma alíquota correspondente a 50 µL de solução contendo as OMBs foram transferidas para tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 mL e colocados na estante magnética por 3 min para decantação. Após esse período o sobrenadante foi removido cuidadosamente por aspiração e descartado.

c) Ao preparo dos *Oligo Mag Beads (OMBs)* foram adicionados 50 µL de água livre de RNase para sua ressuspensão. Os tubos foram novamente colocados na estante magnética por 3 min, seguido de remoção e descarte do sobrenadante. Aos OMBs foram adicionados 50 µL de tampão de ligação (*Binding Buffer*) para sua ressuspensão. Os tubos foram mais uma vez colocados na estante magnética por 3 min, seguido de remoção e descarte do sobrenadante. E

finalmente, foram adicionados 50 μL de tampão de ligação (*Binding Buffer*) às amostras, e estas foram homogeneizadas e incubadas a 37°C.

d) Para captação do rRNA e recuperação do mRNA enriquecido, os 50 μL de OMBs, já reconstituídos, foram adicionados em cada amostra de RNA, homogeneizados e, incubados a 37°C por 15 min. Após este período as amostras foram colocadas na estante magnética por 3 min e, o sobrenadante contendo o mRNA enriquecido foi transferido para tubos novos e mantidos em gelo.

e) Na etapa de precipitação, o mRNA enriquecido foi adicionado 1/10 do volume de sulfato de sódio a 3 mol.l^{-1} , 1/50 de glicogênio, 3 vezes de álcool etílico a 100% gelado. O mRNA foi incubado a -20°C cerca de 16 horas durante a noite. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 10.000 xg e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foi adicionado etanol 70% gelado, homogeneizado e seguido por centrifugação a 10.000 xg por 5 min, descartando o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 12 μL de água ultrapura livre de RNase e reidratado por 15 min a temperatura ambiente. Após a redissolução, os tubos foram colocados na estante magnética para remover o restante de OMBs, o sobrenadante foi transferido para tubos novos. A eficiência de remoção do rRNA foi acompanhada por meio de quantificação em equipamento *Agilent Bioanalyser* empregando o RNA Pico Chip obtendo-se assim a quantificação real do mRNA.

f) O protocolo para a fragmentação de mRNA foi aplicado conforme o manual do Ion Total RNA-Seq Kit v2. Toda a reação de PCR foi preparada em banho de gelo em tubos de 0,2 mL com material de 8-10 μL (rRNA total depletado 10-500 ng). Em seguida foi adicionado 1 μL de tampão de reação 10x RNase III e 1 μL de RNA III, com homogeneização por meio de cinco pipetagens. A reação foi incubada em termociclador a 37°C por 10 min (rRNA depletado 100-200 ng). Após a incubação, foram adicionados 20 μL de água livre de nucleases ao RNA fragmentando e o material colocado em banho de gelo.

g) Os tubos contendo as esferas magnéticas (*Beads*) foram agitados para a completa ressusensão, posteriormente, uma alíquota de 5 μL dessa suspensão de esferas magnéticas foi adicionada a 90 μL de solução de ligação (*Binding Solution*), seguido de homogeneização por pipetagens. A mistura com os fragmentos do RNA (30 μL de cada reação) foi transferida para os tubos que continham as esferas magnéticas, e colocados no suporte. Adicionou-se à mistura 150 μL de etanol 100%, seguido por homogeneização com pipetagem (10 vezes). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 5 min nas estantes magnéticas, seguido pela remoção e descarte do sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 150 μL de solução de lavagem concentrada (*Wash Solution Concentrate*) com etanol em cada amostra. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 segundos nas estantes magnéticas. O sobrenadante foi removido e descartado e as esferas magnéticas foram secas ao ar. Posteriormente, os tubos com as esferas magnéticas foram removidos das estantes, aos quais foram adicionados 12 μL de água livre de nucleases (Pré-aquecida a 37°C) e a mistura foi homogeneizada por pipetagem (10 vezes). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto, em seguida os tubos foram colocados nas estantes magnéticas. Após a solução ficar translúcida (cerca de 5 min) o sobrenadante foi coletado.

h) Para a construção da biblioteca de cDNA, a mistura para realização do trabalho foi preparada incubada em gelo. A reação de trabalho foi composta de 2 μL de mistura de adaptadores (*Ion Adaptor Mix v2*) e 3 μL de solução de hibridização (*Hybridization Solution*) para cada amostra. Foram adicionados 3 μL de solução de RNA mensageiro (mRNA) fragmentado a 5 μL da mistura e gentilmente homogeneizado por pipetagem aproximadamente 10 vezes. A reação de hibridização foi realizada em termociclador a temperatura de 65°C por 10 min, seguido de 30°C por 5 min. Posteriormente, foram

adicionados 10 μL de tampão de ligação 2 x concentrado e 2 μL de mistura de enzima de ligação em cada amostra. A solução foi homogeneizada por pipetagem e incubada no termociclador a 30°C durante 1 hora. Posteriormente, a mistura para realização de transcrição reversa foi preparada incubada no gelo. A mistura contendo volume de 16 μL [2 μL de água livre de nucleasse, 4 μL de tampão de transcrição reversa 10X concentrado, 2 μL de solução de dNTP 2,5 mM e 8 μL de Ion RT Primer v2 para cada reação de ligação] foi adicionada 20 μL da reação de ligação, seguido por homogeneização. A reação foi incubada em termociclador a 70°C por 10 min, e em seguida a reação foi incubada no gelo. Adicionou-se a reação 4 μL de 10X SuperScript® Enzyme Mix, a reação foi homogeneizada e incubada em termociclador a 42°C por 30 min.

i) A purificação do cDNA foi realizada de acordo com o protocolo SOLiD® Total RNA-Seq kit. Esta etapa tem o objetivo de selecionar fragmentos de 100 pb ou maiores. Para cada 40 μL de amostra foram adicionados 72 μL de Agencourt® AMPure® XP Reagent, seguido por homogeneização. A solução foi transferida para microplacas de 96 poços com suporte magnético e incubada a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida a placa foi colocada no suporte magnético por 2 a 5 min, com finalidade de separar as esferas magnéticas da solução. Após a deposição das microesferas, o sobrenadante foi removido e descartado. As esferas magnéticas foram lavadas com 200 μL de solução de etanol 70% (v/v), seguido pela incubação da solução à temperatura ambiente por 30 segundos. Posteriormente, o etanol foi aspirado e descartado, e a placa foi retirada da estante quando foram adicionados 40 μL de água livre de nuclease em cada amostra para eluir o cDNA. A placa foi novamente colocada na estante magnética para separar as esferas da solução por 2 a 5 min, até a solução ficar clara. O sobrenadante (40 μL) foi transferido para novo poço vazio para uma segunda fase de purificação e seleção do tamanho de fragmentos de 150 pb ou mais. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. As esferas magnéticas e a solução contida na placa foram separadas usando estante magnética pelo tempo de 2 a 5 min. Quando a solução ficou clara, o sobrenadante foi aspirado e descartado. A cada amostra foram adicionados 200 μL de etanol 70% (v/v) a cada amostra, seguido por incubação à temperatura ambiente por 30 segundos. Após a solução ficar clara, o sobrenadante foi aspirado e descartado. Após a retirada da placa da estante magnética, as esferas magnéticas foram secas à temperatura ambiente por 5 min. A cada amostra foram adicionadas 40 μL de água livre de nuclease e o material foi homogeneizada para eluir o cDNA. A placa foi colocada na estante magnética pelo tempo de 2 a 5 min para separar as esferas magnéticas da solução. Após a clarificação da solução foram transferidos 40 μL para tubo com capacidade de 0,2 mL.

j) Para cada amostra de cDNA, foi preparada uma mistura de PCR com volume total de 44 μL [33,4 μL de água livre de nuclease; 5 μL de tampão para PCR 10X concentrado (10X PCR Buffer), 4 μL de solução de dNTP; 1 μL de oligonucleotídeos 5' (SOLiD 5' PCR Primer) e 0,6 μL da enzima DNA polimerase (AmpliTaQ® DNA Polymerase)]. Um total de 5 μL de cada amostra de cDNA foi transferido para tubos novos de PCR. Em seguida, 44 μL da mistura de PCR foram adicionados às amostras de cDNA. Foi adicionado 1 μL de 3' PCR Primer diferente em cada amostra. As reações de PCR foram realizadas em termociclador, com as seguintes etapas: desnaturação a 95°C por 5 min; 18 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação); 62 °C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão) e extensão final por 72°C por 7 min.

k) Os tubos foram invertidos para homogeneização, depois foi transferido todo o produto de PCR com Binding Buffer para um micro kit coluna PureLink™ com tubo de coleta. Estes foram centrifugados por 1 minuto a 10.000 xg em temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 650 μL de tampão de lavagem (W1 – Washing Buffer) com etanol por amostra no micro kit Coluna Pure Link™ e centrifugados a 10.000 xg por 1 minuto em temperatura

ambiente. O material que passou pela coluna foi descartado e a coluna foi reinserida dentro do tubo de coleta, seguido por centrifugação a 14.000 xg por 1 minuto (Para secagem), a membrana sílica foi removida e o buffer foi lavado com etanol. Novamente foi descartado o material que passou pela coluna e micro kit coluna PureLink™ foi reinserido dentro do tubo de eluição. Foram adicionados 10 µl de tampão de eluição (E1 - 10 mmol. l-1 de Tris-HCl, pH 8,5) no centro da coluna e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. Para a coleta do cDNA purificado, centrifugou-se a 14.000 xg por 1 minuto, e descartou-se a coluna. O volume eluído recuperado foi de 9-10 µl e para armazenamento em longo prazo, o cDNA purificado foi estocado a -20°C, obtido assim o cDNA purificado.

l) Para a quantificação do cDNA foi realizada a qPCR de acordo com o manual KAPA Library Quantification Kits: Foram adicionados 5 mL de KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) a 1 ml de iniciadores 10X (Illumina Primer Premix 10X). Foram realizadas duas diluições da biblioteca de cDNA, 1:10 e 1:100, em solução com 10mM de Tris-HCl pH 8,0 e 0,05% de Tween 20. Para a montagem da placa de qPCR foram utilizados 12 µL de KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix contendo Primer Mix, 4 µL de água de PCR e 4 µL de DNA diluído ou DNA padrão. A corrida foi realizada com as seguintes etapas: ativação inicial a 95°C por 5 min; e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; e anelamento e extensão a 60°C por 45 segundos.

m) Para a PCR em emulsão foi utilizado o Ion One Touch™ 200 Template Kit v2 DL. Para isso foi preparada uma solução contendo: 280 µL de água livre de nuclease; 500 µL de Ion One Touch™ 2X Reagent Mix; 100 µL de Ion One Touch™ Enzyme Mix e 20 µL da biblioteca de DNA. Nesta solução foram adicionados 100 µL de Ion OneTouch™ 200 Ion Sphere™ Particles (ISPs) com volume total de 1.000 µL. Esse volume foi inserido na entrada de amostra do Ion OneTouch™ Plus Reaction Filter Assembly e, posteriormente, foram adicionados 1.500 µL de Ion OneTouch™ Reaction Oil no mesmo local, dando início a PCR em emulsão no equipamento. Posterior à corrida os tubos de recuperação foram removidos do aparelho, o sobrenadante foi removido e o sedimento contendo os ISPs foi ressuspensado com a solução restante do tubo. Os ISPs ressuspensos foram centrifugados a 15.500 xg por 2,5 min. O sobrenadante foi removido.

3.8.2 Sequenciamento

Todo o experimento foi realizado em parceria com o grupo de Fixação de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná – UFPR. O sequenciamento foi realizado de acordo com protocolo Ion PI™ Sequencing 200 Kit v2. Primeiramente, 5 µL de Ion PI™ Control Ion Sphere foram adicionados aos ISPs previamente transferidos para tubos de PCR (Capacidade de 0,2 ml), seguido por homogeneização. A mistura foi centrifugada a 15.500 xg por 5 min, e após o sobrenadante foi removido. Foram adicionados 15 µL de Ion PITM Annealing Buffer, 20 µL de Ion PITM Sequencing Primer. O material foi homogeneizado e colocado em termociclador a 95°C por 2 min seguido de 37°C por 2 min. Foram adicionados 10 µL de tampão de corrida (Ion PITM Loading Buffer) e após o conteúdo foi homogeneizado. A amostra foi inserida CHIP e o mesmo foram por 10 min. Em seguida, o CHIP foi colocado no Ion Proton Semiconductor Sequence (Life).

3.8.3 Pré-processamento Ion Proton

Todas as amostras foram avaliadas quanto à qualidade usando o FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). O valor *Phred* (Q) é atribuído a qualidade de uma base e corresponde à probabilidade logarítmica negativa de uma base qualquer de uma leitura ter sido sequenciada erroneamente ($Q = -10 \log_{10} (Pe)$), onde Q

corresponde a qualidade e Pe à probabilidade de erro (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998).

3.8.4 Mapeamento das leituras do Ion Proton

As seis bibliotecas foram construídas a partir de três réplicas biológicas de cada um dos dois tratamentos. Todas as leituras de sequências de cDNA das bibliotecas LGI-C e LGI+A foram alinhadas contra o genoma da *Nitrospirillum amazonense* CBAmC (número de acesso do NCBI: CP022110.1, CP022111.1, CP022112.1 e CP022113.1) usando o programa de bioinformática CLC Genomics Workbench versão 7.5.1, com remoção de sequências contendo (≤ 20 pb), remoção das leituras ribossômicas (5S, 16S e 23S), quantificação do total de leituras únicas mapeadas no genoma da estirpe CBAmC. Leituras mapeadas para dois ou mais genes foram ignoradas.

A normalização das leituras foi feita pela unidade de expressão RPKM (MORTAZAVI et al., 2008), considerando o tamanho da biblioteca, o tamanho dos genes e o número de leituras por gene, utilizando a equação a seguir. As análises para a expressão diferencial dos genes foi feita no programa Microsoft Excel®.

$$\text{RPKM} = \frac{C \cdot 10^9}{L \cdot N}$$

Onde,

C = número de leituras por gene

L = tamanho do gene (kilobase)

N = tamanho da biblioteca (número total de leituras por replicata biológica).

A expressão diferencial dos genes foi avaliada comparando a abundância de transcritos entre os dois tratamentos. Após a normalização de todas as leituras, foi determinada a expressão gênica dos genes que obtiveram níveis de expressão maior que dois para os genes superexpressos e menor que -2 para os genes subexpressos nos dois tratamentos. A matriz e o dendrograma da análise transcriptômica foram gerados usando os programas Excel® e CLC Genomics Workbench versão 7.5.1, respectivamente.

3.9 Análises Estatísticas

Os genes diferencialmente expressos foram determinados com valores de p (*p-value*) < 0,05. Para isso, foram usadas três análises estatísticas: o teste-t de Student, incluso no programa CLC Genomics Workbench versão 7.5.1, o pacote Deseq2 (ANDERS e HUBER, 2010; LOVE et al., 2014;) e o pacote EdgeR (ROBINSON et al., 2010), ambos do projeto Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>). O diagrama de Venn foi gerado automaticamente dos genes validados estatisticamente (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

3.10 Proteômica

3.10.1 Obtenção das amostras

a) Para o processamento da amostra, o sedimento celular armazenado a -20°C foi ressuspenso em 1mL de solução de ressuspensão (10 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl, 1,5 mmol.L⁻¹ de MgCl₂ e 10 mmol.L⁻¹ de KCl, pH 8,0) e, posteriormente, recuperado o sedimento celular por meio de centrifugação por 10 min a 12.000 x g a 4 °C. O sedimento foi novamente ressuspenso em 2 mL de solução de ressuspensão.

b) Na etapa do método de lise foram adicionados ao sedimento celular 0,5 mL de solução de solubilização contendo 7 mol.L⁻¹ de uréia (GE Healthcare, Freiburg, Germany) , 2 mol.L⁻¹ de

tiouréia (GE Healthcare), 2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 1 mmol.L⁻¹ de PMSF (*phenilmetilsulfonil fluoride*, Sigma-Aldrich) e 20 mM de DTT (Ditiotreitol, GE Healthcare). O sistema foi agitado vigorosamente por 30 segundos e em seguida mantido por 30 min a temperatura ambiente sob agitação. A sonicação para lise celular e liberação do conteúdo proteico seguiu em banho de gelo com 10 ciclos de 20 segundos de pulso a 10% de amplitude intercalada por um período de repouso de 1 minuto, no sonicador (Fisher Scientific, model 500). Em seguida, o sistema foi centrifugado por 90 min a 12.000 x g a 4°C e o sobrenadante foi coletado para novo tubo.

A concentração de proteína foi estimada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare) usando albumina de soro bovino (BSA, GE Healthcare) como padrão, e as amostras foram armazenadas a -20 ° C até análises proteômicas.

c) A digestão de proteínas foi aplicada para a formação de peptídeos. Para a digestão de proteínas, foram utilizadas três repetições biológicas de 100 µg de proteínas. Antes do passo de digestão com tripsina, as proteínas foram precipitadas utilizando a metodologia metanol / clorofórmio para remover qualquer detergente das amostras (NANJO et al., 2012). Em seguida, as proteínas foram ressolubilizadas em solução de ureia 7 mol.L⁻¹, tiourea 2 mol.L⁻¹, e a solução resultante foi dessalinizada em filtros de centrifugação Amicon Ultra-0,5 3 kDa (Merck Millipore, Alemanha). Os filtros foram cheios até à capacidade máxima com bicarbonato de amônio e centrifugados a 15 000 × g durante 10 min a 20° C. Foram realizados dois ciclos de lavagem dos filtros com ureia 8 mol.L⁻¹, seguidos de depois mais dois ciclos com bicarbonato de amônio a 50 mmol.L⁻¹ (Sigma-Aldrich) pH 8,5, restando aproximadamente 50 µL por amostra após a última lavagem.

d) A metodologia utilizada para a digestão proteica foi a descrita anteriormente (CALDERAN-RODRIGUES et al., 2014). Para cada amostra foram adicionados 25 µL de RapiGest®, auxiliando na digestão de proteínas, tornando suscetível a clivagem enzimática, (Waters, Milford, CT, EUA) a 0,2% (v/v) e as amostras foram brevemente agitadas em vórtice e incubadas a 80 ° C durante 15 min, agitando por 1 minuto e descansando 5 min. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de solução de DTT a 100 mmol.L⁻¹ (GE Healthcare), e os tubos foram submetidos a agitação em vórtice e incubados a 60 ° C durante 30 min sob agitação. Em seguida, adicionaram-se 2,5 µL de iodoacetamida 300 mmol.L⁻¹ (GE Healthcare) e as amostras foram submetidas a vórtice e depois incubadas no escuro durante 30 min à temperatura ambiente. Depois disso, foram adicionados 5 µL de DTT 100 mmol.L⁻¹ para reduzir o excesso de iodoacetamida. A digestão foi realizada adicionando-se 20 µL de solução de tripsina (50 ng. µL⁻¹, código V5111, Promega, Madison, WI, EUA) preparada em bicarbonato de amônio 50 mmol.L⁻¹ e incubando-se a 37 ° C durante 15 h. Para a precipitação de RapiGest® e inibição da atividade de tripsina, foram adicionados 10 µL de ácido trifluoroacético a 5% (v/v) (TFA, Sigma-Aldrich), e o sistema foi incubado a 37 ° C durante 30 min, seguindo-se um passo de centrifugação de 20 min a 16 000 × g. As amostras foram transferidas para frascos (Waters Total Recovery Vial, Waters®).

e) Todo o experimento foi realizado em parceria com o grupo de Genômica e Proteômica da Unidade de Biologia Integrativa da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. Foi utilizado nanoACQUITY UPCL® conectado a um espectrômetro de massa Synapt G2-Si HDMS (Waters, Manchester, UK) para análise ESI-LC-MS / MS. A etapa de cromatografia foi realizada injetando 1 µL de amostra digerida (500 ng.µL⁻¹). Para assegurar valores molares padronizados para todas as condições, a normalização entre as amostras foi baseada em medições estequiométricas da contagem total de íons totais das corridas das corridas de aferição antes das análises. As corridas consistiam de três repetições biológicas. Durante a separação, as amostras foram carregadas na coluna nanoAcquity UPLC

5 μm C18 (180 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$) a 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 3 min e depois para a coluna de fase reversa analítica de nanoAcquity HSS T3 de 1,8 μm (75 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm}$) a 400 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$, com uma temperatura da coluna de 45 ° C. Para a eluição peptídica utilizou-se um gradiente binário, com fase móvel A constituída por água (Tedia, Fairfield, Ohio, EUA) e ácido fórmico a 0,1% (Sigma-Aldrich) e fase móvel B constituída por acetonitrila (SigmaAldrich) e ácido fórmico a 0,1%. A eluição com gradiente iniciou-se a 7% de B, em seguida, aumentou para 40% de B até 91,12 min para 99,9% de B até 92,72 min, sendo mantida até 106,00 min, diminuindo para 7% de B até 106,1 min e manteve-se 7% de B até ao final do experimento a 120,00 min. A espectrometria de massa foi realizada em modo positivo e de resolução (modo V), 35.000 FWHM (do inglês, *full width at half maximum*), com mobilidade iônica e em modo de aquisição independente de dados (DIA); utilizando velocidade de onda IMS (do inglês, *Ion Mobility Spectrometry*) de 600 m / s, e hélio e fluxo de gás IMS de 180 e 90 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente; a energia de colisão de transferência aumentou de 19 V para 55 V no modo de alta energia; cone e voltagens capilares de 30 V e 2750 V, respectivamente; e uma temperatura de fonte de 70 ° C. Em parâmetros TOF (do inglês, *Time-Of-Flight*), o tempo de varredura foi ajustado para 0,5 s em modo contínuo com uma faixa de massa de 50 a 2000 Da. O (Glu1)-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a 100 $\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi utilizado como um calibrador externo e a aquisição de massa de bloqueio foi realizada a cada 30 s. A aquisição de espectros de massa foi realizada pelo software MassLynx v4.0.

3.10.2 Bioinformática

O processamento de espectros e as condições de pesquisa de bases de dados foram realizados por Progenesis QI para Proteomics Software V.2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, RU). A análise utilizou os seguintes parâmetros: Apex3D de 150 contagens para limiar de baixa energia, 50 contagens para limiar energético elevado e 750 contagens para limiar de intensidade; uma fração perdida, um fragmento mínimo por peptídeo igual a dois, um fragmento mínimo por proteína igual a cinco, um peptídeo mínimo por proteína igual a dois, modificações fixas de carbamidometila (C) e modificações variáveis de oxidação (M) e fosforilação (STY), e um valor de taxa de descoberta falso padrão (FDR) a um máximo de 4%, pontuação de peptídeo maior do que quatro e erros de massa máxima de 10 ppm. A análise utilizou o banco de dados de proteínas da estirpe CBAmC de *Nitrospirillum amazonense*. As análises quantitativas relativas livres de rótulos foram realizadas com base na razão de contagem de íons de proteína entre amostras contrastantes. Após o processamento dos dados e para garantir a qualidade dos resultados, apenas proteínas únicas ou presentes em 3 de 3 execuções foram aceitas. Além disso, proteínas diferencialmente abundantes foram selecionadas com base em uma mudança de 1,5 vezes e test-T Student $P < 0,05$. A anotação funcional foi realizada usando o software Blast2Go v. 3.4 (CONESA et al., 2005).

3.11 Análises de Genes Ortólogos

A fim de conhecer as proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos utilizou-se a ferramenta de bioinformática Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>) (CONESA et al., 2005). Também foi utilizada para apresentação dos dados a classificação das categorias funcionais de genes ortólogos (COG) realizada pelo servidor on-line WebMGA (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/metagenomicanalysis/server/cog/>).

3.12 Análise de Correlação entre Transcriptômica e Proteoma

De acordo com os dados das análises de transcriptômica e proteômica, os transcritos diferencialmente expressos (TDEs) foram identificados com os critérios de níveis de expressão de ≥ 2 vezes (superexpressos) e níveis de expressão de ≤ -2 vezes (subexpressos), enquanto as proteínas diferencialmente expressas (PDEs) foram identificados com os

critérios de níveis de expressão de $\geq 1,5$ vezes (superexpressos) e níveis de expressão de $\leq 1,5$ vezes (subexpressos) por proteína a nível de abundância.

O valor médio da expressão do LGI-A é relativo ao LGI-C. Se o valor médio da expressão do LGI-A for maior que o do LGI-C, o valor médio da expressão é obtido pelo LGI-A dividido pelo LGI-C (superexpressos). O valor médio da expressão de LGI-C é obtido dividindo pelo LGI-A com sinal negativo (subexpressos).

O gráfico de cordas foi gerado pelo pacote GOPlot (WALTER et al., 2015). O gráfico de correlação foi gerado pelo programa SigmaPlot (versão 11.0).

Na análise comparativa entre o transcriptômica e proteômica, quando uma proteína e transcritos foram expressos, foi considerado como correlacionado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil de Crescimento

Com o objetivo de estudar qual seria a fonte de nitrogênio mais adequada e possíveis alterações no pH no meio de cultura da estirpe CBAmC contendo o fluido do apoplasto de cana-de-açúcar ao longo do crescimento, foram testados sete tratamentos (Figura 5) com pH inicial de 6,0 (Figura 6) e volume final de 5 mL e a densidade ótica avaliados em placa de 96 poços de fundo chato.

Os ensaios consistindo de meio LGI simples contendo 10 e 20 mM de cloreto de amônio resultaram em rápido declínio provavelmente devido à acidificação do meio de cultura para pH 4,5, condições estas estressantes para a *N. amazonense* estirpe CBAmC. O perfil de crescimento no meio LGI contendo 10 mM de glutamato de sódio apresentou os maiores índices de crescimento bacteriano, e pH final de 7,5. O ensaio consistindo de meio LGI contendo 20 mM de glutamato de sódio e o meio 50% água MilliQ + 50 % líquido do apoplasto apresentaram crescimento exponencial lento até o final do experimento, não sendo possível detectar a fase estacionária e posterior declínio da densidade ótica. O tratamento com 50% LGI contendo 10 mM de glutamato de sódio + líquido do apoplasto resultou em rápido crescimento exponencial e fase estacionária estável, sem apresentar declínio e o pH manteve-se constante durante todo o experimento (Figura 6). No final do experimento, todas as culturas foram reinoculadas em meio sólido batata-glicose para verificar a viabilidade das células bacterianas. Apenas o meio contendo 50% de meio LGI 10 mM de glutamato de sódio + 50% líquido do apoplasto estéril apresentou crescimento bacteriano (dados não mostrados). Por este motivo, foi escolhido o meio 50% LGI contendo 10 mM glutamato de sódio + 50% líquido do apoplasto para estudos de transcriptômica e proteômica por apresentarem condições ótimas para o metabolismo da *N. amazonense*.

A partir do perfil de crescimento da estirpe CBAmC nas diferentes condições de cultivo (Figura 5) a condição de crescimento LGI 10 mM de glutamato de sódio foi selecionada para ser utilizada na presença do fluido de apoplasto de modo a avaliar posteriormente a expressão gênica (RNA-Seq e análise proteômica), da bactéria na presença do fluido do apoplasto.

O perfil de crescimento contendo LGI 10 mM de glutamato de sódio foi determinado utilizando-se frascos de erlenmeyer de 125 mL para estabelecer o melhor ponto de coleta de amostras (Figura 7). Observa-se que *N. amazonense*, por densidade ótica, apresentou um crescimento relativamente lento em meio LGI contendo 10 mM de glutamato de sódio até às 20 horas de incubação, seguido por uma fase exponencial até, aproximadamente, 38 horas de incubação, seguida por uma fase estacionária. Na metade desta fase exponencial (27 horas após a inoculação inicial) foi realizada a aplicação dos tratamentos e, 2 horas após foram coletadas as amostras biológicas para extração de RNA total e de proteínas (Figura 7).

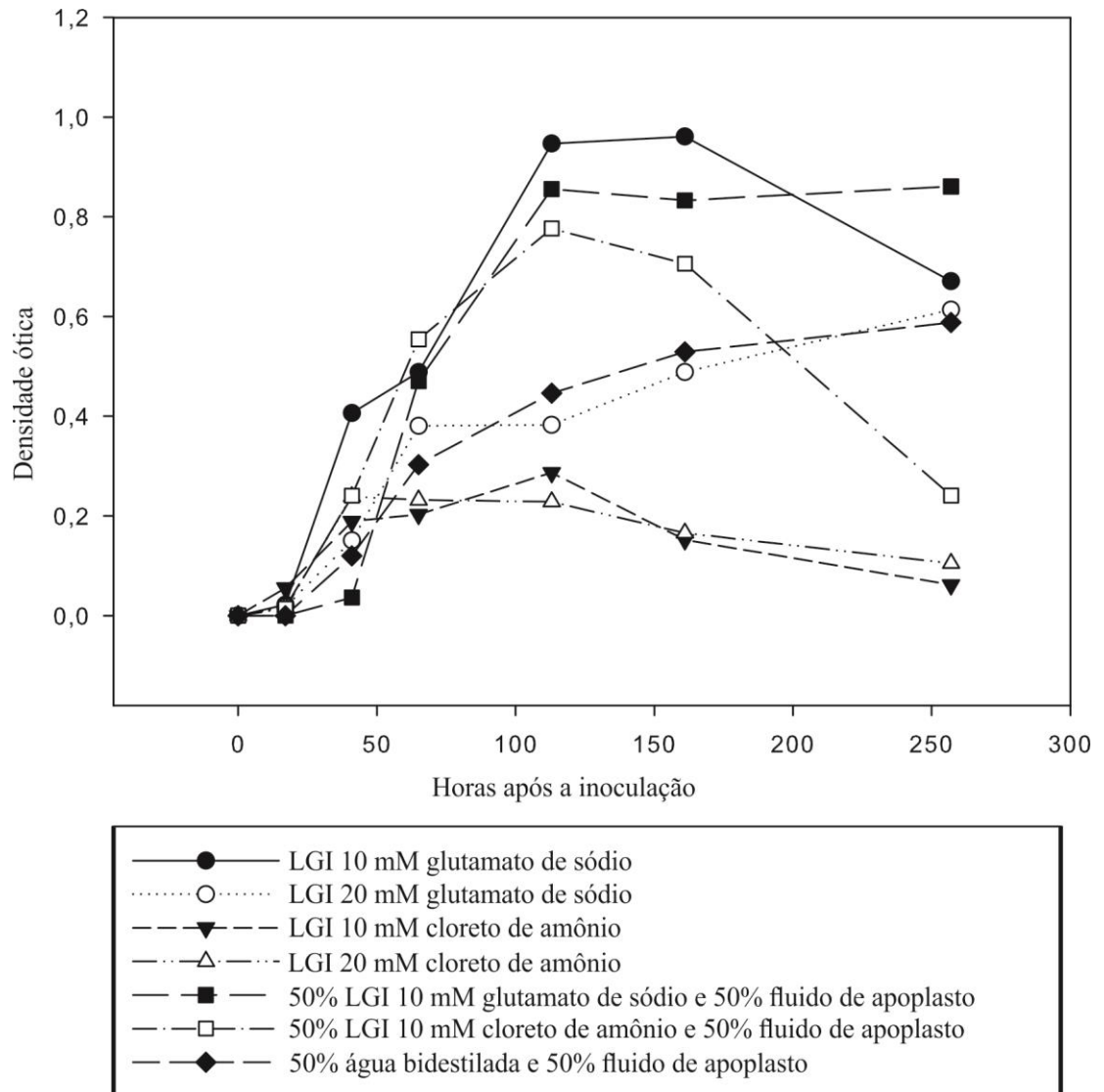


Figura 5. Perfis de crescimento de *N. amazonense* em sete condições diferentes de cultivo em função dos valores obtidos pela densidade ótica, ao longo de 257 horas de incubação a 30 °C e 180 rpm.

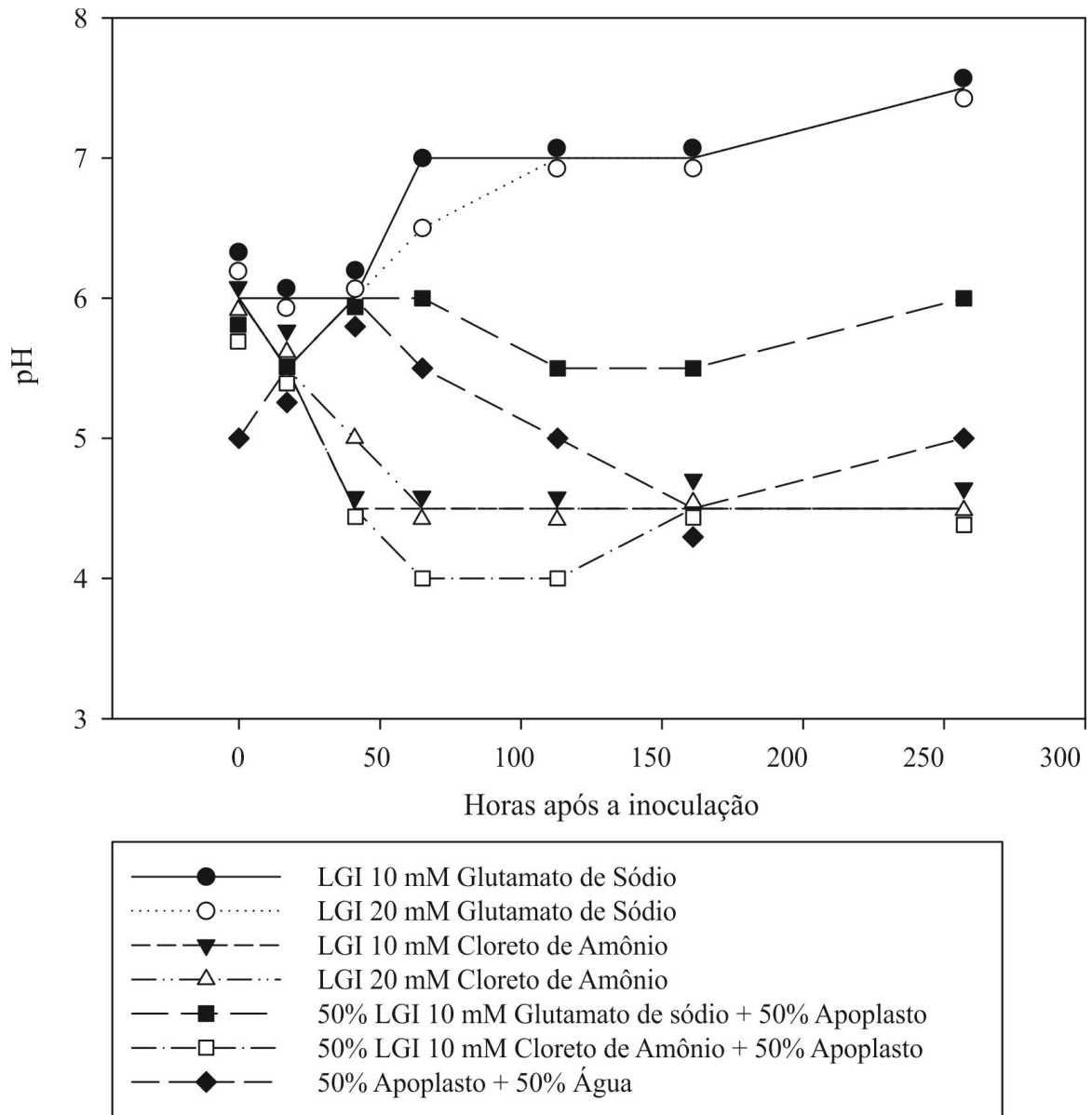


Figura 6. Variação do pH no meio de cultura de *N. amazonense*, de acordo com a composição inicial do meio, ao longo de 257 horas de incubação a 30° C e 180 rpm.

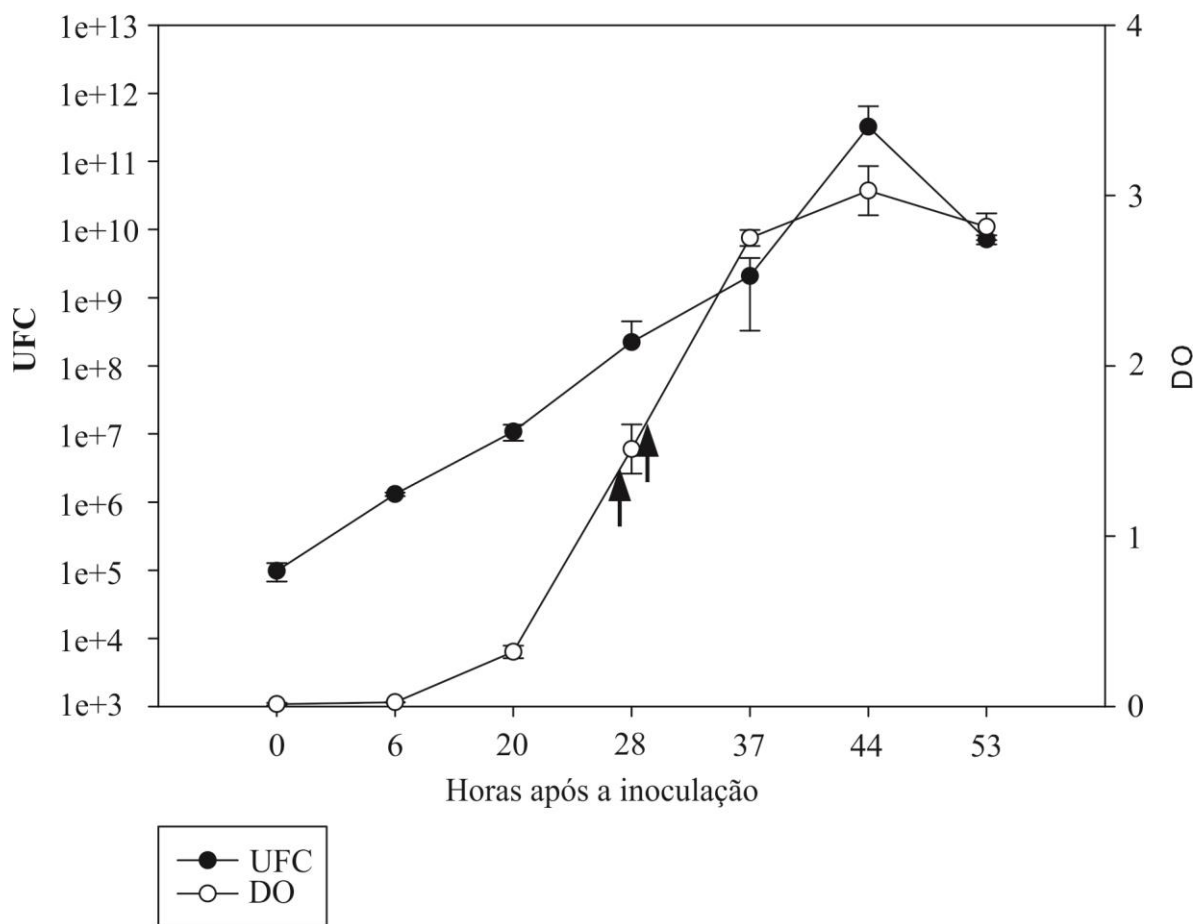


Figura 7. Perfil de crescimento de *N. amazonense* em meio LGI + 10 mM de glutamato de sódio, em função dos valores obtidos para densidade óptica e unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹), ao longo de 53 horas de incubação a 30° C e 180 RPM. Seta 1 – Aplicação dos tratamentos 27 horas após a inoculação. Seta 2 – Coleta do RNA e Proteínas. UFC: unidades formadoras de colônias; DO: densidade óptica.

Cabe ressaltar que as diferentes condições de cultivo utilizadas neste experimento, em tubos de ensaio e com volume final de 5 mL, foi devido a dificuldade de adquirir o fluido de apoplasto (Figura 5). O perfil de crescimento determinado em erlenmeyer com o meio LGI suplementado com 10 mM de glutamato de sódio e volume final de 50 mL foi para estabelecer o melhor ponto de coleta das amostras de RNA e proteínas (Figura 7).

4.2 Perfil Químico do Líquido do Apostasto da Cana-de-açúcar RB867515

Para compreender melhor as condições nutricionais de cultivo que a bactéria *N. amazonense* estirpe CBAmC foi submetida na presença do fluido do apoplasto, foram realizados ensaios para determinar a concentração de macro e microelementos, íons inorgânicos, açúcares e proteínas (Tabela 1).

O fluido de apoplasto coletado da cana-de-açúcar variedade RB867515 e submetido a vários testes bioquímicos mostrou ser um líquido complexo em comparação ao meio líquido LGI contendo 10 mM de glutamato de sódio que consiste em meio de cultura definido em seus componentes. O fluido de apoplasto apresentou alta concentração de cálcio, magnésio e sacarose em comparação com o meio líquido LGI. As concentrações de potássio, fósforo, nitrogênio total foram superiores no meio LGI. O pH foi semelhante no LGI em relação ao

fluido de apoplasto. Cabe ressaltar que o fluido de apoplasto utilizado nos experimentos de transcriptômica e proteômica não foi o mesmo das análises químicas.

Tabela 1. Características químicas do líquido do apoplasto utilizado no cultivo da estirpe CBAmC

	Meio líquido LGI*	Fluido de apoplasto	Estimativa de meio LGI + fluido de apoplasto
Cálcio	5 mg.L ⁻¹	96,9 mg.L ⁻¹	51 mg.L ⁻¹
Potássio	2180 mg.L ⁻¹	260 mg.L ⁻¹	1220 mg.L ⁻¹
Magnésio	12 mg.L ⁻¹	175 mg.L ⁻¹	97 mg.L ⁻¹
Fósforo	570 mg.L ⁻¹	43 mg.L ⁻¹	307 mg.L ⁻¹
Nitrogênio total	140 mg.L ⁻¹	93 mg.L ⁻¹	116 mg.L ⁻¹
pH	6	5,7	5,7 – 6,0
N-Amônio	---	N/D**	---
N-Nitrato	---	6,08 mg.L ⁻¹	3,04 mg.L ⁻¹
N-amino livres	---	16,13 mg.L ⁻¹	8,04 mg.L ⁻¹
Sacarose	5 g.L ⁻¹	112 g.L ⁻¹	58,5 g.L ⁻¹
Açúcares redutores	---	5,74 g.L ⁻¹	2,87 g.L ⁻¹
Carboidratos totais	5 g.L ⁻¹	168,57 g.L ⁻¹	86,785 g.L ⁻¹
Proteínas	---	46,4 mg.L ⁻¹	23,2 mg.L ⁻¹

* Conforme formulação (não analisado)

** Não detectado

4.3 Confirmação da Identidade de *Nitrospirillum amazonense* estirpe CBAmC

Para confirmar a identidade das amostras de RNA e proteína como sendo da estirpe CBAmC, foi realizada uma análise de ARDRA (Figura 8). O resultado mostra que todas as amostras apresentaram sempre o mesmo perfil de bandas esperado (REIS et al., 2013), indicando que não houve contaminação durante o cultivo.

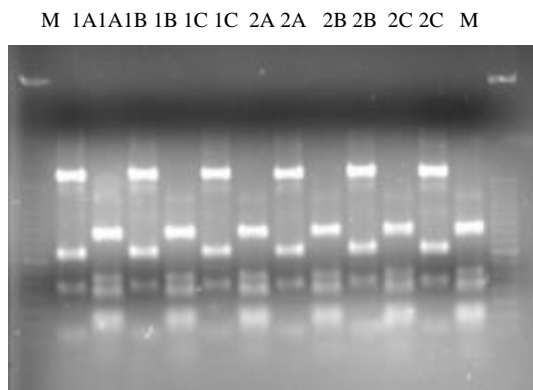


Figura 8. Perfil de restrição dos produtos de amplificação do gene 16S rRNA da estirpe CBAmC. *TaqI* e *DdeI* foram usadas na primeira e segunda banda de cada amostra, respectivamente. Legendas: M. 50 pb DNA Step Ladder, código G4521, Promega. LGI-C: 1A, 1B, 1C; LGI-A: 2A, 2B, 2C.

4.4 Qualidade das Amostras de RNA

A figura 9 revela a qualidade das amostras de RNA obtidas, apresentando pouco arraste, indicando que a extração resultou em material de RNA relativamente íntegro.

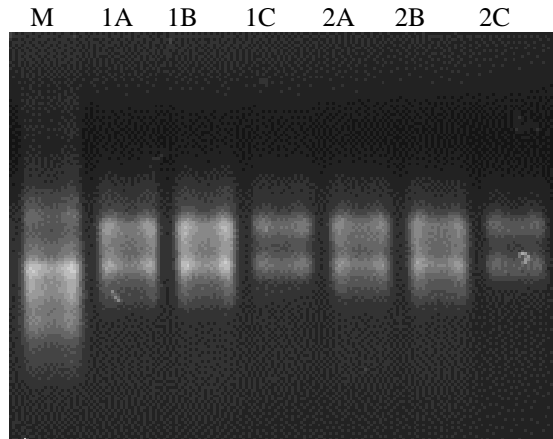
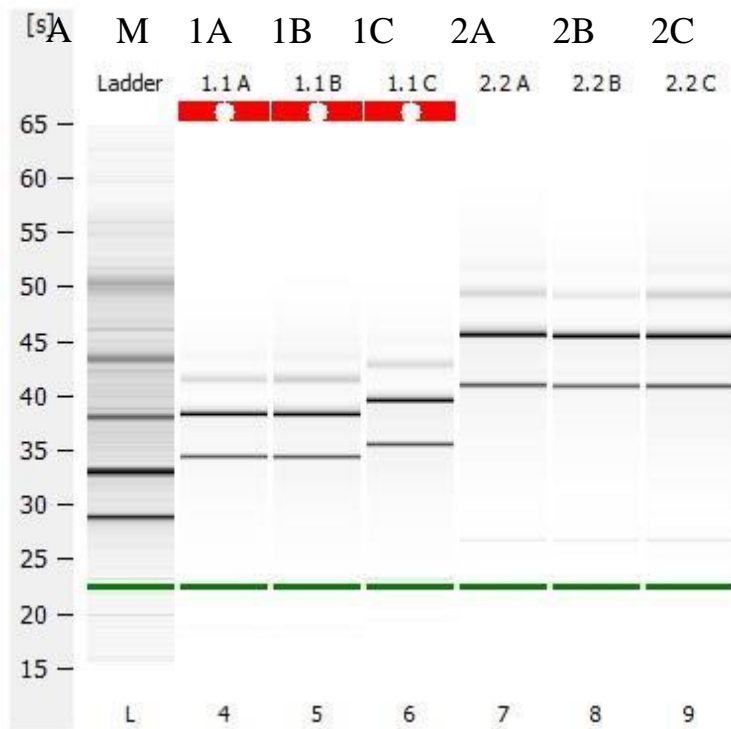


Figura 9. Integridade das amostras de RNA total purificado de células sem a presença do apoplasto (canaletas 1A a 1C) e com a presença do apoplasto (2A a 2C). As bandas correspondem ao rRNA 23S e 16S (de cima para baixo). (M. Padrão molecular 1 kB RNA Century Marker-Plus ladder, código AM7145, ThermoFisher Scientific).

Para melhor visualização de possível degradação das bandas das subunidades 23S e 16S de rRNA (superior e inferior, respectivamente) do RNA extraído, as amostras foram submetidas à análise no *Agilent BioAnalyzer* (Figura 10).



B	1A	1B	1C
	RIN: N/D*	RIN: N/D*	RIN: N/D*

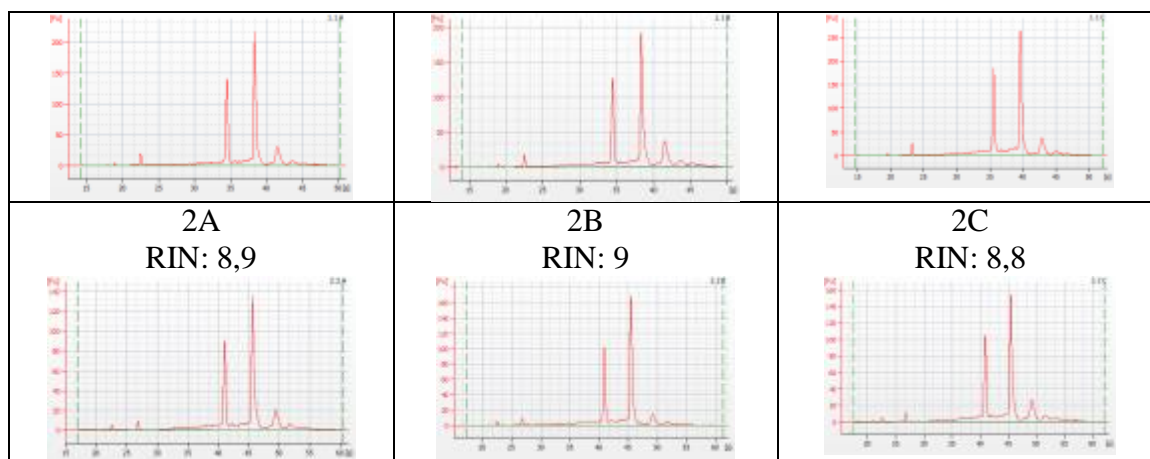


Figura 10. Avaliação da integridade do RNA total no Bioanalyzer (Agilent Technologies). Em A, está representada a separação das amostras de RNA total por eletroforese no *Agilent Bioanalyzer*. A coluna S representa a estimativa do tempo de corrida, a coluna M representa o marcador de tamanho, as amostras de RNA total purificadas de células sem a presença do apoplasto (colunas 1A a 1C) e com a presença do apoplasto (2A a 2C). Em B, correspondem à emissão de fluorescência medida durante a eletroforese das amostras, onde o eixo y exibe as unidades de fluorescência medidas e o eixo x o tempo da corrida em segundos. Os picos maiores apresentados na figura correspondem à fluorescência medida para o rRNA 16S e 23S, da esquerda para a direita. N/D: Não determinado.

4.5 Genoma da Estirpe CBAmC

A estirpe CBAmC possui quatro replicons com os seguintes tamanhos: 2,9 Mbp, 2,0 Mbp, 1,6 Mbp e 0,8 Mbp totalizando 7,39 Mbp. O conteúdo genômico de G + C de *Nitrospirillum amazonense* estirpe CBAmC é de 67,48%. O tamanho médio dos genes é de 1.039 pb, totalizando 6.193 sequências codificadoras que incluem 4.661 genes conhecidos, 26 de função desconhecida e 1506 codificando proteínas hipotéticas (SCHWAB et al., 2018). A sequência do genoma da estirpe CBAmC de *N. amazonense* foi depositada no NCBI sob os códigos CP022110.1, CP022111.1, CP022112.1 e CP022113.1.

4.6 Transcriptoma em Presença do Fluido do Apostasto

Para identificar os genes supostamente envolvidos na interação entre a *N. amazonense* estirpe CBAmC e a cana-de-açúcar variedade RB867515, realizou-se a análise transcriptômica consistindo no cultivo da estirpe CBAmC na presença do fluido de apoplasto da cana-de-açúcar durante duas horas.

O genoma da estirpe CBAmC depositado no banco de dados NCBI foi utilizado como referência. Foram removidas as sequências de baixa qualidade dos arquivos fastq, sequências curtas (≤ 20 pb) e sequências de RNA ribossomal/ribossômico (5S, 16S e 23S rRNA de *N. amazonense* CBAmC). As sequências apresentaram em geral qualidade subótima (escores de qualidade FASTQC > 20) e as bibliotecas foram consideradas aceitáveis para as análises subsequentes (Figura 11). No ensaio experimental foi obtido um total de 30,6 milhões de leituras, 10,7 milhões para o controle e 19,9 milhões para o tratamento com o fluido do apoplasto, destas 1,9 milhão e 2,1 milhões foram mapeadas de forma única contra o genoma de *N. amazonense* CBAmC, respectivamente (Tabela 2).

A análise transcriptômica permitiu identificar 1639 genes diferencialmente expressos representando um total de 26,3% do genoma da CBAmC, dos quais 12,28% foram subexpressos e 14,02% foram superexpressos.

A análise dos componentes principais (PCA) revelou uma separação distinta entre os tratamentos LGI-C e LGI-A, com as réplicas biológicas bem agrupadas entre si, indicando qualidade satisfatória dos dados de sequências das mesmas (Figura 12).

A razão que expressa a alteração dos níveis de expressão gênica (“fold-change”) e respectivos valores de probabilidade ou significância (valores p), para cada um dos transcritos detectados na análise de RNA-Seq, está representada no gráfico do tipo *volcano plot* da figura 13.

Após o mapeamento usando o genoma de referência para os tratamentos LGI-C e LGI-A, somente os genes que apresentaram níveis de expressão com mudança de ≤ -2 vezes para os genes subexpressos e mudanças de ≥ 2 vezes para os genes superexpressos e que apresentaram valor de $p < 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste t de Student, e os programas DESeq2 e EdgeR, enquanto que um diagrama de Venn foi construído para a visualização dos resultados (Figura 14). As análises estatísticas levaram à validação de 1.924, 2.028 e 2.503 transcritos pelo teste t de Student, e pelos programas DESeq2 e EdgeR, respectivamente, com valor $p < 0,05$.

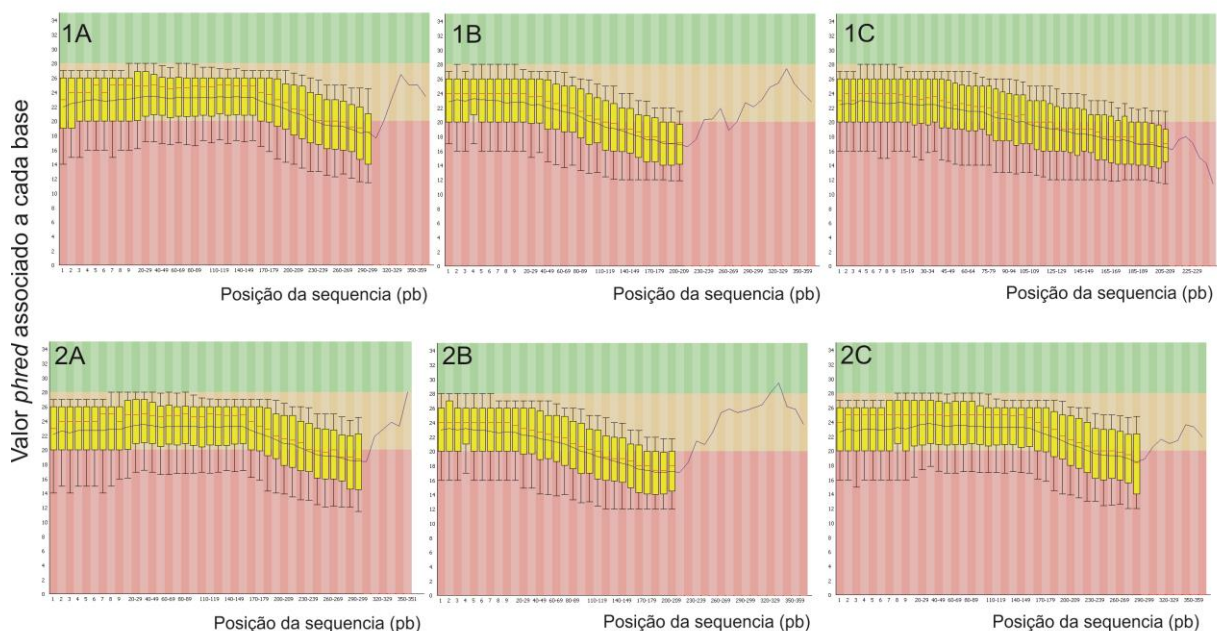


Figura 11. Análise de qualidade das leituras em triplicata das seis bibliotecas sequenciadas. No eixo X têm-se as posições das leituras (pb) e no eixo Y tem-se o valor Phred associado para estas posições. A região verde, laranja e rosa correspondem a valores Phred ótimo, subótimo e inapropriado, respectivamente. As barras amarelas correspondem a variação de qualidade em relação à posição de pb, sendo a linha vermelha, a mediana. A linha azul representa o valor da qualidade média.

Tabela 2. Estatística das sequências obtidas das bibliotecas transcriptômicas utilizando o programa CLC Genomics Workbench.

Amostras	Número de leituras brutas	Número de leituras após a remoção das leituras de rRNA	Total de leituras mapeadas unicamente no genoma de CBAmC
LGI-C	3.067.471	401.131	203.595
LGI-C	4.960.077	1.442.245	1.084.304
LGI-C	2.691.029	890.231	669.841
Total	10.718.577	2.733.607	1.957.740
LGI + A	5.514.402	771.442	358.771
LGI + A	1.616.609	678.072	487.242
LGI + A	12.828.295	2.427.780	1.262.636
Total	19.959.306	3.877.294	2.108.636

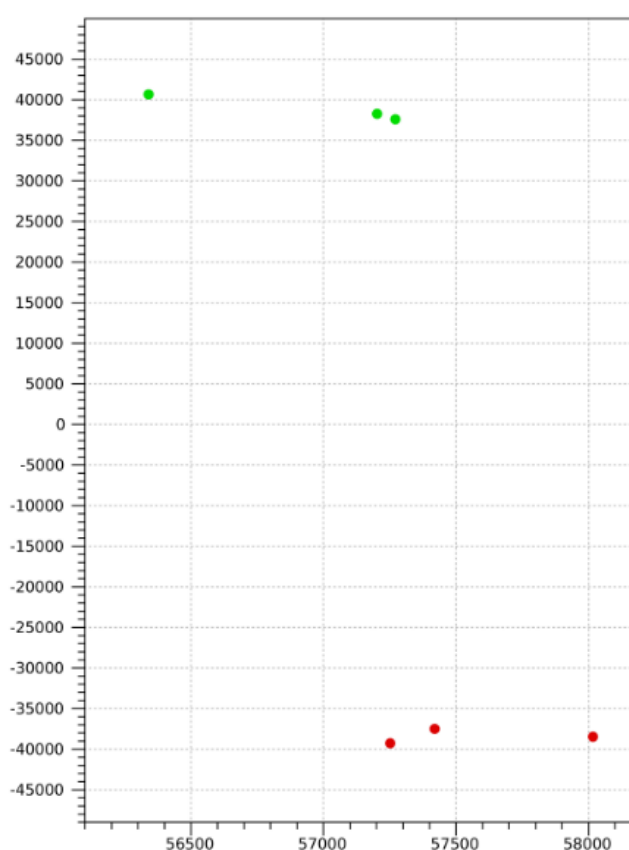


Figura 12. Análise dos componentes principais construído com os valores dos níveis de expressão em RPKM da análise transcriptômica de *N. amazonense* estirpe CBAmC em duas condições de cultivo. O eixo X indica o componente principal 1 e o eixo Y indica o principal componente 2. Círculos verdes e vermelhos representam os tratamentos LGI-C e LGI-A, respectivamente.

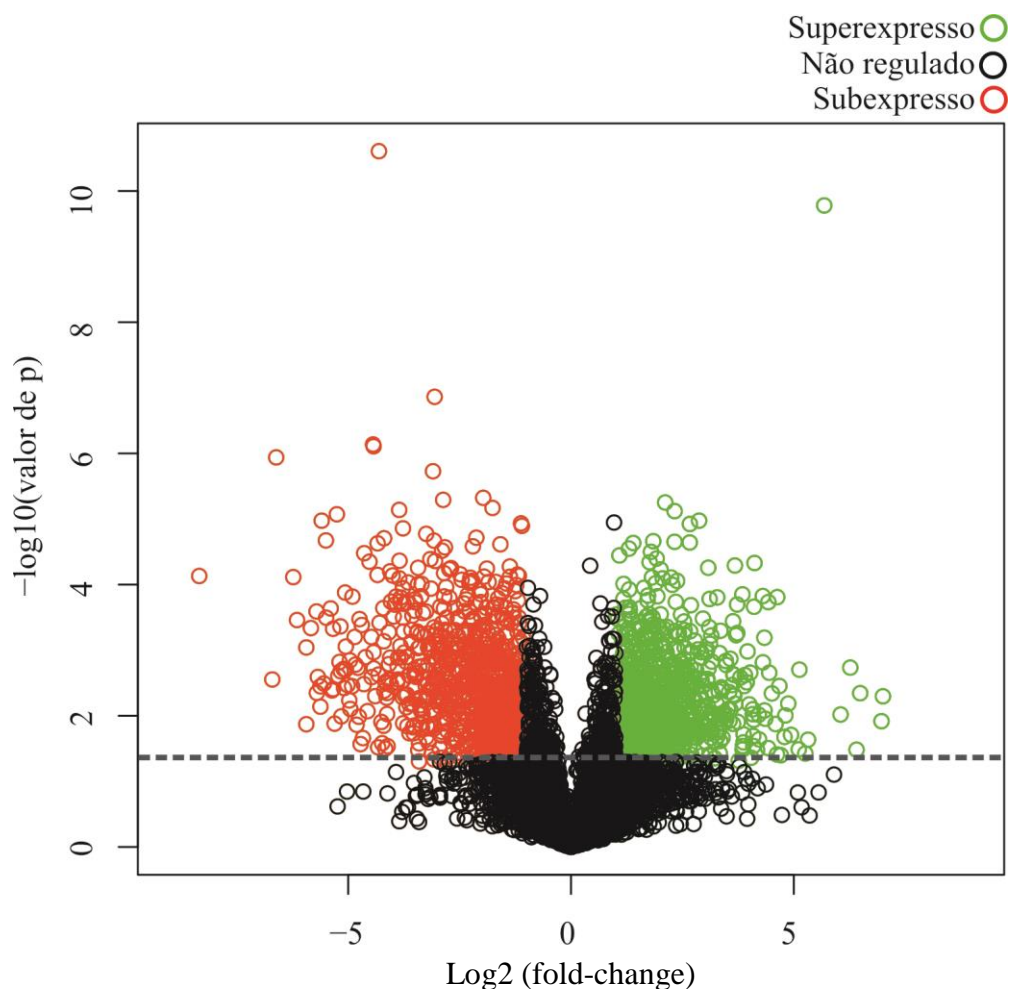


Figura 13. Gráfico do tipo Volcano Plot mostrando diferença de expressão de transcritos em células de *N. amazonense* estirpe CBAmC. O eixo horizontal é o fold-change entre os tratamentos em Log₂ e o eixo vertical representa o valor de p ajustados para $-\text{Log}_{10}$. Os pontos acima da linha tracejada indicam valores de $p < 0,05$. Os pontos vermelhos indicam os transcritos subexpressos (mudança de expressão < -2 vezes), os pontos verdes indicam os transcritos superexpressos (mudança de expressão > 2 vezes), os pontos pretos indicam os transcritos não regulados e os pontos pretos não indicam mudança significativa.

Após a análise estatística, foram selecionados 1.639 genes diferencialmente expressos em comum nas três análises estatísticas. Desses genes, 872 genes tiveram seus níveis de expressão reduzidos (genes subexpressos) e 767 genes tiveram seus níveis de expressão aumentados (superexpressos) quando a estirpe CBAmC foi cultivada com o fluido apoplasto.

O dendrograma com a matriz apresentada na Figura 15 mostra uma correlação (R^2) par-a-par de todas as amostras de acordo com os níveis de expressão de todos os genes diferencialmente expressos com valor de $p < 0,05$. As repetições biológicas mostraram um nível muito alto de correlação. As amostras do controle (1A, 1B e 1C) e as do tratamento experimental (2A, 2B e 2C) apresentaram média de $R^2 > 96$ e $R^2 > 93$, respectivamente, assim todas as bibliotecas de cada condição foram usadas para as análises posteriores.

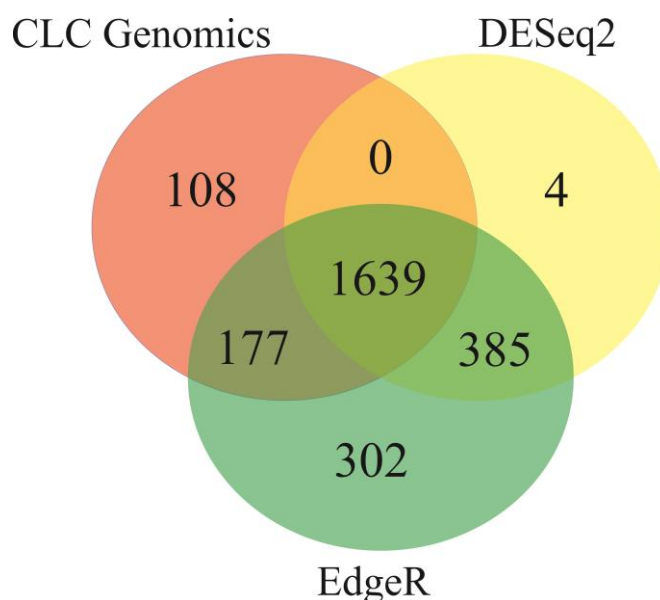


Figura 14. Distribuição de transcritos diferencialmente expressos com valor de $p < 0,05$ para diferentes métodos estatísticos.

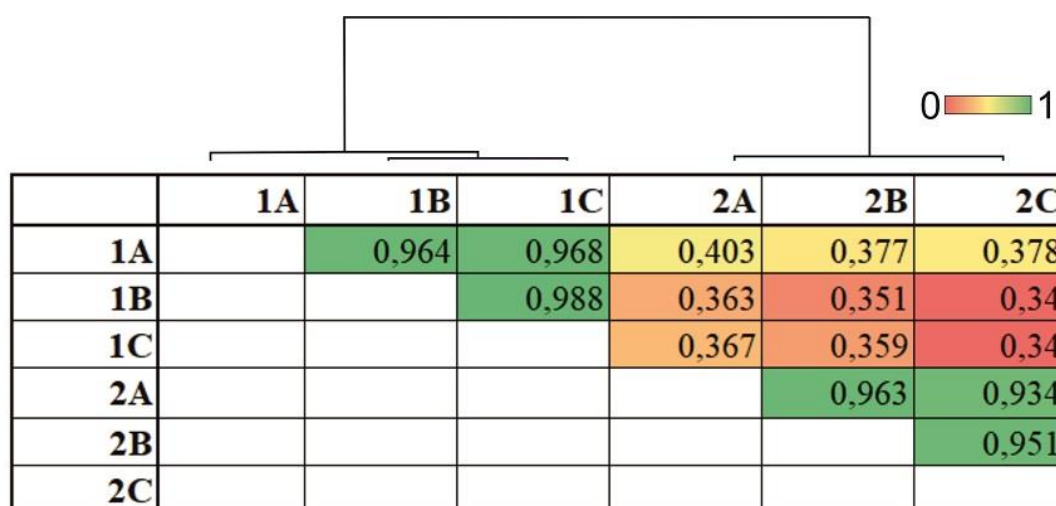


Figura 15. Matriz de correlação entre as réplicas biológicas e dendrograma de acordo com a identificação dos transcritos diferencialmente expressos com valor $p \leq 0,05$. LGI-C: 1A, 1B, 1C. LGI-A: 2A, 2B, 2C.

A distribuição dos transcritos diferencialmente expressos da CBAmC em resposta ao cultivo por duas horas com o fluido do apoplasto nas diferentes classes do COG está apresentada na figura 16. Muitos dos transcritos que tiveram os níveis de expressão regulados não são classificados ou pertencem à categoria "função desconhecida, [S]". Para os transcritos que foram superexpressos, as categorias que se destacaram foram "modificação pós-tradução, reciclagem de proteínas e chaperonas [O]"; "transcrição [K]"; "supostas funções gerais [R]" e "produção e conversão de energia [C]". Para os transcritos subexpressos, as categorias que se destacaram foram "biogênese da parede/ membrana/ envelope celular [M]"; "mecanismo de transdução de sinais [T]"; "metabolismo e transporte de íons inorgânicos [Q]", "metabolismo e transporte de aminoácidos [F]", "transporte e metabolismo de nucleotídeos [G]", entre outras.

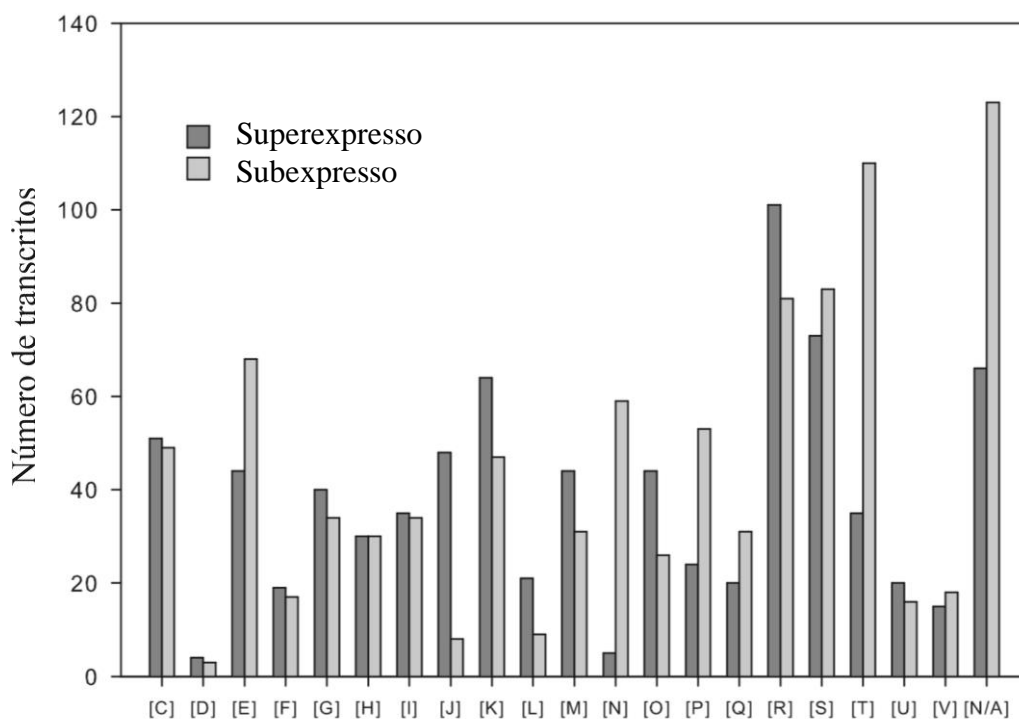


Figura 16. Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos de acordo com a categorização do COG. Legenda: [C], produção e conversão de energia; [D], controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossômica; [E], transporte e metabolismo de aminoácidos; [F], transporte e metabolismo de nucleotídeos; [G], transporte e metabolismo de carboidratos; [H], transporte e metabolismo de coenzimas; [I], transporte e metabolismo de lipídios; [J], tradução, estrutura ribossômica e biogênese; [K], transcrição; [L], replicação, recombinação e reparo de DNA; [M], biogênese da parede / membrana / envelope celular; [N], motilidade celular; [O], modificação pós-tradução, reciclagem de proteínas e chaperonas; [P], transporte e metabolismo de íons inorgânicos; [Q], biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; [R], supostas funções gerais; [S], função desconhecida; [T], mecanismos de transdução de sinais; [U], tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular; [V] mecanismos de defesa; [N / A], não classificado.

4.7 Análise Proteômica

A análise proteômica teve o objetivo de identificar as proteínas de *N. amazonense* estirpe CBAmC diferencialmente acumuladas em resposta ao cultivo de duas horas com o fluido de cana-de-açúcar RB867515.

O banco de dados de proteínas estirpe CBAmC depositado no banco de dados NCBI foi utilizado como referência. Após o mapeamento, 1153 proteínas foram identificadas com uma média de 11 peptídeos por proteína e foram consideradas válidas somente quando encontradas em todas as repetições. Dentre essas proteínas, 462 foram validadas estatisticamente com valor de $p \leq 0,05$. Dentre essas, 72 proteínas tiveram seus níveis de expressão reduzidos e 82 proteínas tiveram seus níveis de expressão aumentados.

A matriz apresentada na Figura 17 mostra uma correlação (R^2) de todas as amostras de PDE com valor de $p < 0,05$. As repetições biológicas mostraram um nível muito alto de correlação. As amostras do controle (1A, 1B e 1C) e as do tratamento experimental (2A, 2B e 2C) apresentaram média de $R^2 > 0,998$ e $R^2 > 0,998$, respectivamente, assim todas as bibliotecas de cada condição foram usadas para as análises posteriores.

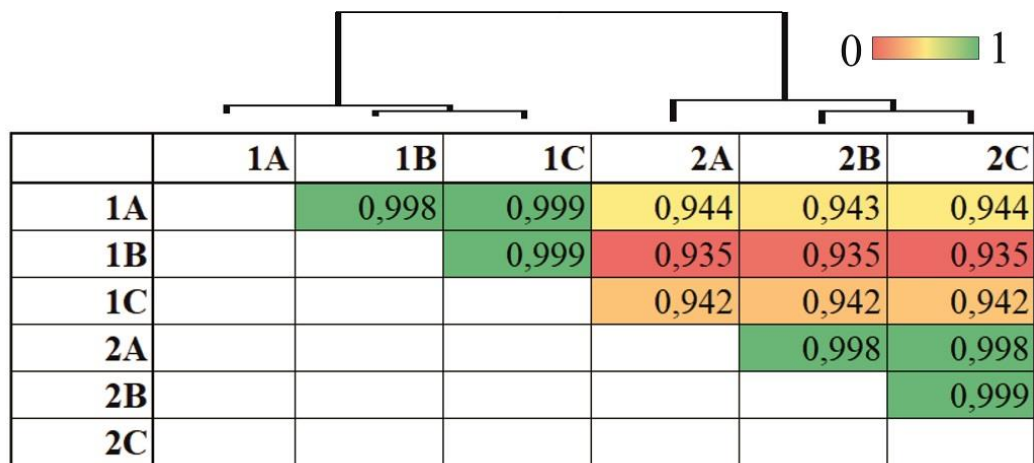


Figura 17. Matriz de correlação entre as réplicas biológicas e dendrograma de acordo com a identificação das proteínas diferencialmente expressas com valor $p < 0,05$. LGI-C: 1A, 1B, 1C. LGI-A: 2A, 2B, 2C.

As proteínas com abundâncias diferenciais estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) e com alterações nos níveis de expressão (fold-change) $< -1,5$ ou $> 1,5$ foram consideradas diferencialmente expressas. Em resumo, descobriu-se que um total de 154 proteínas foi significativamente alterado em *N. amazonense* CBAmC entre LGI-C e LGI-A (Figura 18).

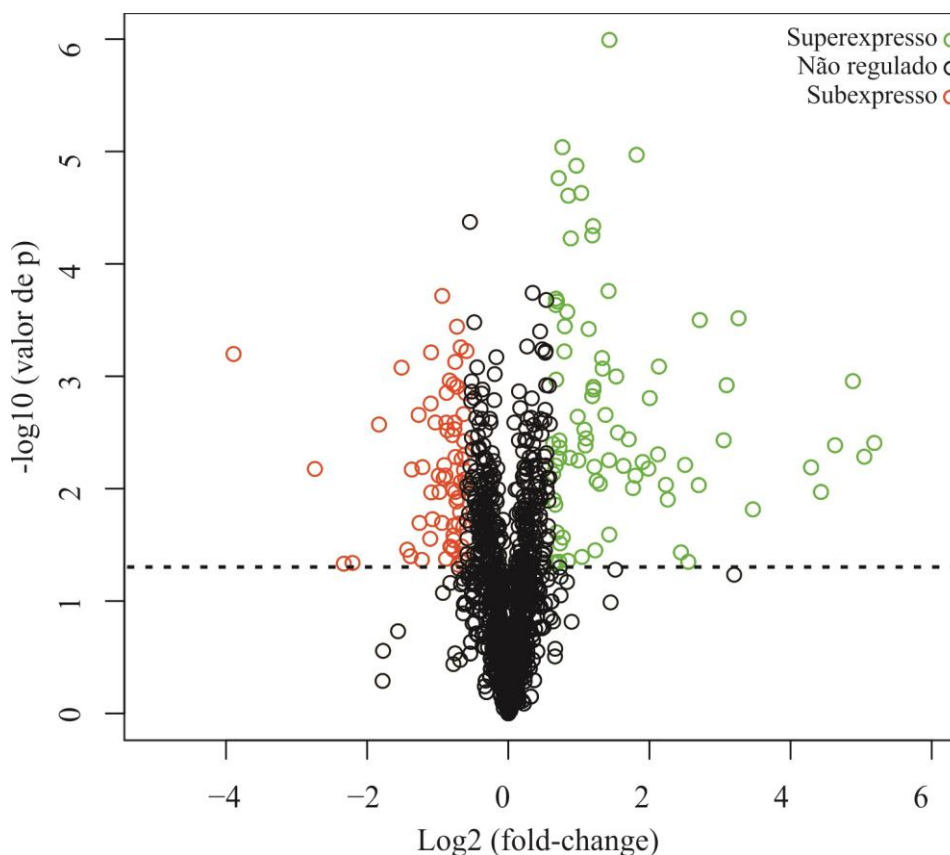


Figura 18. Gráfico do tipo Volcano Plot de proteínas diferencialmente expressas em células de *N. amazonense* estirpe CBAmC. O eixo horizontal representa as variações nos níveis de expressão (fold-change) entre os tratamentos em escala logarítmica na base 2, enquanto o eixo vertical representa os respectivos valores p ajustados em escala logarítmica negativa na base 10. Os pontos acima da linha tracejada indicam valores de

$p < 0,05$. Os pontos vermelhos indicam as proteínas subexpressas (mudança nos níveis de expressão $< -1,5$ vezes), os pontos verdes indicam as proteínas superexpressas (mudança nos níveis de expressão $> 1,5$ vezes) e os pontos pretos indicam que não houve mudança estatisticamente significativa nos níveis de expressão.

A distribuição das proteínas codificadas pelos genes que foram diferencialmente expressos em resposta ao cultivo por duas horas com o fluido do apoplasto nas diferentes classes do COG está apresentada na figura 19. Muitas das proteínas que tiveram os níveis de expressão regulados não são classificadas ou pertencem à categoria "função desconhecida, [S]". Para as proteínas que foram superexpressas, as categorias que se destacaram foram "modificação pós-tradução, reciclagem de proteínas e chaperonas [O]"; "transcrição [K]"; "supostas funções gerais [R]" e "produção e conversão de energia [C]". Para as proteínas subexpressas, as categorias que se destacaram foram "biogênese da parede/ membrana/ envelope celular [M]"; "mecanismo de transdução de sinais [T]"; "metabolismo e transporte de íons inorgânicos [Q]", "metabolismo e transporte de aminoácidos [F]", "transporte e metabolismo de nucleotídeos [G]", entre outras.

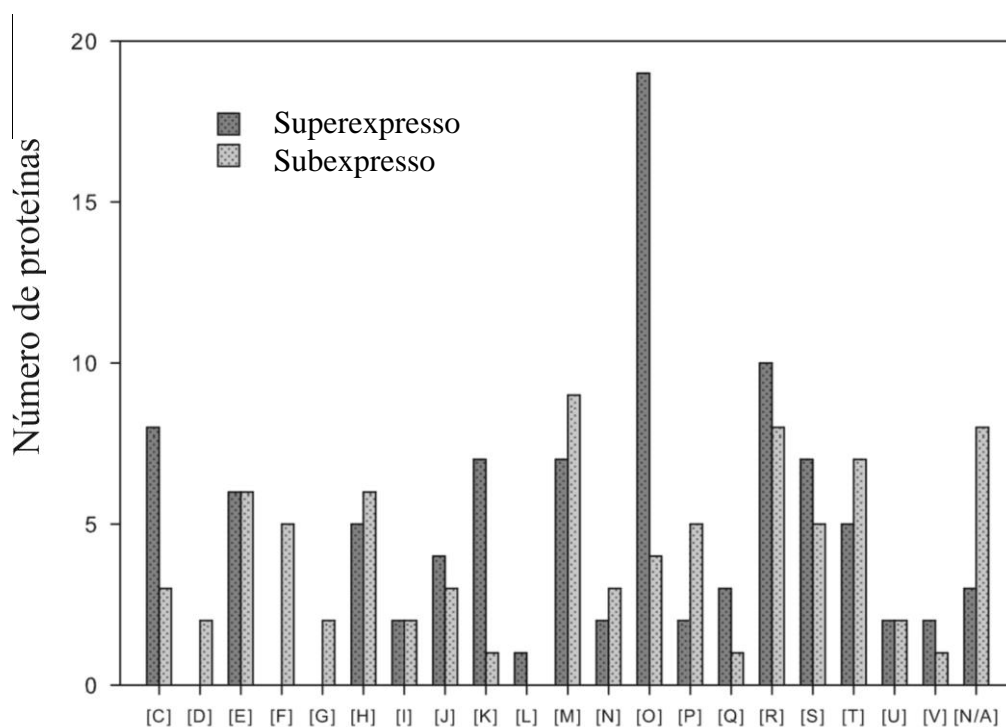


Figura 19. Distribuição das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a categorização do COG. Legenda:[C], produção e conversão de energia; [D], controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossômica; [E], transporte e metabolismo de aminoácidos; [F], transporte e metabolismo de nucleotídeos; [G], transporte e metabolismo de carboidratos; [H], transporte e metabolismo de coenzimas; [I], transporte e metabolismo de lipídios; [J], tradução, estrutura ribossômica e biogênese; [K], transcrição; [L], replicação, recombinação e reparo de DNA; [M], biogênese da parede / membrana / envelope celular; [N], motilidade celular; [O], modificação pós-tradução, reciclagem de proteínas e chaperonas; [P], transporte e metabolismo de íons inorgânicos; [Q], biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; [R], supostas funções gerais; [S], função desconhecida; [T], mecanismos de transdução de sinais; [U], tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular; [V] mecanismos de defesa; [N / A], não classificado.

4.8 Comparação entre os Resultados de Transcriptômica e Proteômica

Para identificar os genes e as proteínas da bactéria *N. amazonense* estirpe CBAmC envolvidos na interação com o fluido do apoplasto da cana-de-açúcar variedade RB867515, realizou-se uma comparação entre os transcritos e as proteínas diferencialmente expressos identificados por ambas as análises transcriptômica e proteômica.

A análise comparativa identificou 80 (53 + 27) genes que apresentaram resultados concordantes quanto ao perfil de expressão de acordo com os resultados das abordagens transcriptômica e proteômica, enquanto que 8 (4 + 4) genes apresentaram resultados discordantes (Figura 20A). A correlação de Pearson foi usada para avaliar a expressão no transcriptômica e proteômica. Os transcritos e proteínas identificados em ambas as análises representados nas interseções da figura 20A apresentaram alta correlação (Figura 20B).

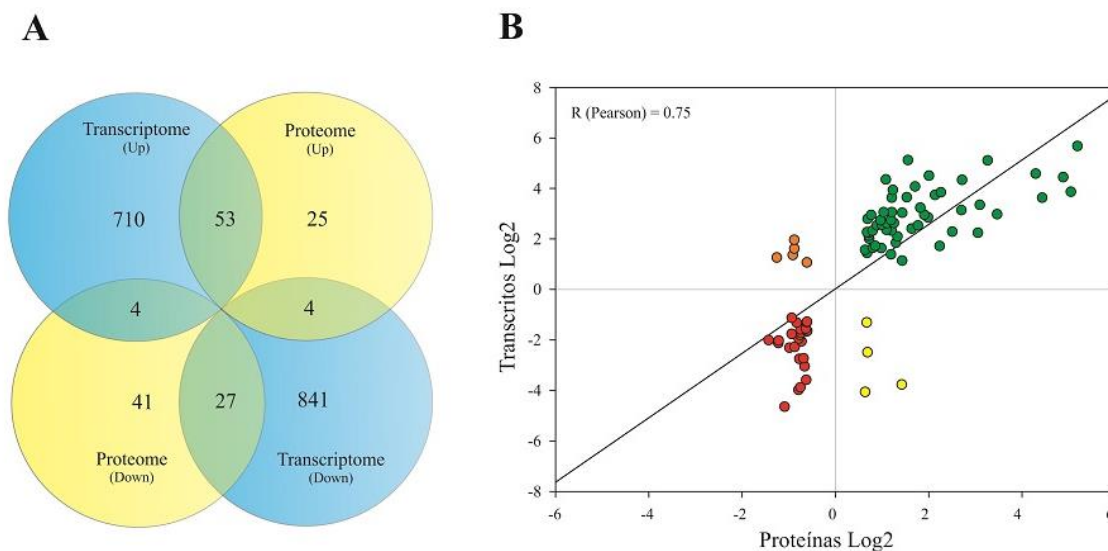


Figura 20. Comparação entre os resultados das análises transcriptômica e proteômica diferencial de *Nitrospirillum amazonense* cultivada no fluido de apoplasto de cana-de-açúcar. A) Diagrama de Venn para o número de proteínas superexpressas (> 1,5 vezes); proteínas subexpressas (< -1,5 vezes); transcritos superexpressos (> 2,0 vezes); transcritos subexpressos (< -2,0 vezes). (B) Parcelas de dispersão de 88 “transcritos e proteínas” referentes as interseções do diagrama de Venn, com 80 “transcritos e proteínas” que apresentam padrões coincidentes de expressão (ambos super- ou subexpressos) e 8 “transcritos e proteínas” com padrões opostos de expressão. Círculos verdes: transcritos e proteínas superexpressos; círculos vermelhos: transcritos e proteínas subexpressos; círculos laranjas: transcritos superexpressos e proteínas subexpressas; círculos amarelos: transcritos subexpressos e proteínas superexpressas.

4.9 Ontologia dos Genes Diferencialmente Expressos

A relação de transcritos e proteínas, de acordo com as análises de ontologia gênica, que foram diferencialmente expressos em resposta ao cultivo por duas horas com o fluido do apoplasto é mostrada na figura 21. A análise comparativa demonstrou que a maioria das proteínas diferencialmente expressas pertence às categorias de processo metabólico e processo celular.

A análise de agrupamento de genes ortólogos é mostrada entre parênteses. A categoria “modificação pós-tradução, reciclagem proteica e chaperonas” foi o grupo mais representado dentre os transcritos e proteínas que foram superexpressos. Dentre os transcritos e proteínas subexpressos, a categoria “mecanismo e transdução de sinais” foi a mais representada durante

o cultivo de duas horas com o fluido de apoplasto da cana-de-açúcar. Os agrupamentos (Y958_RS03525; Y958_RS03535; Y958_RS03540) estrela laranja e (Y958_RS27945; Y958_RS27950; Y958_RS27955) estrela preta foram identificados em ambas as análises (Figura 21).

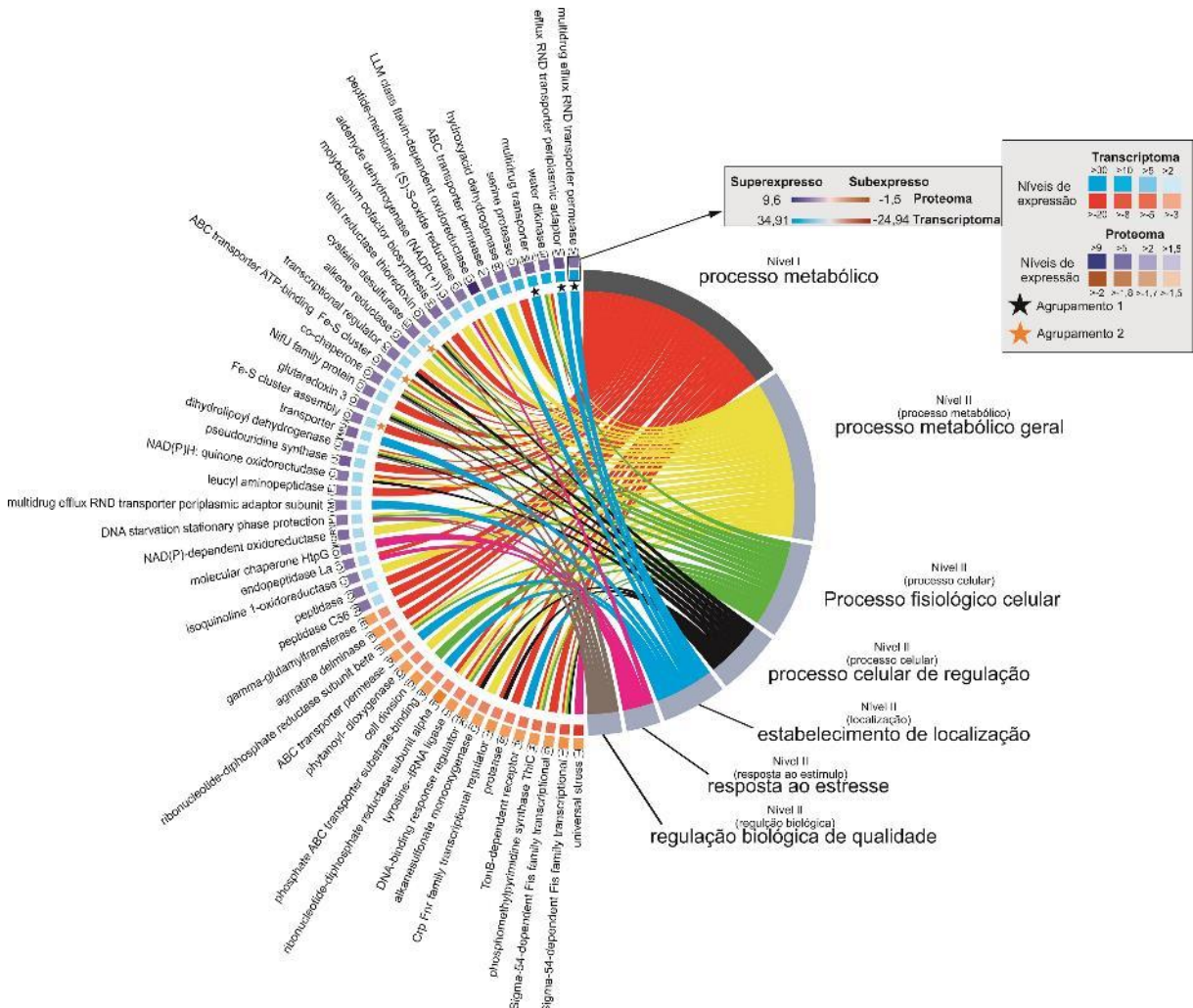


Figura 21. Diagrama de cordas mostrando transcritos e proteínas que foram diferencialmente expressos de acordo com os resultados das análises transcriptômica e proteômica da *N. amazonense* cultivada no líquido do apoplasto. Os retângulos à esquerda indicam se um gene ou proteína foi diferencialmente expresso. As conexões (cordas) esquerda-direita indicam associações de genes com os termos de ontologia gênica pelo Blast2Go. As estrelas são representadas pela formação de agrupamentos. As letras entre parênteses são fornecidas pela análise de ontologia gênica pelo servidor WebMGA.

4.10 Ensaio de Motilidade Bacteriana

A subexpressão dos transcritos envolvidos na quimiotaxia e formação de flagelos observada na análise transcriptômica indicou que a presença do fluido de apoplasto da cana pode reduzir a motilidade de *N. amazonense*. Para avaliar esta condição de forma fisiológica, a CBAmC foi cultivada em meio semi-sólido na presença e ausência do fluido de apoplasto para avaliar a sua motilidade.

A CBAmC foi inoculada em meio semi-sólido LGI e LGI contendo fluido de apoplasto (Figura 22). Após 24 horas, observou-se uma colônia de crescimento concêntrico que se afastou do ponto de inoculação, indicativo de células competentes em motilidade (Figura 22A). Quando as células foram inoculadas em meio semi-sólido LGI contendo fluido de apoplasto, formou-se uma colônia compacta, indicando ausência de motilidade (Figura 22B). A concentração proteica para o meio semi-sólido LGI na ausência e presença do fluido de apoplasto foi de $1,8 \mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$ e $1,2 \mu\text{g. } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente, indicando que ocorreu crescimento bacteriano comparável em ambos tratamentos.

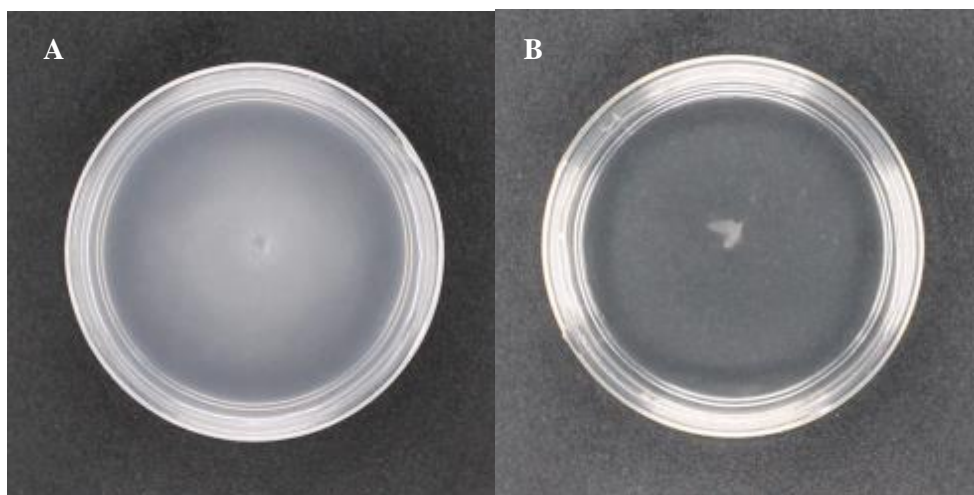


Figura 22. Motilidade de *N. amazonense* CBAmC em semi-sólido LGI na ausência (A) ou presença (B) de fluido de apoplasto incubado em temperatura de 30°C durante 24 horas.

Na análise transcriptômica foram identificados 767 transcritos superexpressos e 872 transcritos subexpressos na presença do fluido de apoplasto. Os produtos dos genes estão distribuídos nas diferentes classes de acordo com os agrupamentos de grupos ortólogos. Nesta análise foi dado enfoque principalmente para as classes possivelmente relacionadas com a interação bactéria-planta: “mecanismo de transdução de sinais”, “motilidade celular”, “tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular”, “modificação pós-tradução, reciclagem proteica e chaperonas”, “metabolismo e transporte de íons inorgânicos” entre outros.

A análise dos resultados na categoria mecanismos de transdução de sinais mostrou que a *Nitrospirillum amazonense* estirpe CBAmC cultivada na presença do fluido do apoplasto de cana-de-açúcar ocorreu a superexpressão de 35 genes (Anexo A). Entre os genes subexpressos na condição da CBAmC cultivada no fluido do apoplasto, foram identificados 113 genes.

Dentre os genes superexpressos, foram identificados três genes que codificam para proteína de choque por fago (PSP, do inglês, *phage-shock-protein*) (*Y958_RS01375*; *Y958_RS10565*; *Y958_RS10570*). A PSP funciona para auxiliar na homeostase da membrana citoplasmática em condições de estresse que poderiam aumentar sua permeabilidade, como virulência, osmolaridade, exposição a calor e temperatura (FLORES-KIM e DARWIN, 2016).

O gene *lexA* (*Y958_RS08010*) é expresso quando a bactéria está submetida à situação de estresse pela ação de antibióticos, bacteriófagos e luz ultravioleta. Esta proteína impede a expressão de proteínas de reparo de DNA em bactérias, aumentando a sua taxa evolutiva e resistência a antibióticos (ERILL et al., 2007; BUTALA et al., 2009). O gene *envZ* (*Y958_RS03225*) codifica para uma histidina quinase e foi superexpresso. Este gene constitui o sistema de transdução de sinal bacteriano de dois componentes conhecidos por mediar a resposta ao estresse osmótico em uma série de bactérias Gram-negativas (YUAN et al., 2011). A indução desses genes na CBAmC sugere uma proteção inicial durante o cultivo na presença

do fluido do apoplasto de cana provavelmente devido ao estresse osmótico. A análise bioquímica de fluido de apoplasto realizado neste estudo (Tabela 1) identificou diversos solutos que possivelmente estariam aumentando a concentração do meio e ocasionando o estresse osmótico.

O gene *dctA* codifica o componente estrutural necessário para o transporte de dicarboxilato de C4, enquanto *dctB* e *dctC* codificam proteínas reguladoras (RONSON et al., 1984). Os resultados da análise transcriptômica de CBAmC na presença do fluido de apoplasto mostraram que os transcritos para o transporte de dicarboxilato de C4 *dctA* (Y958_RS12165), *dctB* (Y958_RS25255) e *dctD* (Y958_RS25260) foram subexpressos (Anexo A). O transcriptoma da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* cultivada em meio 3G10R, meio de cultivo que mimetiza as condições do xilema, revelou a subexpressão do gene *dctA*. (CIRAULO et al., 2010).

O gene Y958_RS08785, o qual codifica para um regulador de resposta OmpR foi superexpresso. OmpR é um regulador transcricional implicado no controle de vários processos e funções celulares em Enterobacteriaceae. Esta proteína demonstrou regular positivamente a expressão de bombas de efluxo AcrAB-TolC envolvidas na adaptação de *Yersinia enterocolitica* em diferentes estresses químicos (RACZKOWSKA et al., 2015). A proteína TolC de *Sinorhizobium meliloti* já foi demonstrada como necessária para estabelecer simbiose biológica de fixação de nitrogênio bem sucedida com *Medicago sativa* (COSME et al., 2008).

O agrupamento gênico, que codifica para histidina quinase (Y958_RS20075) e para um regulador de resposta (Y958_RS20080) foi altamente superexpresso. Este agrupamento gênico está a jusante do gene *degP* e talvez esteja envolvido em sua regulação transcricional. A proteína DegP está envolvida na síntese do envelope celular e foi superexpressa de acordo com os resultados das análises transcriptômica e proteômica (para detalhes, ver seção “envelope celular, reciclagem proteica e chaperonas”). A análise transcriptômica de *S. meliloti* 1021 após mudança de pH por uma hora induziu a regulação desses genes (HELLWEG et al., 2009).

Isso parece indicar que o estresse externo imposto a *N. amazonense* durante o cultivo com o fluido de apoplasto desencadeia uma resposta bem definida. A mudança de pH após o tratamento com o fluido de apoplasto poderia ter ocasionado perturbações no envelope celular, assim as células parecem ativar esta via de resposta a nova condição ambiental.

Membros da superfamília CRP/FNR estão intrinsecamente envolvidos no sistema que percebe as mudanças ambientais, ativando a expressão de genes alvos para permitir que o organismo se adapte a essas mudanças. Os reguladores Crp-Fnr destacam-se no estresse oxidativo, fixação de nitrogênio ou temperatura (KÖRNER et al., 2003; MATSUI et al., 2013). Os genes Y958_RS01065 e Y958_RS01790 pertencentes desse grupo foram subexpressos.

Nas proteobactérias diazotróficas, o sistema regulatório NtrB-NtrC comumente controla a expressão da proteína regulatória NifA em resposta a disponibilidade de nitrogênio (DIXON & KAHN, 2004). A ativação da transcrição de genes *nif* dependentes de sigma requer a presença da proteína NifA, uma EBP (*enhancer binding protein*) que regula os genes necessários para a síntese da nitrogenase (MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004a). O gene que codifica para a proteína NifA apresentou regulação negativa possivelmente pela presença de nitrogênio no fluido de apoplasto (Tabela 1).

A quimiotaxia é a motilidade pela qual microrganismos detectem os sinais ambientais e mudam de direção para fatores que favorecem a sua sobrevivência ou afastam-se em condições químicas tóxicas (SALAH –DIN e ROUJEINIKOVA, 2017). Os microrganismos processam grande parte dos estímulos quimiotáticos através de quimiorreceptores específicos, conhecidos como MCP's (proteína de quimiotaxia metil-receptora) e os transmitem para os

sistemas de transdução de sinal de dois componentes (SALAH –DIN e ROUJEINIKOVA, 2017).

Os sistemas de dois componentes combinam o reconhecimento de sinal, a transdução de sinal e a ativação de genes em um sistema de duas proteínas. Esses sistemas de dois componentes consistem em um sensor de histidina quinase e um regulador de resposta. No processo de quimiotaxia bacteriana a histidina quinase CheAW é autofosforilada ao perceber o sinal ambiental, transferindo assim um grupo fosforil para um aspartato conservado no regulador de resposta CheY.

Os genes envolvidos no processo de quimiotaxia bacteriana foram fortemente subexpressos na estirpe CBAmC cultivada no líquido do apoplasto da cana-de-açúcar (Figura 23). O agrupamento gênico *Y958_RS23810*, *Y958_RS23820* (que codifica para proteína de quimiotaxia metil-receptora), *Y958_RS23845* (um fator anti-anti sigma), e *cheRWAY* apresentou forte regulação negativa. Além dele, o agrupamento *cheAWYBR*, *cheZ*, *cheB* e 27 genes MCP's foram subexpressos.

Ao cultivar a *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 na presença de naringenina, a grande maioria dos genes responsáveis pela quimiotaxia e movimento flagelar foram subexpressos (TADRA-SFEIR, 2011). Análise transcriptômica da bactéria *Burkholderia* Q208 inoculadas em raízes da cana-de-açúcar mostraram que todos os genes identificados na quimiotaxia e motilidade celular foram subexpressos (PAUNGFOO-LONHIENNE, 2016). De forma semelhante à análise transcriptômica desse trabalho, um grupo de genes da categoria motilidade celular (*cheA*, *cheB*, *cheC*, *cheD*, *cheW*, *cheZ* e *cheR*) foi subexpresso quando as bactérias diazotróficas *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8 e *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 foram cultivadas na presença do fluido do apoplasto, sugerindo a redução de sua motilidade (SILVA, 2016; POLESE, 2017).

O flagelo é composto por três estruturas principais: o corpo basal, um filamento longo e o gancho que os conecta. O corpo basal está incorporado no envoltório da célula, abriga o aparato de secreção que exporta os componentes mais distais do flagelo e fornece força para a rotação flagelar. O gancho é uma junta universal flexível conectada ao corpo basal que altera o ângulo de rotação para o filamento helicoidal longo que atua como uma hélice (CHEVANCE & HUGLES et al., 2008).

Genes envolvidos na formação do corpo basal *flgC*, *fliE*, *flgH*, *fliM*, *fliN*, aparato de secreção *fliL*, do estator *motA* e *motB*, gancho *flgD* e filamento *flgK* apresentaram regulação negativa. Curiosamente um gene que codifica para *motB* apresentou regulação positiva (Figura 23). Além disso, a análise transcriptômica identificou a subexpressão do gene flagelina (*Y958_RS19300*), a principal proteína globular para a formação do flagelo, sugerindo ausência do filamento flagelar.

A análise transcriptômica identificou dois genes reguladores envolvidos na biogênese flagelar que foram subexpressos (Anexo A). O agrupamento gênico contendo *flhF*, que codifica uma GTPase do tipo SRP-GTPase envolvida na regulação da secreção de proteínas e o gene *flhG*, uma ATPase tipo MinD que interage, durante a montagem do anel C, com as proteínas flagelares FliM, FliN e FliG.

O gene *fliS* que codifica para uma chaperona específica de flagelinas apresentou superexpressão. Em contraste, Tadra-Sfeir (2011) e Paungfoo-Lonhienne et al. (2016), em seus experimentos de transcriptoma envolvendo duas bactérias fixadoras de nitrogênio, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 e *Burkholderia* Q208, tiveram o transcrito para o gene *fliS* subexpresso.

A análise transcriptômica de *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8 cultivada na presença do fluido de apoplasto mostrou que um grupo de genes envolvidos na montagem flagelar (*fliD*, *fliC*, *flgL*, *flgE*, *flgF*, *fliG*, *fliM*, *fliP*, *motA*, *motB* e *fliS*) foi subexpresso (SILVA, 2016). Ao cultivar a *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 na presença de

naringenina, a grande maioria dos genes responsáveis pela quimiotaxia e movimento flagelar foram subexpressos (TADRA-SFEIR, 2011). Uma análise transcriptômica de *Burkholderia* Q208 inoculadas com raízes da cana-de-açúcar mostrou que todos os genes identificados na quimiotaxia e motilidade celular foram subexpressos (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2016). De forma similar, genes que codificam para flagelos na *H. seropedicae* SmR1 foram subexpressos durante a colonização de plântulas de milho.

A sacarose, carboidratos totais e açúcares quantificados na análise bioquímica do apoplasto representam importantes fontes de carbono para o crescimento da CBAmC (Tabela 1). O cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes fontes de carbono pode determinar a formação de biofilme e a motilidade (SHROUT et al., 2006). O ensaio com o meio semi-sólido LGI e LGI mais o fluido de apoplasto mostrou ausência de motilidade da CBAmC. Assim como nos trabalhos de Tadra-Sfeir (2011), Silva (2016) e Paungfoo-Lonhienne et al., (2016), a subexpressão da grande maioria de transcritos relacionados à quimiotaxia e flagelos de CBAmC sugere a transição do estilo de vida móvel para o estilo de vida sésil, possivelmente implicando na formação de biofilme.

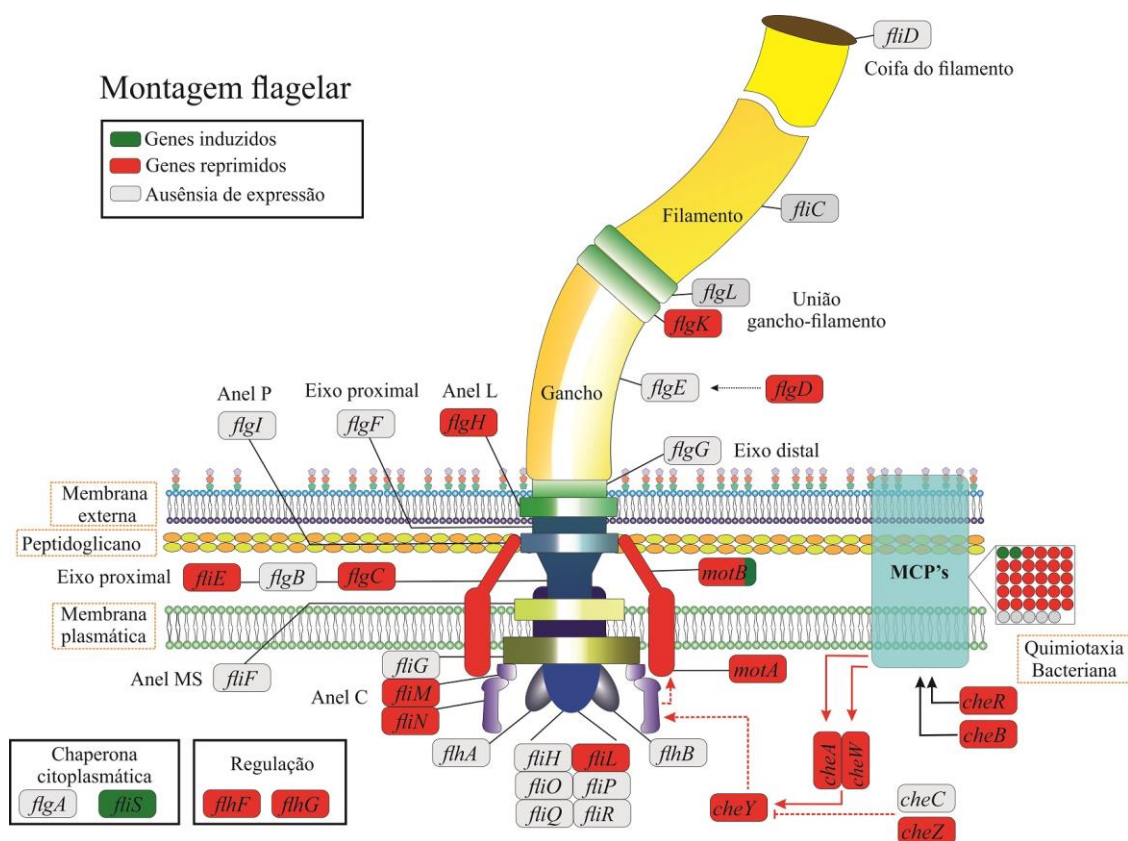


Figura 23. Análise transcriptoma de genes envolvidos na montagem flagelar e na via de sinalização de quimiotaxia de *N. amazonense* CBAmC cultivada durante duas horas no fluido do apoplasto.

As funções biológicas das proteínas são regidas pela sua conformação nativa. O enovelamento proteico e a estabilidade do proteoma são assistidos por um conjunto de chaperonas moleculares que desempenham papel fundamental na integração de respostas celulares e organizacionais às flutuações das condições ambientais (KUMSTA & JAKOB, 2009; SAIBIL, 2013).

As proteínas das famílias HSP100, HSP90, HSP70, HSP33 e HSP24 apresentaram superexpressão (Anexo A). A proteína da família HSP60, também conhecida como chaperona

GroEL, envolvida no enovelamento e prevenção da agregação proteica, apresentou regulação negativa (codificada por *Y9848_RS26820*). A família de chaperonas HSP20 promove a desagregação de proteínas agregadas causadas por estresse (RATAJCZA et al., 2009). A expressão dos genes HSP20 (*Y958_RS26755*) e HSP20 (*Y958_RS30530*) foram subexpressas.

Os genes (*Y958_RS14150*; *Y958_RS06380*) que codificam para PapD estão envolvidos na biogênese de pilus como proteína transportadora periplasmática (SAUER et al., 2000).

Outros grupos de chaperonas como a proteína Degp e dissulfeto isomerase foram superexpressos. A proteína bifuncional Degp com atividade de protease e chaperona na região periplasmática foi superexpressa. O grupo de proteínas da dissulfeto isomerase responsáveis pela estabilidade proteica pelas ligações dissulfeto foram superexpressas (Anexo A).

O gene *depG* (*Y958_RS20070*) codifica uma serina protease periplasmática que degrada proteínas mal dobradas no periplasma, proteínas danificadas por oxidação e proteínas agregadas (KROJER et al., 2002). Esta proteína está envolvida na biogênese das proteínas de membrana externa: OmpA, OmpC, OmpF e LamB (KROJER et al., 2008).

Os genes *grxC* (*Y958_RS12230*) e *grxD* (*Y958_RS06555*) são glutaredoxinas que funcionam como disulfeto redutase e auxílio na formação de aglomerado (Fe-S), respectivamente (ASLUND et al., 1994; YEUNG et al., 2011).

Muitas proteínas sintetizadas no citossol são direcionadas para a membrana plasmática ou secretadas da célula para o meio ambiente ou para células receptoras. O sistema de secreção geral (Sec) e a via de translocação por arginina (Tat) são os sistemas de secreção bacterianos mais utilizados para o transporte de proteínas através da membrana citoplasmática (NATALE et al., 2008).

Entre os transcritos superexpressos na presença do fluido do apoplasto, foram identificados pertencentes à via Sec superexpressos: o gene *secA*, que codifica para uma pré-proteína translocase, os genes *ffh* e *ftsY*, que codificam para uma partícula de reconhecimento de sinal, os genes *secADEF* e *yajC* que codificam para pré-proteína translocase e *yidC*, uma proteína de membrana.

A via Sec transporta as proteínas desdobradas através da membrana citoplasmática, liberando-as no periplasma ou agregando-as à membrana. Este sistema consiste em três partes: um componente de direcionamento de proteínas, uma proteína motora e um canal de condução integrado de membrana, chamado SecYEG translocase (PAPANIKOU et al., 2007). O gene que codifica para uma chaperona e tem a função de direcionamento, *secB* não foi diferencialmente expresso. A proteína SecA auxilia a entrada de proteínas para o canal SecDEFGY e também serve como a ATPase que fornece a energia para translocação de proteínas. Após o transporte pelo canal, as proteínas são enoveladas no periplasma. A via Sec também utiliza um mecanismo de exportação co-tradução, ou seja, tão logo as proteínas sintetizadas são reconhecidas e levadas para secretar proteínas destinadas à membrana plasmática. A proteína Ffh contém uma sequência sinal reconhecida pela partícula SRP. Durante a tradução, SRP liga-se as proteínas alvo à medida que emergem do ribossomo e recruta a proteína de ancoragem FtsY que por sua vez entrega a proteína para o canal SecDEFGY (PAPANIKOU et al., 2007).

Em contraste com a via Sec, a via Tat (do inglês, *twin arginine translocation*) é usada por muitas bactérias para secretar proteínas dobradas através da membrana citoplasmática (ROBINSON & BOLHUIS, 2004). Em bactérias gram-negativas, TalB e TalC funcionam no reconhecimento de proteínas específicas e recrutam TatA, que forma um canal através da membrana (BRAUNSTEIN et al., 2003). Na análise do transcriptômica foi possível identificar o agrupamento tatABC superexpresso e um gene para tatA subexpresso (Anexo A).

Em bactérias gram-negativas, atualmente são conhecidas seis classes gerais de sistemas de secreção (Tipos I - VI), que realizam a translocação de proteínas através das

membranas citoplasmática e externa (TSENG et al., 2009). Os sistemas de secreção tipos II e V são classificados como Sec-dependentes, já os tipos I e III como Sec-independentes ou ainda conter vias Sec-dependente e Sec-independente com o sistema de secreção tipo IV (TSENG et al., 2009).

Os genes da *N. amazonense* que codificam o sistema de secreção tipo II (Sec-dependente) foram subexpressos na presença do líquido do apoplasto (Figura 24). Este sistema encontra-se na membrana externa, interna e no periplasma. As proteínas serem exportadas através deste aparato, primeiro devem chegar ao periplasma através das vias Tat ou Sec. A via Tat trabalha em conjunto com o sistema tipo II para exportar as proteínas. A bactéria *P. tropica* estirpe Ppe8 apresentou subexpressão do gene *gspM* envolvido no sistema de secreção tipo II na presença do fluido de apoplasto (SILVA, 2016).

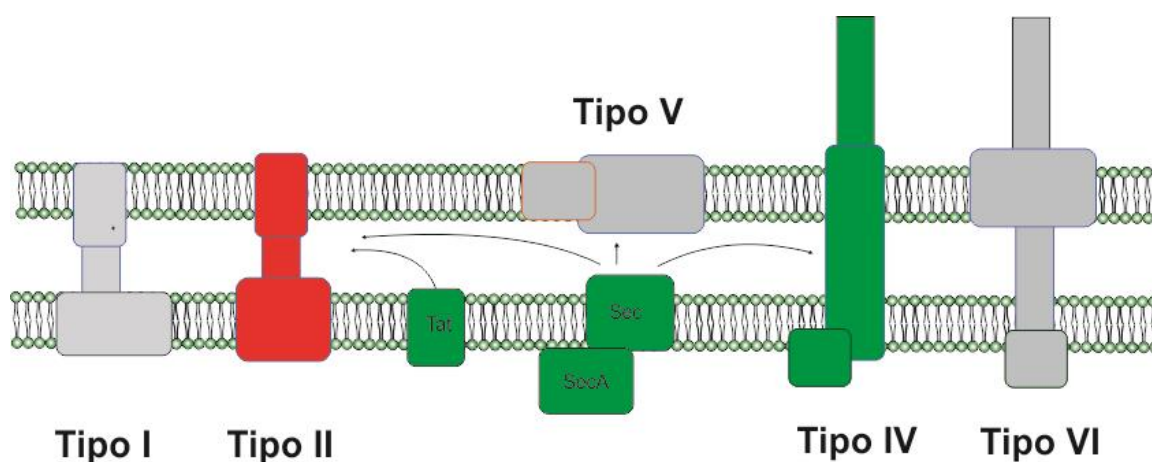


Figura 24. Desenho esquemático de proteínas constituintes dos sistemas de secreção em *Nitrospirillum amazonense*. Os genes que estão em caixa verde, vermelha e cinza indicam que foram superexpressos, subexpressos e não validados estatisticamente, respectivamente.

Estudos transcriptômicos da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* estirpe SmR1 cultivada na presença de naringenina mostraram a superexpressão do gene *secY* (TADRA-SFEIR, 2011). Em outra bactéria diazotrófica, *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8, ocorreu a superexpressão dos genes que codificam para o sistema Sec (*secD/F*, *secE*, *secG*, *secY*, *secA* e *YajC*), quando a bactéria foi cultivada na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio JMV diluído (SILVA, 2016). Por sua vez, a bactéria *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 apresentou subexpressão nos genes *secY*, *secE* quando cultivada na presença do fluido de apoplasto (POLESE, 2017).

Considerando que a maioria das proteínas segregadas pela via Tat em bactérias Gram-negativas pode permanecer no periplasma ou é transportada para fora da célula pelo sistema de secreção do tipo II, nossos dados mostram que a maioria dos genes envolvidos nas vias Tat e Sec foram superexpressos (Figura 24). Já o sistema de secreção tipo II, dependente da via Tat e Sec foi subexpresso, sugerindo a necessidade de outros sistemas de secreção proteica e de grupos de proteínas com função específica nas membranas citoplasmática e externa, além da região do periplasma, para que haja a adaptação da *N. amazonense* em contato com o fluido do apoplasto.

O sistema de secreção de tipo IV (T4SS) é o único com capacidade de transportar ácidos nucleicos e proteínas para dentro de células vegetais e animais, bem como em leveduras e outras bactérias (CHRISTIE et al., 2005). Foram identificados dois genes superexpressos, *trbB* (Y958_RS04880) e *trbL* (Y958_RS20885). A proteína periplasmática

TrbB possui atividade dissulfureto isomerase e depende de uma chaperona DsbD superexpressa na análise transcriptômica. A proteína TrbL pode funcionar no processo conjugativo, facilitando o enovelamento adequado de proteínas codificadas pelo plasmídeo F (HEMMIS et al., 2011).

A conjugação bacteriana é um processo pelo qual o DNA é transferido de forma unidirecional do doador para a bactéria receptora (de la CRUZ et al., 2010; FROST et al., 1994). A transferência de plasmídeos por conjugação pode acelerar a evolução das bactérias (COOPER, 2007), além de facilitar vários processos patogênicos e conferir resistência aos antibióticos (COHEN et al., 1972; CHRISTIE e VOGEL, 2000).

A *N. amazonense* durante o cultivo com o fluido de apoplasto apresentou níveis de expressão positiva para a via Sec enquanto a via de secreção tipo II apresentou níveis de expressão negativa. O sistema de secreção do tipo II exporta proteínas para o meio extracelular, enquanto que a Via Sec move proteínas do citoplasma para a região do periplasma, possivelmente ocorrendo uma intensa atividade na região do periplasma.

No total, 44 genes desta classe foram superexpressos e 31 foram subexpressos no cultivo da *N. amazonense* no líquido do apoplasto na categoria parede celular, membrana e biogênese do envelope. Os maiores representantes desse grupo foram genes envolvidos na biossíntese de peptidoglicano, transportadores do tipo RND e no metabolismo de lipopolissacarídeos.

O peptidoglicano (mureína) forma a parede celular bacteriana que consiste em um heteropolímero de cadeias de glicano longas feitas de unidades alternadas de N-acetilmuramóil e N-acetilglucosamina (VOLLMER et al., 2008). A principal função é contribuir contra os efeitos deletérios da pressão osmótica interna, contribuir para a manutenção da estrutura da célula e auxiliar na ancoragem de outros componentes do invólucro celular, incluindo proteínas (DRAMSI et al., 2008) e polissacarídeos (NEUHAUS e BADDILEY, 2003).

O estágio inicial na formação do peptidoglicano envolve a formação dos precursores nucleotídeos solúveis de UDP- *N* acetilglucosamina a UDP-*N*- *N* -acetilmuramóil-pentapeptídeo (BARRETEAU et al., 2008). Os genes envolvidos na biossíntese de peptidoglicano *Y958_RS08080*, *Y958_RS14425*, *Y958_RS16675*, *Y958_RS20785* e *Y958_RS26605* e glicosil transferases, que adicionam açúcares a derivados de nucleotídeo difosfato, estão envolvidos nesta etapa inicial e foram superexpressos (Anexo A).

A condição pleomórfica é a capacidade da célula alterar sua morfologia de acordo com o período do ciclo de vida, ciclo reprodutivo ou pela influência de fatores ambientais. O gene *cmmA* (*Y958_RS00430*) envolvido na forma celular foi superexpresso. Outro gene que codifica para uma mureína transglicosylase (*Y958_RS08080*) que atua em diversas funções biológicas como síntese, remodelamento e degradação de parede celular e inserção de sistemas de secreção e montagem flagelar na parede celular foi superexpresso.

A análise transcriptômica mostrou que diversos genes que codificam para bombas de efluxo de múltiplas drogas foram superexpressos. Todos os agrupamentos identificados que codificam para bomba de resistência de nodulação e divisão celular (RND) AcrAB-OprM foram superexpressos. O operon (*Y958_RS27950*; *Y958_RS27955*; *Y958_RS27960*) foram notavelmente superexpresso de acordo com resultados de transcriptômica e proteômica (Anexo A). Outro agrupamento (*Y958_RS19190*; *Y958_RS19195*; *Y958_RS19200*) foi superexpresso de acordo com a análise transcricional.

Uma análise transcriptômica da *Pseudomonas aeruginosa*, um organismo ubíquo do solo e encontrado em muitos ambientes contaminados, cultivado sob estresse de pentaclorofenol, revelou que muitos transportadores de efluxo multidrogas foram superexpressos (MULLER et al., 2007). A bomba de efluxo mexAB-oprM desempenhou um

papel no efluxo de autoindutores na detecção do sensor de quórum da *P. aeruginosa* (PEARSON et al., 1999). Diversos mutantes de bombas de efluxo reduziram a formação de biofilme na *E. coli* K-12 (KVIST e HANCOCK, 2008; MATSUMURA et al., 2011).

A *N. amazonense* ao expressar transportadores RND sugere a capacidade de facilitar a adaptação e sobrevivência em seus nichos ecológicos e fisiológicos no apoplasto da cana-de-açúcar.

O genoma de *Nitrospirillum amazonense* foi sequenciado recentemente e foram identificados diversos genes que codificam para poli-3-hidroxi-butirato (PHB). Os grânulos armazenados de PHB são utilizados como fonte de energia e carbono em condições de estresse nutricional. Estes grânulos foram confirmados por microscopia eletrônica na *N. amazonense* CBAmC (SCHWAB et al., 2018).

Os três genes considerados essenciais na via biossintética do PHB são *phbA* (β -cetotiolase), *phbB* (acetoacetil coenzima A redutase-NADPH dependente) e *phbC* (PHB sintase). O PHB é sintetizado pela condensação de duas acetil-CoA tendo como produto acetoacetil-CoA catalisada pela PhbA, em seguida é reduzida de acetoacetil-CoA para (R)-3-hidroxi-butiril-CoA catalisada pela PhbB e finalmente é polimerizada pela PhbC em poli (3-hidroxi-butirato). A proteína PhbZ é uma depolimerase ligada à membrana do grânulo degrada a PHB a 3-hidroxi-butirato, produzindo dois acetil-CoA que pode ser usado no ciclo tricarbóxico. Os genes *phbB* e *phbC* foram subexpressos na presença do fluido do apoplasto enquanto que dois genes *phaZ* apresentaram regulação positiva.

O acúmulo de PHB ocorre quando as células vivem em um ambiente rico em fonte de carbono adequada e/ou quando o crescimento e a divisão celular são prejudicados devido a uma limitação por um nutriente diferente da fonte de carbono (REHM, 2010). A capacidade de sintetizar e armazenar PHB foram identificados na *H. seropedicae*, crescendo em meio NfbHPN, utilizando o malato como única fonte de carbono e expressando os genes *phbABC* (BALSANELLI et al., 2015). Durante a colonização de *H. seropedicae* na rizosfera de milho, a expressão desses genes foram subexpressas, o que de acordo com os autores, ocorreu devido ao meio ambiente pobre nutricionalmente (KADOWAKI et al., 2011). Além disso, a expressão do gene *phaZ2* que codifica para uma PHB depolimerase foi superexpressa, sugerindo que a bactéria estava mobilizando seu estoque de PHB para a sobrevivência (BALSANELLI, 2013).

Esses resultados sugerem que o fluido de apoplasto da cana-de-açúcar proporciona maior disponibilidade de nutrientes, o que é corroborado pelos resultados da análise química que foi realizada (Tabela 1).

A sobrevivência bacteriana depende da homeostase lipídica da membrana e da capacidade de ajustar sua composição adaptando-se a diversos ambientes (ZHANG e ROCK, 2008). No metabolismo central de *E. coli*, uma fonte de carbono, como a glicose, é consumida através de uma série de reações enzimáticas para formar piruvato. Posteriormente, o piruvato é descarboxilado oxidativamente pelo complexo de piruvato desidrogenase para produzir CO₂ e acetil-CoA. Enquanto a maior parte da acetil-CoA formada entra no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), uma pequena fração participa na biossíntese de ácidos graxos, onde o acetil-CoA é convertido em malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase. A concentração intracelular de malonil-CoA em *E. coli* é fortemente regulada de modo a coordenar a taxa de biossíntese de ácidos graxos com produção de lipídeos, síntese de macromoléculas e crescimento celular (para revisão, ver MAGNUSON et al., 1993).

Na análise transcriptômica foram identificados diversos genes envolvidos na síntese de ácidos graxos de *N. amazonense* CBAmC durante o cultivo com o fluido de apoplasto. Os genes malonil-CoA (*Y958_RS01165*, *Y958_RS13420*, *Y958_RS14030* e *Y958_RS14035*) e *fabD* (*Y958_RS18285*) precursores na biossíntese de ácidos graxos foram superexpressos. O

gene *fabG* que codifica para 3-oxoacil-ACP-redutase (OAR) apresentou maior superexpressão dentre os genes identificados para a biossíntese de ácidos graxos.

Estudos envolvendo a bactéria *Sinorhizobium meliloti* mostraram que a mutação no gene *fabG* implicou na sua incapacidade de tolerar concentrações elevadas de sal (MILLER-WILLIAMS et al., 2006). Para investigar ainda mais os efeitos da proteína OAR, em um experimento conduzido com *S. meliloti in vitro*, os genes *fabG* e *nodG* (homólogo de *fabG*) foram mutagenizados e após superexpressão de *nodG* pela inserção de plasmídeo, este mostrou resistência a NaCl e H₂O₂ (MAO et al., 2016). Esses resultados sugerem que a biossíntese de ácidos graxos pode ser importante para a adaptação a ambientes mais ricos em sais, a exemplo do que ocorreu quando a CBAmC passou do meio LGI para o meio contendo o fluido de apoplasto (Tabela 1).

Com a análise transcriptômica foi possível verificar que a grande maioria dos genes envolvidos no transporte e metabolismo de aminoácidos durante o cultivo da CBAmC com o fluido de apoplasto foram subexpressos.

A análise transcriptômica de *Azospirillum lipoferum* 4B mostrou a superexpressão de genes do metabolismo de arginina e prolina quando *Azospirillum lipoferum* 4B foi inoculada em arroz cv. Nipponbare (DROGUE et al., 2014). Os autores relataram que os seus resultados são consistentes com a presença de arginina e prolina em exsudatos radiculares de plantas de arroz de sete dias de idade (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2003). No apoplasto das variedades de cana-de-açúcar PR 60-170, NCo310 e RD 75-11 predominam os conteúdos de serina, ácido aspártico, alanina, e prolina, enquanto que ácido glutâmico, tirosina, cisteína, metionina, glicina e lisina foram encontrados em baixas concentrações (TEJERA et al., 2006).

Genes envolvidos no metabolismo de selenoproteínas foram superexpressos na análise transcriptômica. O gene *selD* codifica para uma selenofosfato sintetase que sintetiza selenofosfato, o doador de selênio para a biossíntese da selenocisteína e para a síntese de selenocisteína-tRNA (EHRENREICH et al., 1992). A proteína SelD é requerida por vários organismos bacterianos, arquea e eucarióticos para a síntese de selenocisteína, que é incorporada em proteínas conhecidas como selenoproteínas, que estão envolvidas na oxirredução, sinalização redox e defesa antioxidante (YOSHIZAWA et al., 2009). Esta proteína foi superexpressa durante o cultivo com o fluido do apoplasto.

Vários organismos como plantas superiores e algumas espécies de fungos parecem carecer completamente de selenoproteínas (LOBANOV et al., 2009). A fim de investigar organismos próximos de *Nitrospirillum amazonense* CBAmC em relação ao gene *selD*, foi submetido ao BLAST as espécies *Rhodocista centenária* SW e *Niveispirillum irakense* KDC1 (SCHWAB et al., 2018), e ambas não demonstraram possuir homólogos para este gene.

As selenoproteínas podem atuar como oxidoredutases podendo evitar danos aos componentes celulares e regular o estado redox das proteínas favorecendo a adaptação de *N. amazonense* quando cultivado no fluido apoplasto de cana-de-açúcar.

Os aglomerados de ferro e enxofre são cofatores de proteínas que atuam, por exemplo, na fixação de nitrogênio e respiração (OUTTEN e THEIL, 2009).

Os transportadores dependentes de tonB (TDTB) são proteínas que atuam no reconhecimento e internalização de complexos Fe³⁺-sideróforos específicos, vitamina B12, complexo de níquel e carboidratos por transporte ativo. O sistema TonB, formado pelas proteínas TonB, ExbB e ExbD, é conhecido por ter a função de transduzir a energia da força próton motriz gerada na membrana citoplasmática para proteínas transportadoras localizadas na membrana externa, onde é utilizada para ativar o transporte de substratos através da membrana externa para dentro do periplasma (KOEBNIK, 2005).

O genoma de CBAmC identificou mais de cinquenta genes que codificam para receptores dependentes de TonB (SCHWAB et al., 2018). A análise transcriptômica de *N.*

amazonense em resposta ao cultivo no meio de cultura contendo o fluido do apoplasto da cana demonstrou a superexpressão do agrupamento (Y958_RS23245; Y958_RS23250; Y958_RS23255; Y958_RS23260; Y958_RS23265) e do gene (Y958_RS19685) superexpressos. Entretanto, a grande maioria dos genes que codificam para transportadores dependentes de TonB foi subexpressa. Notavelmente, o gene mais subexpresso (Y958_RS21555) faz parte desse grupo. O sistema de transporte de sacarose identificado na análise de sequência do genoma é provavelmente dependente de TonB requerendo energia através de força próton-motriz, acoplada a síntese de ATP (SCHWAB et al., 2018). De acordo com os resultados da tabela 1, o fluido do apoplasto apresenta alta concentração de sacarose e carboidratos totais, o que poderia ocasionar a repressão desses genes.

A análise do transcriptômica mostrou que o operon *sufABCDSE*, necessário para a formação do cluster Fe-S responsivo ao estresse ou falta de ferro (OUTTEN et al., 2004) foi superexpresso. As proteínas SufC, uma ATPase, e SufB funcionam em conjunto sendo responsáveis pela montagem do agrupamento Fe-S e a proteína SufS é uma cisteína dessulfurase que transfere o enxofre para o agrupamento Fe-S.

O gene *bfr* (Y958_RS23000) que codifica para a bacterioferritina foi superexpresso. A bacterioferritina está envolvida no armazenamento de ferro intracelular mais importante nas bactérias (CROW et al., 2009). Na análise transcriptômica de *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8, esta bactéria apresentou a subexpressão desse gene durante o cultivo de duas horas com o fluido de apoplasto (SILVA, 2016).

A proteína de membrana plasmática FecR, que atua como um fator anti-sigma na importação de citrato férrico em *E. coli* (NOINAJ et al., 2010). Esta proteína foi subexpressa na análise do transcriptômica.

De modo similar a muitos outros procariotos, a homeostase de ferro em *N. amazonense* pode ser regulada pela proteína Fur (do inglês, Ferric Uptake Regulator). O gene Fur que codifica o principal regulador de transcrição de genes de ferro (TROXELL et al., 2013; FILLAT, 2014) foi superexpresso. O transcriptoma da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* cultivada em meio 3G10R mostrou a superexpressão desse gene (CIRAULO et al. 2010).

Em altas concentrações de ferro, o repressor Fur se liga a sequências de DNA utilizando o Fe_2^+ como cofator reprimindo a expressão de dezenas de genes (NOINAJ et al., 2011). Reciprocamente, na limitação de Fe_2^+ , o repressor se desliga do DNA induzindo a codificação de transportadores de ferro e de proteínas envolvidas na biossíntese de sideróforos e no metabolismo de ferro (NOINAJ et al., 2011).

A análise transcriptômica identificou o regulador transcricional Fur superexpresso, sugerindo a inibição de genes envolvidos em transportadores dependentes de TonB de *N. amazonense* em contato com o fluido do apoplasto.

Entre as possíveis fontes de enxofre usadas por microrganismos, os ésteres de sulfato e os sulfonatos representam as mais comuns nos solos (KERTESZ et al., 2004). Os genes envolvidos na utilização de sulfonato, os chamados genes *ssu* (do inglês, *sulfonate-sulfur utilization*), foram descritos para *Bacillus subtilis* (VAN DER PLOEG et al., 1998), *Escherichia coli* (VAN DER PLOEG et al., 1999) e *Pseudomonas putida* (KAHNERT et al., 2000). Em todas as espécies, os genes *ssu* são organizados como um operon e são responsáveis pela absorção e utilização específica de sulfonatos alifáticos. O operon *ssu* consiste em três genes que codificam um transportador de tipo ABC, *ssuABC*, e o gene *ssuD* que codifica para uma FMNH₂ (mononucleotídeo de flavina reduzida) dependente de alcanosulfonato monoxigenase.

Na análise transcriptômica os genes *ssuA* (Y958_RS25760), proteína de ligação extracelular, *ssuB* (Y958_RS25780), proteína de ligação de ATP, *ssuC* (Y958_RS25775), proteína transmembranar e *ssuD* (Y958_RS25770) foram subexpressos. Outros genes

(Y958_RS25240, Y958_RS25245, Y958_RS25250) que servem como receptores iniciais no transporte ABC de sulfonatos alifáticos, bicarbonato, nitrato e taurina foram fortemente subexpressos no cultivo de CBAmC no fluido do apoplasto de cana-de-açúcar. A mutação dos genes *ssuABC* em *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 levou à incapacidade de crescer em qualquer sulfonato alifático de cadeia curta (KOCH et al., 2005). A análise transcriptômica de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 revelou que os transcritos *ssuB* e *ssuC* foram subexpressos na presença do fluido de apoplasto (POLESE, 2017).

O enxofre é importante para a síntese de aminoácidos como cisteína e metionina, por sua vez, importantes para o metabolismo e a síntese proteica. O contato de CBAmC com o fluido do apoplasto inibiu genes importantes para a importação celular de enxofre.

A inspeção de COG para a categoria transcrição mostrou que 117 genes foram diferencialmente expressos. Entre estes, a expressão de 67 genes foram superexpressos sendo a maior parte representada pelas famílias de reguladores transcricionais. Quatorze genes reguladores pertencem a família de LysR que ativam em resposta ao cultivo com o fluido de apoplasto; quatro pertencem a família AraC; três a família GntR e o restante para as famílias XRE, MarR, ArsR, Lacl, CarD. Dentre os genes subexpressos, quatro reguladores pertencem a família TetR; dois para a família MarR; dois para a família LysR; três para a família GntR; três para a família AraC e o restante para a família Lacl, XRE, MerR e MucR foram identificados na nossa análise transcriptômica.

A família de reguladores transcricionais tipo LysR (RTTL) é um grupo bem caracterizado de reguladores transcricionais e altamente conservados e onipresentes em bactérias (MADDOCKS e OYSTON, 2008). A família de RTTL atua como ativadores ou repressores de genes únicos ou operon (HEROVEN e DERSCH, 2006). O papel regulatório de RTTL sobre genes são bem diversas, cujos produtos podem estar envolvidos no metabolismo, divisão celular, sensores de quórum, virulência, motilidade, fixação de nitrogênio, respostas ao estresse oxidativo, produção de toxinas (MADDOCKS e OYSTON, 2008).

O gene *Y958_RS04000* codifica para um regulador transcricional da família XRE e apresentou forte regulação positiva nas análises do transcriptoma e proteoma. O gene *phrR*, homólogo de *Y958_RS04000* foi superexpresso em condições de pH baixo em *S. meliloti* (REEVE et al., 1998). Além disso, o mutante para este gene em *Rhizobium etli* foi prejudicada durante o estresse oxidativo e nenhuma sobrevivência foi observada durante o choque térmico (VERCRUYSSSE et al., 2011).

A biotina é uma coenzima essencial ligada covalentemente a várias enzimas carboxilase incluindo acetil-CoA carboxilase, propionil-CoA carboxilase e piruvato carboxilase (HASSAN e ZEMPLINI, 2006). A via metabólica da biotina a partir da pimeloyl-coenzima A é comum a muitos organismos e envolve quatro enzimas no operon *bioFADB*. BioF é uma 8-amino-7-oxononanoato sintase, BioA uma 7,8- ácido diaminopelargônico sintase), BioD uma detotirobotina sintase e BioB uma biotina sintase. Esses genes são geralmente dispostos em um operon e estão presentes em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, arqueias e alguns eucariotos (para revisões, veja GUILLÉN-NAVARRO et al., 2005; SCHNEIDER e LINDQUIST, 2001; STREIT e ENTCHEVA, 2003). Todos esses genes foram superexpressos na presença do fluido do apoplasto de cana-de-açúcar. O transcriptoma da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* cultivada em meio 3G10R, meio de cultivo que mimetiza as condições do xilema, revelou também a superexpressão do gene *bioD*. (CIRAULO et al., 2010).

A *N. amazonense* possui prováveis genes envolvidos com a síntese de biotina, sugerindo uma capacidade adaptativa em ambientes pobres para este composto. Além disso, a biotina desempenha um papel no ciclo do ácido cítrico, auxiliando em reações metabólicas e ajudando a transferir dióxido de carbono (SANYAL et al., 1994). Como discutido na sessão

“geração de energia”, todos os genes identificados no ciclo do ácido cítrico foram superexpressos, corroborando os resultados da síntese de biotina.

Foram encontrados 51 genes superexpressos e 54 genes subexpressos na estirpe CBAmC quando cultivada no líquido do apoplasto da cana-de-açúcar na categoria “conversão e produção de energia”. Os genes quinona-NADH, ubiquinona-NADH, F0F1-ATP sintase e citocromos foram os principais representantes desse grupo.

Grande parte das enzimas envolvidas no ciclo do ácido tricarbóxico (citrato sintase, isocitrato desidrogenase, 2-oxoglutarato desidrogenase, fumarato desidrogenase) foram superexpressos. Entretanto a malato desidrogenase foi subexpressa, e uma enzima importante para a geração de ATP, a succinil-CoA sintetase, não foi diferencialmente expressa de acordo com a análise transcriptômica. O gene *aarC* que codifica para o succinato-CoA transferase: acetato-CoA apresentou a maior superexpressão na análise do transcriptômica. Esta enzima catalisa a conversão de succinil-coenzima A (CoA) e acetato em succinato e acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico apresentando uma rota alternativa (MULLINS et al., 2008). O acetato é um subproduto tóxico que inibe o crescimento de células de *E. coli* (LULI e STROHL, 1990). Estudos envolvendo este gene na alfa-proteobactéria *Acetobacter aceti* mostraram que confere resistência ao acetato (MULLINS et al., 2013).

A análise transcriptômica permitiu identificar genes com expressão diferencial envolvidos na fosforilação oxidativa. Genes que codificam para NADH ubiquinona oxidoreductase (*Y958_RS29130*), citocromo subunidade IV (*Y958_RS16390*) e três subunidades de ATP sintase (*Y958_RS03845*, *Y958_RS03855* e *Y958_RS11210*) foram superexpressos. Em contraste, genes para complexos de citocromo c redutase e oxidase e o complexo bd importantes na formação de energia foram subexpressos de acordo com a análise.

Estudo transcriptômico envolvendo a bactéria diazotrófica *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8 na presença do fluido do apoplasto mostrou a superexpressão de transcritos relacionados com o ciclo do ácido tricarbóxico e de fosforilação oxidativa (SILVA, 2016). Estudos envolvendo análise transcriptômica dupla de raiz de cana-de-açúcar e com *Burkholderia* Q208 associada a raiz, mostrou que genes envolvidos na fosforilação oxidativa foram altamente expressos (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2016), em contraste com os resultados do presente trabalho que apresentaram forte subexpressão. Estudos com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 cultivada na presença de naringenina mostraram a subexpressão de genes para complexos de citocromo envolvidos na fosforilação oxidativa (TADRA-SFEIR et al., 2015).

O genoma da *N. amazonense* CBAmC foi sequenciado (SCHWAB, et al., 2018), tendo sido identificadas duas vias glicolíticas, a de Entner-Doudoroff e a de Embden-Meyerhof-Parnas. Na análise transcriptômica dois genes envolvidos na via Entner-Doudoroff, que codificam para 2-desidro-3-desoxigalactonocinase/quinase (*Y958_RS28190*) e 2-desidro-3-desoxi-6-fosfogalactonato aldolase (*Y958_RS28185*) foram superexpressos. Isso sugere uma possível via glicolítica preferencial no cultivo da bactéria com o fluido de apoplasto.

Os genes ribulose-3-epimerase fosfato, transcetolase, frutose-6-fosfato aldolase representantes da via pentose-fosfato foram superexpressos na análise transcriptômica. O metabolismo de frutose e manose foram fortemente subexpressos. Todos os genes identificados no metabolismo de galactose foram superexpressos.

O agrupamento contendo os genes *suh/suxB* (*Y958_RS28830*), *suxA* (*Y958_RS28835*), *suxC* (*Y958_RS28840*) e *suxR* (*Y958_RS28845*) apresentou forte subexpressão de acordo com os resultados da análise transcriptômica. Estes genes estão envolvidos na utilização de sacarose (KIM et al., 2004; BLANVILLAIN et al., 2007). O fluido de apoplasto possui alta concentração de sacarose na cana-de-açúcar, além de frutose, glicose e ácido orgânicos nos

colmos iniciais (WELBAUM & MEINZER, 1990), o que justificaria a repressão desses genes durante tratamento com o cultivo de *N. amazonense* CBAmC.

O genoma da estirpe CBAmC foi sequenciado (SCHWAB et al., 2018) sendo possível identificar diversas vias para a síntese de auxina como IPyA, IAM, por exemplo. Entretanto, no presente estudo não foi possível identificar grupos de genes diferencialmente expressos nessas vias. A estirpe CBAmC permaneceu em contato com o fluido de apoplasto durante duas horas, sugerindo que a bactéria necessita, a priori, adaptar-se ao novo ambiente antes de expressar genes envolvidos na biossíntese de fitohormônios. Mais estudos serão necessários para estudar a via de fitohormônios na *N. amazonense*.

Na análise proteômica foram identificados 81 proteínas superexpressas na presença do fluido de apoplasto. Os produtos dos genes estão distribuídos nas diferentes classes de acordo com os agrupamentos de grupos ortólogos. Nesta análise foi dado enfoque principalmente para as classes possivelmente relacionadas com a interação bactéria-planta: “mecanismo de transdução de sinais”, “motilidade celular”, “tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular”, “modificação pós-tradução, reciclagem proteica e chaperonas”, “metabolismo e transporte de íons inorgânicos” entre outros.

Proteínas atuantes no ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa apresentaram níveis de regulação alterados. A proteína hidrolipoamida desidrogenase (*Y958_RS10805*) atuante no ciclo do ácido cítrico foi superexpressa. Representantes da fosforilação oxidativa foram identificados na nossa análise. A proteína ubiquinona oxidase (*Y958_RS16405*) apresentou regulação positiva enquanto que citocromos (*Y958_RS06160*; *Y958_RS31090*) foram subexpressos (Anexo A).

As proteínas alceno redutase (*Y958_RS09850*) e NADH: flavina oxidase (*Y958_RS18965*) são enzimas que contêm um domínio de ligação à flavina. Estas enzimas estão frequentemente envolvidas na proteção das células contra o estresse oxidativo (GRIESE et al., 2006).

A proteína aldeído desidrogenase dependente de NADP⁺ (*Y958_RS16050*) foi superexpressa na análise proteômica. Esta proteína está envolvida na degradação de pentoses tais como D-arabinose, L-arabinose, D-ribose e D-xylose. Esta proteína catalisa a quinta reação na via de utilização de pentoses através da desidratação do 2,5-dioxopentanoato em 2-oxoglutarato. Os produtos finais para esta via de pentose são metabolizados na forma não fosforilada em 2-oxoglutarato ou em piruvato e glicaldeído (BROUNS et al., 2006). A ribose e a desoxirribose são os principais constituintes dos ácidos nucleicos, enquanto a arabinose e a xilose são blocos de construção de vários polissacarídeos da parede celular da planta. Essa via metabólica tem sido relatada em *Azospirillum* (NOVICK e TYLER, 1982) e *Herbaspirillum* (MATHIAS et al., 1989). A expressão dessa proteína reflete a capacidade de *Nitrospirillum amazonense* de utilizar várias pentoses como fonte de carbono e energia.

No metabolismo de nitrogênio a assimilação de nitrato envolve a redução de nitrato a nitrito pela nitrato redutase, seguido pela redução da nitrito a óxido nítrico pela nitrito redutase, podendo ser incorporada nas biomoléculas. Na análise proteômica, transportadores de nitrato (*Y958_RS16175*; *Y958_RS18430*) foram subexpressos, enquanto que as proteínas NirB (*Y958_RS16160*) e NirD (*Y958_RS16155*), subunidades grande e pequena, respectivamente da nitrito redutase dependente de NADH foram superexpressas. A proteína glutamina amidotransferase tipo I (*Y958_RS18960*) foi fortemente superexpressa na nossa análise (anexo A). Esta enzima catalisa a transferência do nitrogênio amido da glutamina para um substrato aceitador e uma molécula de um produto aminado (MASSIÈRE et al., 1998) e está envolvida na biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos. Entretanto, na análise proteômica, todas as proteínas pertencentes ao metabolismo de purina foram subexpressas.

O fosfato tem um papel central em muitas das vias metabólicas e produtoras de energia nas bactérias. A PstS (*Y958_RS11835*) é uma proteína periplasmática dependente de ATP que

está envolvida na incorporação de fosfato. Esta proteína foi subexpressa na análise proteômica (LUECKE et al., 1990). Além disso, um receptor para TonB (Y958_RS26950) foi subexpresso.

Flagelinas são proteínas globulares que formam o filamento de um flagelo bacteriano. A FlaF é uma proteína flagelina conservada em várias espécies alfa-proteobacteria que funciona na montagem de filamentos bacteriano (LLEWELLYN et al, 2005). A proteína FlaF foi a que obteve a maior subexpressão proteica. Este resultado sugere que durante o cultivo com o fluido de apoplasto induz a forma sésil da CBAmC, corroborando com os dados fisiológicos e transcriptômicos (Anexo A).

A proteína IscR (Y958_RS12975) apresentou regulação positiva. Esta proteína regula a expressão de IscS que catalisa a transferência de enxofre e selênio da cisteína e selenocisteína para uma variedade de receptores envolvidos na formação do agrupamento [2Fe-2S] (TOKUMOTO e TAKAHASHI, 2001), além de atuar em resposta ao estresse oxidativo e a formação de biofilme (YEO et al., 2006; WU e OUTTEN, 2009).

A chaperona GroEL (Y958_RS12730) e sua co-chaperona GroES (Y958_RS12735) foram superexpressas na análise proteômica. Ambas formam um complexo que está envolvido no dobramento dependente de ATP em proteínas recém-sintetizadas. Esta proteína pertencente ao grupo HSP60 e esta relacionada no enovelamento de proteínas recém-sintetizadas (RADFORD et al., 2006).

A proteína do tipo Bola (Y958_RS06560) foi recentemente descrita como um fator de transcrição bacteriano que modula negativamente a biossíntese flagelar e favorece a formação de biofilme em *E. coli* (DRESSAIRE et al., 2015) (Anexo A). Esta proteína foi superexpressa na análise transcriptômica e proteômica. Os resultados transcriptômicos e proteômicos mostraram que a formação do sistema flagelar foram fortemente subexpressos.

A proteína reguladora MucR (Y958_RS07145) foi superexpressa em ambas as análises. Esta proteína influencia na composição da matriz de exopolissacarídeos. Estudos com a proteína MucR com a *Sinorhizobium meliloti* revelaram que ela age negativamente na motilidade, sugerindo seu envolvimento com a produção de succinoglicano e inibição da síntese de galactoglucano, fatores importantes para a formação de biofilme e colonização bacteriana (BAHLAWANE et al., 2008).

A proteína Y958_RS01065 pertencente da superfamília CRP/FNR foi subexpressa. Os reguladores Crp-Fnr destacam-se em responder a um amplo espectro de variáveis intracelulares e exógenas, como concentração de cAMP e oxigênio, estado redox, disponibilidade de nitrogênio, presença de óxido nítrico, monóxido de carbono e 2-oxoglutarato, ou temperatura (MATSUI et al., 2013).

A proteína reguladora transcricional XRE (Y958_RS04000) apresentou forte superexpressão. Esta proteína reguladora é conhecida como elemento de resposta a xenobióticos (XRE), ligando-se a sequências curtas conservadas de DNA nas regiões promotoras de muitos genes que são induzidos em situações de estresse (MATSUSHITA et al., 1993).

A proteína (Y958_RS30535) pertence à superfamília de estresse universal UspA. Um conjunto de mutantes para esses genes mostrou afetar a mobilidade, a adesão e a resistência ao estresse oxidativo, assim como a inanição de carbono em *E. coli* (NACHIN et al., 2005, NYSTRÖM et al., 1994). A indução transcricional do gene *uspA* de *Escherichia coli* ocorre quando há parada de crescimento e as células mutagenizadas em UspA sobrevivem mal em fase estacionária (FREESTONE et al., 1997). A CBAmC ao entrar em contato com o fluido do apoplasto, com grandes quantidades de nutrientes (Tabela 1) possivelmente ocasionou a subexpressão dessa proteína. Além disso, a grande maioria dos genes e proteínas para quimiotaxia e motilidade na análise transcriptômica e proteômica foram subexpressas, o que poderia causar a repressão da proteína membro da UspA.

A função das PSP bacterianas é auxiliar na homeostase da membrana citoplasmática, mantendo a integridade celular em fatores que poderiam aumentar sua permeabilidade, como por exemplo, virulência, osmolaridade, calor e temperatura (FLORES-KIM e DARWIN, 2016). Na análise transcriptômica e proteômica, o agrupamento *pspAC* (Y958_RS01375; Y958_RS013785) foi superexpresso (Anexo A). O operon *pspABC* de *Azospirillum lipoferum* 4B, após sete dias de inoculação em raízes de cultivares de arroz, foi superexpresso (DROGUE et al., 2014). O operon *psp* mostrou-se superexpresso significativamente em células de *E. coli* associadas às raízes de alface (HOU et al., 2012). Os organismos necessitam de mecanismos eficientes e rápidos para se adaptarem a constantes mudanças que ocorrem no ambiente e esses resultados sugerem a versatilidade da *N. amazonense* de adaptar-se a diversos ambientes para manter a sua sobrevivência.

Proteínas de choque térmico (HSPs) são importantes nas células para proteger outras proteínas em condições de estresse (KUMSTA e JAKOB, 2009; HASLBECK et al., 2005; SAIBIL, 2013). As análises do transcriptoma e do proteoma permitiram identificar proteínas superexpressas dos grupos HSP20, HSP33, HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100.

A proteína IbpA (Y958_RS09740) foi fortemente superexpressa (anexo A). Esta proteína pertencente ao grupo HSP20 previne a agregação de proteínas durante o choque térmico. Além disso, genes mutantes *ibpAB* de *E. coli* demonstraram a formação lenta de biofilmes (KUCZYNSKA-WISNIK et al., 2002).

A proteína HslO (Y958_RS12635) foi superexpressa. Esta proteína é uma chaperona redox, dependente de zinco, conhecida como Hsp33. Foi demonstrado que a combinação de estresse térmico com o estresse oxidativo provocado pelo H₂O₂ inativa a chaperona DnaK e ativa a chaperona Hsp33 (WINTER et al., 2005).

Agrupamentos de ferro-enxofre [Fe-S] são grupos protéticos inorgânicos simples contidos em diversas proteínas com funções relacionadas à transferência de elétrons, regulação gênica, sensoriamento ambiental e ativação de substratos (PY et al., 2011). As proteínas NifU (Y958_RS00115) e SufB (Y958_RS03540) foram superexpressas na análise proteômica. Ambas auxiliam na formação do agrupamento Fe-S. Enquanto a proteína NifU auxilia na montagem do agrupamento [2Fe-2S] (FRAZZON et al., 2002), estudos com a proteína SufB *in vitro*, demonstraram estabilizar este agrupamento (BLANC et al., 2014).

A proteína bifuncional DegP (Y958_RS20070) com funções de atividade protease e chaperona na região periplasmática apresentou superexpressão ao nível de mRNA e proteína. A proteína DegP (serina protease) funciona principalmente como uma protease no espaço periplasmático auxiliando no controle de qualidade para a biogênese de proteínas de membrana externa beta-barril (OMPs) (GE et al., 2014). Curiosamente, a proteína mais expressa no proteoma foi uma família das porinas OMPs, que possui um domínio beta-barril. Esta proteína atua em resposta a diferentes demandas a variações como osmolaridade, temperatura, pH, variações de oxigênio e inanição (MARTÍNEZ-FLORES et al., 1999; SHIMIZU et al., 2014).

O grupo de proteínas da dissulfeto isomerase (Y958_RS01435; Y958_RS12230; Y958_RS13405), responsáveis pela estabilidade protéica e pelas ligações dissulfeto, foram superexpressas (Anexo A). A YbbN (Y958_RS01435) foi superexpressa na análise transcriptômica e proteômica. Esta proteína auxilia no enovelamento e montagem de proteínas-chave envolvidas na replicação do DNA e na resposta de estresse, além de interagir com as chaperonas DnaK e GroEL (LIN e WILSON, 2011).

Os organismos aeróbicos usam oxigênio molecular (O₂) para a respiração e obtenção de energia. A exposição das células aos subprodutos de respiração, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês: *reactive oxygen species*), como superóxido O₂⁻, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroxila (OH), são gerados continuamente em células cultivadas de forma aeróbica (CABISCOL et al., 2000). A análise proteômica identificou a proteína tioredoxinas TrxA

(Y958_RS13405) e glutaredoxinas, GrxC (Y958_RS12230) foram superexpressas e estão envolvidas no estresse oxidativo (CABISCOL et al., 2000; EZRATY et al., 2017). A proteína MrsA, metionina sulfóxido redutase A, é encontrada em vários organismos (DELAYE et al., 2007). Esta proteína foi superexpressa na análise proteômica. Demonstrou-se que o mutante em *E. coli* para esta proteína apresentou sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo (MOSKOVITZ et al., 1995). A proteína GstA, uma glutathiona S-transferase também atua na defesa contra o estresse oxidativo (KANAI et al., 2006). A análise transcriptômica e proteômica identificou uma proteína superexpressa (Y958_RS11400). Entretanto, a análise transcriptômica para uma glutathiona S-transferase (Y958_RS06815) foi superexpressa, enquanto que na análise proteômica foi subexpressa, o que poderia ser explicado por uma possível modificação pós-transducional.

As plantas usam uma variedade de táticas não específicas para se defender contra ameaças bacterianas patogênicas, virais e fúngicas, que incluem a superprodução de ROS (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996). A análise transcriptômica de *Azospirillum lipoferum* 4B revelou a superexpressão de genes que codificam para tioredoxinas durante sete dias de interação em raízes de arroz (DROGUE et al., 2014). Cabe ressaltar que mudança de ambientes ocorre frequentemente na natureza como oscilações frequentes de fatores bióticos e abióticos e microrganismos precisam ser versáteis para se adaptarem rapidamente a estas mudanças. Estes resultados sugerem que a CBAmC ao entrar em contato com o fluido de apoplasto está ocorrendo uma renovação do repertório proteico para a adaptação de um novo ambiente.

Os resultados da análise proteômica mostraram que diversos genes que codificam para bombas de efluxo de múltiplas drogas RND foram superexpressos. (Anexo A). Todos os agrupamentos identificados para bombas de resistência - nodulação - divisão (RND) AcrAB-OprM foram superexpressos. O operon (Y958_RS27945; Y958_RS27950; Y958_RS27955) foram notavelmente superexpressos de acordo com resultados do transcriptômica e proteoma (Figura 21, Anexo A). Entretanto, o gene que codifica para o transporte de efluxo RND (Y958_RS22020;) foi subexpresso na análise transcriptômica, enquanto que o gene que codifica para um transportador RND (Y958_RS19200) foi superexpresso na análise transcriptômica e subexpresso na análise proteômica, indicando possível regulação pós-transducional.

O trabalho realizado com mutante para transportadores RND em *Sinorhizobium meliloti* 1021 mostrou uma diminuição de 2 a 64 vezes na resistência da bactéria a uma variedade de compostos, incluindo antibióticos, detergentes, corantes e produtos químicos derivados de plantas. Além disso, foi observada em *S. meliloti* mutante para bombas RND, capacidade de nodulação defeituosa em relação a *S. meliloti* do tipo selvagem (EDA et al., 2011). Um mutante para a bomba RND em *Bradyrhizobium japonicum* mostrou um elevado número de nódulos, com peso reduzido, e baixa capacidade de fixação de nitrogênio (TAKESHIMA et al., 2013). Também foi proposto que a bomba de efluxo da família RND participa do crescimento de células de *B. japonicum* dentro da planta, pois o número de células viáveis isoladas dos nódulos formados por este mutante foi diminuído (LINDEMANN et al., 2010).

As proteínas transportadoras são uma das interfaces primárias de um organismo com o meio ambiente. A *N. amazonense* ao superexpressar transportadores RND sugere a capacidade de facilitar a adaptação e sobrevivência na presença do fluido do apoplasto da cana-de-açúcar. De acordo com a curva de crescimento de CBAmC no meio LGI com o fluido de apoplasto (Figura 5), ocorreu um lento crescimento inicial seguido por um rápido crescimento exponencial, indicando que em nenhum momento o fluido de apoplasto impediu o crescimento da *N. amazonense*.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A análise comparativa entre os resultados de transcriptômica e proteômica mostrou alta correlação.
- ✓ A estirpe CBAmC de *Nitrospirillum amazonense* na presença do fluido de apoplasto da cana-de-açúcar apresentou uma variedade de transcritos e proteínas diferencialmente expressos conforme resultados das análises de transcriptômica e proteômica.
- ✓ O estado metabólico de *N. amazonense* durante o cultivo na presença de fluido do apoplasto é direcionado a proteínas capazes de suportar a adaptação em um ambiente complexo, como o apoplasto de cana-de-açúcar.
- ✓ Grupos de genes e proteínas envolvidos no estresse osmótico e estresse oxidativo e transportadores do tipo multi drogas RND foram superexpressos.
- ✓ A presença do fluido de apoplasto induziu a subexpressão de genes e proteínas envolvidos na quimiotaxia e motilidade. A análise em meio de cultivo na presença do fluido de apoplasto demonstrou ausência de motilidade bacteriana.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo nos fornecem informações globais da expressão de genes super e subexpressos na estirpe CBAmC quando cultivada com o fluido de apoplasto da cana-de-açúcar RB867515. No presente estudo, os resultados da análise transcriptômica mostraram-se bastante consistentes com os da análise proteômica. Dentre os genes e as proteínas que apresentaram a mesma tendência de expressão, observou-se alta correlação nos níveis de mRNA e proteína, validando ambos os experimentos.

Um panorama geral de diferentes classes de genes e proteínas diferencialmente expressos no nosso estudo é mostrado na figura 25. Dentro das classes de genes e proteínas mostradas na figura 25, transportadores de efluxo multidrogas RND e proteínas envolvidas no estresse oxidativo e osmótico foram fortemente superexpressos, enquanto que a quimiotaxia e o sistema flagelar foram subexpressos e mostrou corroborar com os resultados citados na nossa discussão na interação de planta-bactéria, simbióticas ou patogênicas.

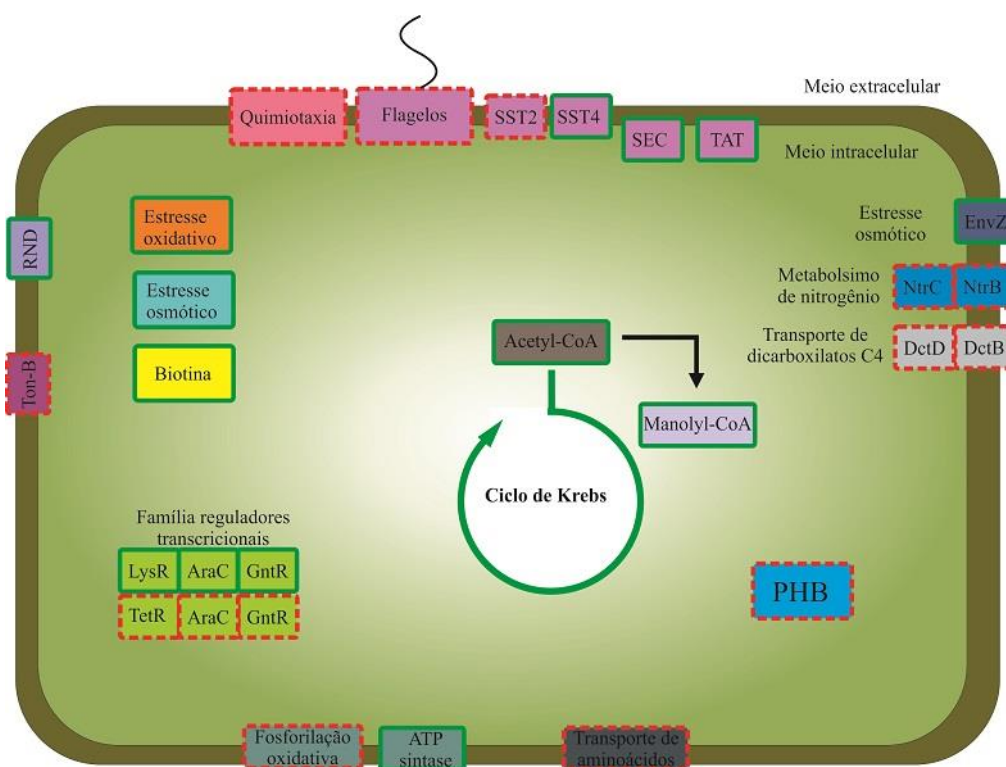


Figura 25. Quadro geral das principais vias metabólicas de genes e proteínas de *Nitrospirillum amazonense* CBAmC diferencialmente expressos cultivada na presença do fluido de apoplasto da cana-de-açúcar RB867515. A linha contínua verde indica superexpressão e a linha vermelha tracejada subexpressão.

Cabe ressaltar que o nosso experimento foi realizado *in vitro* em ambiente controlado envolvendo somente um microrganismo e o fluido de apoplasto da cana. Em condições naturais do meio ambiente, as plantas são colonizadas por bactérias comensais, adquirindo nutrientes sem causar danos, bactérias mutualísticas que promovem a saúde e desenvolvimento das plantas e as bactérias patogênicas que causam efeitos nocivos. Além disso, as condições abióticas como pH, temperatura e oscilações de fatores hídricos, podem afetar direta e indiretamente os microrganismos e plantas. Estudo recente de metagenômica dos colmos inferiores da cana-de-açúcar RB867515 revelou uma grande diversidade de bactérias endofíticas (de SOUZA et al., 2016), evidenciando a complexidade da interação entre planta-bactéria e bactéria-bactéria.

A aplicação de inoculantes microbianos pode influenciar, talvez de forma temporária, a microbiota do solo e pouco se sabe sobre o efeito de tamponamento da microbiota vegetal. Torna-se necessário um conhecimento profundo de quais genes e proteínas são expressos para a sobrevivência e persistência das bactérias na interação com a planta. Assim como a *N. amazonense* estirpe CBAmC, as bactérias fixadoras de nitrogênio *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 foram submetidas à presença do fluido de apoplasto da cana-de-açúcar e o seus perfis transcriptômicos foram avaliados. Estas bactérias superexpressaram genes envolvidos no transporte de ferro e transporte através de porinas, enquanto que grupos de genes envolvidos em sistemas de secreção tipo II, EPS, quimiotaxia e montagem flagelar foram subexpressos. Os resultados obtidos *in vitro* serão necessários comprovar na planta, utilizando, por exemplo, a técnica de metatranscritômica e RT-qPCR.

Com a identificação detalhada de genes diferencialmente expressos da estirpe CBAmC na presença do fluido de apoplasto da cana-de-açúcar variedade RB867515, espera-se elucidar os componentes genéticos necessários na interação de PGPR com a planta, servindo como base na identificação de marcadores moleculares e orientando futuros estudos com a estirpe CBAmC bem como potencial desenvolvimento de um inoculante para a cana-de-açúcar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *J. Appl. Microbiol.*, v. 113, p. 1139–1144, 2012.
- ANANDA/Planner. Análise de Investimentos: Relatório Setorial – Fertilizantes. p. 1-4, 2016.
- ANDERS, S. & HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, v. 11(10), R, 106, 2010.
- ASHWIN, N.M.R.; BARNABAS, L.; RAMESH SUNDAR, A.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; MASI, A.; GANESH, K. A.; RAKWAL, R. Advances in proteomic Technologies and their scope of application in understanding plant-pathogen interactions. *Plant Biochem. Biotechnol.*, v. 26, p. 371, 2017.
- ASLUND, F.; EHN, B.; MIRANDA-VIZUETE, A.; PUEYO, C.; HOLMGREN, A. Two additional glutaredoxins exist in *Escherichia coli*: glutaredoxin 3 is a hydrogen donor for ribonucleotide reductase in a thioredoxin/glutaredoxin 1 double mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, n.21, p. 9813-7, 1994.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. JR.; PEREIRA, J. O.; DE ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electron. J. Biotechnol.* Vol. 3, No. 1. Online publication, 2000.
- BACILIO-JIMÉNEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; VENTURA-ZAPATA, E.; PÉREZ-CAMPOS, E.; BOUQUELET, S.; ZENTENO, E. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil*, v. 249, p. 271 – 277, 2003.
- BADANI, J. I.; VIDEIRA, S. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCHWAB, S.; SOUZA, E. M.; PEDRAZA, R. O.; BALDANI, V. L. D.; HARTMANN, A. *The Prokaryotes: The Family Rhodospirillaceae*. 4th edition: Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 2014.
- BAHLAWANE, C.; MCINTOSH, M.; KROL, E.; BECKER, A.; Sinorhizobium meliloti Regulator MucR Couples Exopolysaccharide Synthesis and Motility. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 21:11, p. 1498-1509, 2008.
- BALDANI V. L. D. & DÓBEREINER, J. Host plant specificity in the infections of cerise with *Azospirillum* spp. *Soil Biol Biochem*, v. 12, p. 4, 1980.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; KRIEG, N. R.; BALDANI, V. L. D.; HARTMANN, A.; DOBEREINER. Genus II. *Azospirillum*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. {Ed.} *Bergey's Manual of systematic bacteriology: the proteobacteria: the alpha, beta, delta and epsilonproteobacteria*. 2 ed. Dordrecht: Springer, v. 2, part C. p. 22-24, 2005a
- BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÓBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: Avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G.(eds). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Lavras, Universidade Federal de Lavras, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.621-666, 1999.

- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil.*, v. 384, p. 413-31, 2014.
- BALSANELLI, E. , SERRATO, R. V., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M. AND MONTEIRO, R. A. Role of *Herbaspirillum seropedicae* LPS in Plant Colonization. In *Biological Nitrogen Fixation*, F. J. de Bruijn (Ed.), 2015.
- BALSANELLI, E. Caracterização de fatores moleculares envolvidos na interação de *Herbaspirillum seropedicae* com gramíneas. Curitiba: UFPR, 2013, 160 p. (Tese de doutorado).
- BAPTISTA, R.B.; MORAIS, R.F. de; LEITE, J.M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Variations in the ¹⁵N natural abundance of plant-available N with soil depth: their influence on estimates of contributions of biological N₂ fixation to sugar cane. *Applied Soil Ecology*, v.73, p.124-129, 2014
- BARRETEAU, H.; KOVAČ, A.; BONIFACE, A.; SOVA, M.; GOBEC, S.; BLANOT, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32: p. 168-207, 2008.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. *Adv Agron*, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013) *Plant Soil.*, v.378, p. 1–33, 2014.
- BLANC, B.; CLEMANCEY, M.; LATOUR, J. M.; FONTECAVE, M.; OLLAGNIER DE CHOUDENS S. Molecular investigation of iron-sulfur cluster assembly scaffolds under stress. *Biochemistry*, v. 53(50), p. 7867-9, 2014.
- BLANVILLAIN, S.; MEYER, D.; BOULANGER, A.; LAUTIER, M.; GUYNET, C.; DENANCÉ, N. Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. *PLoS ONE*, v. 2(2) p. e224, 2007.
- BODDEY, R. M; SOARES, L. H. B.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Bio-ethanol production in Brazil. In: PIMENTEL, D. *Biofuels, solar and Wind as renewable energy systems*. New York, Springer, p. 321-356, 2008.
- BOLLER, T.; FELIX G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev. Plant Biol.*, v. 60, p. 379–406, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248, 1976.
- BRAUNSTEIN, M.; ESPINOSA, B. J.; CHAN, J.; BELISLE, J. T.; JACOBS, W.R. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, v. 48, p. 453–464, 2003.
- BROUNS, S. J. J.; WALTHER, J; SNIJDERS, A. P. L.; VAN DE WERKEN, H. J. G.; WILLEMEN, H. L. D. M.; WORM, P.; DE VOS, M. G. J.; ANDERSSON, A.; LUNDGREN, M.; MAZON, H. F. M.; VAN DEN HEUVEL, R. H. H.; NILSSON, P.; SALMON, L.; DE VOS, W. M.; WRIGHT, P. C.; BERNANDER, R.; VAN DER OOST, J. Identification of the Missing Links in Prokaryotic Pentose Oxidation Pathways: EVIDENCE FOR ENZYME RECRUITMENT. *Journal of Biological Chemistry* ., v. 281, p. 27378-27388, 2006.

- BUTALA, M.; ZGUR-BERTOK, D.; BUSBY, S.J.. Cell Mol Life Sci. v. 66, p. 82–93, 2009.
- CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int Microbiol., v. 3(1), p. 3-8, 2000.
- CALDERAN-RODRIGUES, M. J.; JAMET, E.; BONASSI, M.B.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; BEGOSSI, A.C.; SETEM, L.V.; FRANSCSCHINI, L. M.; FONSECA, J. G.; LABATE, C. A. Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures, Proteomics 14 738–749, 2014.
- CAMILIOS-NETO, D.; BONATO, P.; WASSEM, R.; TADRA-SFEIR, M. Z.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., VALDAMERI, G.; SOUZA, E. M. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. BMC Genomics, v. 15(1), p. 378, 2014.
- CANNY, M.J. Apoplastic water and solute movement: new rules for an old space. Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology, v. 46, p. 215–236, 1995.
- CANTARELLA, H.; TRIVELLIN, P.C.O.; VITTI, A.C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: YAMADA, T; ABDALLA, S.R.S.; VITTI, G.C. (Ed.). Nitrogênio e enxofre na agricultura Brasileira. Piracicaba: International plant nutrition institute, p. 355-413, 2007.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil, v.108, p.23-31, 1988.
- CHERKASOV, N.; IBHADON, A.O.; FITZPATRICK, P. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation, Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, v. 90, p. 24-33, 2015.
- CHEVANCE, F.F.V.; HUGHES, K.T. Coordinating assembly of a bacterial chromosomal machine. Nat Rev Microbiol. v. 6(6), p. 455–65, 2008.
- CHRISTIE P. J.; VOGEL J. P. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends Microbiol., v. 8, p. 354–360, 2000.
- CHRISTIE, P. J.; CASCALES, E. Structural and dynamic properties of bacterial Type IV secretion systems (Review). Molecular Membrane Biology, v. 22(0), p. 51–61, 2005.
- CHUNG, W.J.; SHU H.Y.; LU, C.Y.; WU, C.Y.; TSENG, Y.H.; TSAI, S.F.; LIN, C. H. Qualitative and comparative proteomic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 17. Proteomics, v. 7, p. 2047–2058, 2007.
- CIRAULO, M.B.; SANTOS, D.S.; RODRIGUES, A.C.D.F.O.; DE OLIVEIRA, M.V.; RODRIGUES, T.; DE OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R. Transcriptome analysis of the phyto bacterium *Xylella fastidiosa* growing under xylem-based chemical conditions. Journal of Biomedicine & Biotechnology, v.2010, p.781365, 2010.
- CLAYTON, W. D.; DANIELS, C. A Geographical, historical and cultural aspect of origin of the Indian and Chinese sugarcane *S. barberi* and *S. sinensis* ISSCT Sugarcane Breed. Newsletter Mackknade, v. 36. P. 4-23, 1975.
- COHEN, S.; N., CHANG, A. C.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 69, p. 2110–2114, 1972.

- Compant, S.; Kaplan, H.; Sessitsch, A.; Nowak, J.; Ait Barka, E.; Clément, C. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 63, p. 84-93, 2008a.
- COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; ClÉment, C.; AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1685-1693, 2005b.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana de açúcar, terceiro levantamento, agosto/2017 – Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab 2017. <http://www.conab.gov.br/>. Acessado em 15/03/2017
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, v. 21, v. 3674–3676, 2005.
- CORRÊA, P. M. Dicionário de plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: IAA, v. 1935. P. 153-163, 1926.
- COSME, A. M.; BECKER, A.; SANTOS, M. R.; SHARYPOVA, L.A.; SANTOS, P.M.; MOREIRA, L.M. The Outer Membrane Protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* Affects Protein Secretion, Polysaccharide Biosynthesis, Antimicrobial Resistance, and Symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 21 (7), p. 947-957, 2008.
- COUTINHO, B. G.; LICASTRO, D.; MENDONÇA, A-PREVIATO, L.; CÁMARA, M., VENTURI, V. Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. *Molec. Plant-Microbe Interact*, v. 28, p.10–21, 2015.
- CROW, A.; LAWSON, T. L.; LEWIN, A.; MOORE, G.R.; LE BRUN, N. E. Structural basis for iron mineralization by bacterioferritin. *JAmChem Soc* 131: 6808–6813, 2009
- DE CARLI, G. Geografia econômica e social do Brasil. Rio de Janeiro: Edição Brasil Açúcar, V. 2. p. 7-72, 1936
- de LA CRUZ F.; FROST L. S.; MEYER R. J.; ZECHNER E. L. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:18–40, 2010.
- ABREU, R. de S.; PENALVA, L. O.; MARCOTTE, E. M.; VOGEL, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular bioSystems*, v. 5(12), p. 1512–1526, 2009.
- De SOUZA, R.S.C.; OKURA, V.K.; ARMANHI, J.S.L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; da SILVA, M.J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; de ARAÚJO, L.M.; VERZA, N.C.; BAGHERI, H.C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*, v 6:28774, p. 1-15, 2016.
- DELAYE, L.; BECERRA, A.; ORGEL, L.; LAZCANO, A. Molecular evolution of peptide methionine sulfoxide reductases (MsrA and MsrB): on the early development of a mechanism that protects against oxidative damage. *J. Mol. Evol.*, v. 64, p. 15–32, 2007.
- DELMOTTE, N.; KNIEF, C.; CHAFFRON, S.; INNEREBNER, G.; ROSCHITZKI, B.; SCHLAPBACH, R.; VON MERING, C.; VORHOLT, J. A. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106(38), p. 16428–16433, 2009.
- DIETZ K-J. 1997. Functions and responses of the leaf apoplast under stress. *Progress in Botany*, v. 58, p. 221-254, 1997.

- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat.Rev.Microbiol.*, v.2, n.8, p.621-631, 2004.
- DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp.n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesq. Agropec. Bros.*, v. 1, p. 357-365, 1966.
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, Rehovot, v.13, p.1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, Lisboa, v.1, p.261-272, 1958.
- DONG, Z., CANNY, J. M., MCCULLY, M. E., ROBOREDO, M. R., CABADILLA, C. F., ORTEGA, E., RODÉS, Rosita. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems, *Plant Physiol*, v. 105 p. 1139-1147, 1994.
- DRESSAIRE, C.; MOREIRA, R. N.; BARAHONA, S.; ALVES DE MATOS, A. P.; ARRAIANO, C. M. *BolA* Is a Transcriptional Switch That Turns Off Motility and Turns On Biofilm Development. *mBio*,v. 6(1), p. 02352–14, 2015.
- DROGUE, B.; SANGUIN, H.; BORLAND, S.; PRIGENT-COMBARET, C.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. *FEMS Microbiol Ecol*, v. 87, p. 543–555, 2014.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- EDA S.; MITSUI H.; MINAMISAWA K. Involvement of the *smeAB* multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, p. 2855–2862, 2011.
- EDA, S.; MITSUI, H.; & MINAMISAWA, K. Involvement of the *SmeAB* Multidrug Efflux Pump in Resistance to Plant Antimicrobials and Contribution to Nodulation Competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* , v. 77 (9), p. 2855-2862, 2011
- EHRENREICH, A.; FORCHHAMMER, K.; TORMAY, P.; VEPREK, B.; BOÈ CK, A. Selenoprotein synthesis in *E. coli*. Purification and characterisation of the enzyme catalysing selenium activation. *Eur. J. Biochem.*, v. 206, p. 767-773, 1992.
- ERILL, I.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response, *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31 (6), p. 637–656, 2007.
- EZRATY, B.; GENNARIS, ALEXANDRA; BARRAS, FRÉDÉRIC; COLLET, JEAN-FRANÇOIS. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, p. 385, 2017.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extrats. *Analytical Chemistry*, Wasshington, v. 49, 1080 p. 1977.
- FERRARI, C.S.; AMARAL, F.P.; BUENO, J.C.F.; SCARIOT, M. C.; VALENTIM-NETO, P. A.; ARISI, A. C. M.. Expressed Proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in Maize

- (DKB240) Roots-Bacteria Interaction Revealed Using Proteomics Appl Biochem Biotechnol., v. 174, p. 2267, 2014.
- FILLAT, M.F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. Arch Biochem Biophys., v. 546, p. 41–52, 2014.
- FINAN, T. M.; O'BRIAN, LAYZELL, M. R.; VESSEY, J. K.; NEWTON, W. Nitrogen Fixation: Global Perspectives. Wallingford, UK: CABI Publishing. 2002.
- FLORES-KIM, J. & ANDREW J. D. The Phage Shock Protein Response. Annual Review of Microbiology, v. 70, p. 83-101, 2016.
- FRAZZON, J.; FICK, J. R.; DEAN, D. R.. Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. Biochemical Society Transaction, p. 30 (4), p. 680—685, 2002.
- FREESTONE, P.; NYSTRÖM, T.; TRINEI, M.; NORRIS, V. The Universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis. Journal of Molecular Biology, v. 274 (3), p. 318-324, 1997.
- FROST, L. S.; IPPEN-IHLER, K.; SKURRAY, R. A. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. Microbiol. Rev., v. 58, p.162–210 , 1994.
- FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J., MARTÍNEZ-ROMERO. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiology Ecology, v. 29, p. 117–128, 1999.
- FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. Plant and Soil, v.154, p.145-150, 1993.
- GALLOWAY, J. N. The global nitrogen cycle: changes and consequences: Elsevier Ltd., v. 102, p. 15-24, 1998.
- GLICK, B.R. Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Springer, Heidelberg, 2015
- GRIESE, J. J.; JAKOB, R. P.; SCHWARZINGER, S.; DOBBEK, H. Xenobiotic reductase A in the degradation of quinoline by *Pseudomonas putida* 86: physiological function, structure and mechanism of 8-hydroxycoumarin reduction. J Mol Biol 361: 140–152, 2006.
- GRIGNON, C. & SENTENAC, H. pH and Ionic Conditions in the Apoplast. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 42, p. 103–128, 1991.
- GUERREIRO N., REDMOND J. W., ROLFE B. G., DJORDJEVIC M. A. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. Mol. Plant Microbe Interact.v. 10, p. 506–516, 1997.
- GUERREIRO, N.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G.; DJORDJEVIC, M. A. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. Mol. Plant Microbe Interact., v. 10, p. 506–516, 1997.
- GUILLÉN-NAVARRO, K.; ENCARNACIÓN, S.; DUNN, M.F. Biotin biosynthesis, transport and utilization in rhizobia. FEMS Microbiol. Lett., v. 246, p. 159–165, 2005.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. & JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. The Plant Cell, v. 8(10), p. 1773–1791, 1996.

- HARDOIM, P.R.; VAN, O.; VERBEEK, L.S.; VAN, E.; LSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.*, v. 16, p.463–471, 2008.
- HASLAM, R.P.; DOWNIE, A.L.; RAVETON, M.; GALLARDO, K.; JOB, D.; PALLETT, K.E.; PARRY, M.A.J.; COLEMAN, J.O.D. The assessment of enriched apoplasmic extracts using proteomic approaches. *Annals of Applied Biology*, v. 143, p. 81-91, 2003.
- HASLBECK, M.; FRANZMANN, T.; WEINFURTNER, D.; BUCHNER, J. Some like it hot: the structure and function of small heat shock proteins. *Nat Struct Mol Biol.*, v. 12, p. 842–846, 2005.
- HASSAN, Y. I.; ZEMPLINI, J. Regulação epigenética da estrutura da cromatina e função dos genes pela biotina. *J Nutr.*, v. 136, p. 1763-1765, 2006.
- Hellweg, C.; Pühler, A.; Weidner, S. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiology.*, v. 9 p. 37, 2009.
- HEMMIS, C. W.; BERKMEN, M.; ESER, M.; SCHILDBACH, J. F. TrbB from Conjugative Plasmid F Is a Structurally Distinct Disulfide Isomerase That Requires DsbD for Redox State Maintenance . *Journal of Bacteriology*, v. 193(18), p. 4588–4597, 2011.
- HEROVEN, A. K. & DERSCH, P. ROVM, a novel LysR-type regulator of the virulence activator gene *rovA*, controls cell invasion, virulence and motility of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 62, 1469–1483, 2006.
- HIROSE, N.; TAKEI, K.; KUROHA, T.; KAMADA-NOBUSADA, T.; HAYASHI, H.; SAKAKIBARA, H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.*, v. 59, p. 75–83, 2008.
- HOU, Z.; FINK, R.C.; BLACK, E.P.; SUGAWARA, M.; ZHANG, Z.; DIEZ-GONZALEZ, F.; SADOWSKY, M.J. Gene expression profiling of *Escherichia coli* in response to interactions with the lettuce rhizosphere. *J Appl Microbiol*, v.113, p. 1076–1086, 2012.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja. 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (INSS 15 16-7B1X; N 283). 2007.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). Nitrogen fixation in agriculture: forestry ecology and environment. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.25-42, 2005
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: De Bruijn F (ed) *Biological nitrogen fixation.*, v.2, p. 1005–1019, 2015.
- IGARASHI, R. Y.; SEEDFELDT, L. C. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v.38, n.4, p.351-384. 2003.
- JAMES, E. K.; REIS, V. N.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. INFECTION OF SUGAR cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, v. 45, p. 757-766, 1994.
- JAMES, E.K. & OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev.Plant Sci.*, v. 17, p. 77-119, 1997.

- JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MANTHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 15, p. 894-906, 2002.
- KADOWAK, M.A.S.; MÜLLER-SANTOS, M.; REGO, F.G.M.; SOUZA, E.M.; YATES, M.G.; MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S.; STEFFENS, M.B.R. Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. *BMC Microbiology*, v. 11, p. 230, 2011.
- KAHNERT, A., KERTESZ, M. A. Characterization of a sulfur-regulated oxygenative alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 31661-31667, 2000.
- KANAI, T.; TAKAHASHI, K.; INOUE, H. Three Distinct-Type Glutathione S-Transferases from *Escherichia coli* Important for Defense against Oxidative Stress. *J Biochem*, v. 140 (5);703-11, 2006.
- KERTESZ, M. A.; MIRLEAU, P. The role of microbes in plant sulphur supply. *J. Exp. Bot.* v. 55, p. 1939–1945, 2004.
- KIM, H. S.; PARK, H.J.; HEU, S.; JUNG, J. Molecular and functional characterization of a unique sucrose hydrolase from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *J Bacteriol*, v. 186, p. 411–418, 2004.
- KIMBREL, J. A.; DI, Y.; CUMBIE, J. S.; CHANG, J. H. RNA-Seq for Plant Pathogenic Bacteria. *Genes*, v. 2(4), p. 689–705, 2011.
- KOCH, D. J.; RÜCKERT, C.; REY, D. A.; MIX, A.; PÜHLER, A.; KALINOWSKI, J. Role of the *ssu* and *seu* Genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in Utilization of Sulfonates and Sulfonate Esters as Sulfur Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71(10), p. 6104–6114, 2005.
- KOEBNIK R. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol.*, v. 13, p. 343–7, 2005.
- KÖRNER, H.; HEIDI J. SOFIA, H. J.; ZUMFT, W. G. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs, *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, p. 559-592, 2003.
- KROJER, T.; PANGERL, K.; KURT, J.; SAWA, J.; STINGL, C.; MECHTLER, K.; HUBER, R.; EHRMANN, M.; CLAUSEN, T. Interplay of PDZ and protease domain of DegP ensures efficient elimination of misfolded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105(22), p. 7702–7707, 2008.
- KUCZYNSKA-WISNIK, D.; KÇDZIERSKA, S.; MATUSZEWSKA, E.; LUND, P.; TAYLOR, A.; LIPINSKA, B.; LASKOWSKA, E. The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. *Microbiology*, v. 148(6), p. 1757-1765, 2002.
- KUMSTA, C. & JAKOB, U. Redox-Regulated Chaperones. *Biochemistry*, v. 48, n. 22, p. 4666–4676, 2009.
- KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74(23), p. 7376–7382, 2008.

- LERY, L. M. S.; HEMERLY, A. S.; NOGUEIRA, E. M.; VON KRÜGER, W. M. A.; BISCH, P. M. Quantitative Proteomic Analysis of the Interaction Between the Endophytic Plant-Growth-Promoting Bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. May 2011, v. 24, n. 5, p. 562-576, 2011.
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biol. Biochem.* 19, 165-170, 1987.
- LIN, J.; WILSON, M.A.; *Escherichia coli* Thioredoxin-like Protein YbbN Contains an Atypical Tetratricopeptide Repeat Motif and Is a Negative Regulator of GroEL. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286(22), p. 19459-19469, 2011.
- LIN, S-Y.; HAMEED, A.; SHEN, F-T.; LIU, Y-C.; Hsu, Y-H.; SHAHINA, M.; LAI, W-A.; YOUNG 77, C-C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a 78 fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum 79 irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* as 80 *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, p. 1149–1162, 2014.
- LINDEMANN, A.; KOCH, M.; PESSI, G.; MÜLLER A. J.; BALSIGER, S.; HENNECKE, H.; FISCHER, H-M. Host-specific symbiotic requirement of BdeAB, a RegR-controlled RND-type efflux system in *Bradyrhizobium japonicum*, *FEMS Microbiology Letters*, v. 312, p. 184-191, 2010.
- LLEWELLYN, M.; DUTTON, R. J.; EASTER, J.; O'DONNOL, D.; GOBER, J. W. The conserved *flaF* gene has a critical role in coupling flagellin translation and assembly in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*, v. 54 (4), p. 1127-1142, 2005.
- LOBANOV, A. V.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteínas e Selenoproteínas Eucariotas. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1790 (11), p. 1424-1428, 2009.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, v. 15(12), p. 550, 2014.
- LUECKE, H.; QUIOCHO, F. A. High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature Publishing Group*, v. 347, p. 402, 1990.
- MADDOCKS, S. E.; OYSTON, P. C. F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiol-SGM* 154: 3609–3623, 2008.
- MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MAGNUSON, K.; JACKOWSKI, S.; ROCK, C.O.; CRONAN JR.; J.E. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol*, v. 57, p. 522–542, 1993.
- MAO, Y-H.; JIN, F-L.; CHENG MA, Z H.; WANG H-H. *Sinorhizobium meliloti* Functionally Replaces 3-Oxoacyl-Acyl Carrier Protein Reductase (FabG) by Overexpressing NodG During Fatty Acid Synthesis *Molecular Plant-Microbe Interactions*., v. 29, p. 458-467, 2016.
- MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON R. The NifL-NifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. *J. Bacteriol.* v.186, p. 601–10, 2004a.

- MARTÍNEZ-FLORES, I.; CANO, R.; BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. The ompB Operon Partially Determines Differential Expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 181(2), p. 556–562, 1999.
- MASSIÈRE, F. & BADET-DENISOT, The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases MA. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, v. 54, p. 205, 1998.
- MATHIAS, A. L.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S., PEDROSA, F. O. L-arabinose metabolism in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Bacteriology*, v. 171(9), p. 5206–5209, 1989.
- MATSUI, M.; TOMITA, M.; KANAI, A. Comprehensive Computational Analysis of Bacterial CRP/FNR Superfamily and Its Target Motifs Reveals Stepwise Evolution of Transcriptional Networks, *Genome Biology and Evolution*, v. 5 (2), p. 267–282, 2013.
- MATSUMURA, K.; FURUKAWA, S.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. *Biocontrol Sci.*, v. 16(2), p. 69-72, 2011.
- MATUSIHITA, N.; SOGAWA, K.; EMA, M.; YOSHIDA, A.; FUJII-KURIYAMA, Y. A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-4501A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins Ah receptor and Arnt. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 21002-6, 1993.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; WELINGTON, L. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, p. 7259–7267, 2007.
- MICHIELS, K.; CROES, C.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Apospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol*, v. 37, p. 2241-2246, 1991.
- MILLER-WILLIAMS, M.; LOEWEN, P. C.; ORESNIK, I. J. Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. *Microbiology*, v. 15, p. 2049-2059, 2006.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v.5, n.1, p.62-71, 2001.
- MITCHELL, H. T. Microdetermination of nitrogen in plant tissue. *Journal of Association Official Agriculture, Gaithersburg*, v. 55, p. 1-3, 1972.
- MOORE, S.; J. Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide As Solvent for the Ninhydrin Reaction *Biol. Chem.* 1968, v. 243, p. 6281, 1968.
- MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*, v. 5, p. 621-628, 2008.
- MOSKOVITZ, J.; RAHMAN, M. A.; STRASSMAN, J.; YANCEY, S. O.; KUSHNER, S. R.; BROTH, N.; WEISSBACH, H. *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol.*, v. 177(3);502-7, 1995.
- MULLER, J. F.; STEVENS, A. M.; CRAIG, J.; LOVE, N. G. Transcriptome Analysis Reveals that Multidrug Efflux Genes Are Upregulated To Protect *Pseudomonas aeruginosa* from Pentachlorophenol Stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, n. 14, p. 4550-558, 2007.

- MULLINS, E.; FRANCOIS, J.A.; KAPPOCK, T.J. A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA):acetate CoAtransferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti*. *J Bacteriol*, v. 190, p. 4933–4940, 2008.
- MULLINS, E.A.; KAPPOCK, T.J. SFunctional analysis of the acetic acid resistance (aar) gene cluster in *Acetobacter aceti* strain 1023. *Acetic Acid Bacteria 2(s1):e3*, 2013.
- MURAD, A. M.; LAUMANN, R. A.; LIMA, T. DE A.; SARMENTO, R. B.; NORONHA, E. F.; ROCHA, T. L.; VALADARES- INGLIS, M. C.; FRANCO. O. L. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*, v. 142, p. 365–370, 2006.
- NACHIN, L.; NANNMARK, U .; NYSTRÖM, T. Differential functions of *Escherichia coli* universal stress proteins in resistance to oxidative stress, adhesion and motility. *Journal of Bacteriology*, v. 187 (18), p. 6265-6272, 2005.
- NANJO, Y.; SKULTETY, L.; UVAĆ KOVA, L.; KLUBICOVA', K.; HAJDUCH, M.; KOMATSU, S. Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *J. Proteome Res.*, v. 11, p. 372–385, 2012.
- NATALE, P.; BRUSER, T.; DRIESSEN, A. J. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochim Biophys Acta*. v. 1778 (9), p. 1735-56, 2008.
- NEUHAUS, F.C. & BADDILEY J. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in grampositive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.*, v. 67, p. 686–723, 2003.
- NEVES, M. F.; TROBIN, V. G.; CONSOLI M. O mapa sucroenergético do Brasil. In: Souza, E. L. L; Macedo, I. Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. São Paulo: LUC projetos de Comunicação (Editora), Cap. 2, p. 14 -43, 2010.
- NOGUEIRA, E.M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.P.; VARGAS, C.; DE PÁDUA, V.L.M.; DA SILVA, F.R.; DOS SANTOS R.V.; BALDANI J.I.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Expression of sugar cane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubridubalbicans*. *Genetic and Molecular Biology*, v. 24, p. 199-206, 2001.
- NOINAJ, N.; GUILLIER, M.; BARNARD, T. J.; BUCHANAN, S. K. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annual Review of Microbiology*, v. 64,p. 43–60, 2011.
- NOVICK, N. J. & TYLER, M. E. L-arabinose metabolism in *Azospirillum brasiliense*. *Journal of Bacteriology*, v. 149(1), p. 364–367, 1982.
- NYSTRÖM, T.; & NEIDHART, F. C. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol. Microbiol.*, v. 11, p. 537-544, 1994.
- OLIVEIRA, A. L.; M, URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil*, v. 242, p. 205–215, 2002.
- OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S., REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil*, v.284, p.230-32, 2006.

- ORLANDO-FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO JR, E. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana de açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo. Planalsucar. Piracicaba. SP, p. 128, 1980. (Boletim Técnico nº2).
- OUTTEN, F. W. & THEIL, E. C. Iron-Based Redox Switches in Biology. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.11, n.5, p. 1029–1046, 2009.
- OUTTEN, F. W.; DJAMAN, O.; STORZ, G. A *suf* operon requirement for Fe–S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, v. 52, p. 861–872, 2004.
- OZSOLAK, F.; PLATT, A. R.; JONES, D.R.; REIFENBERGER, J. G.; SASS, L. E.; MCINERNEY, P.; THOMPSON, J. F.; BOWERS, J.; JAROSZ, M.; MILOS, P. M. Direct RNA sequencing. *Nature*, v. 461, p. 814–818, 2009.
- PAPANIKOU, E.; KARAMANOU, S.; ECONOMOU, A. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews Microbiology*. v. 5 : p. 839–851, 2007.
- PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; LONHIENNE, T. G. A.; YEOH, Y. K.; DONOSE, B. C.; WEBB, R. I.; PARSONS, J.; LIAO, W.; SAGULENKO, E.; LAKSHMANAN, P.; HUGENHOLTZ, P.; SCHMIDT, S.; RAGAN, M. A. Crosstalk between sugarcane and a plant-growth promoting Burkholderia species. *Scientific Reports*, v. 6, 2016.
- PEREZ- BUENO, M. L.; RAHOUTEI, J.; SAJNANI, C.; GARCIA- LUQUE, I.; BARON, M. Proteomic analysis of the oxygen- evolving complex of photosystem II under biotic stress: studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomics*, v. 4, p. 418–425, 2004.
- POLESE, V. O líquido do apoplasto de cana-de-açúcar modulando a expressão de genes na bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103. Seropédica, 2017, 148 p. (Tese de doutorado).
- POTRICH, D. P.; PASSAGLIA, L. M.; SCHRANK, I. S. Partial characterization of *nif* genes from the bacterium *Apospirillum amazonense*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34: 1105–1113, 2001.
- PY, B.; MOREAU, P.L.; BARRAS, F. Fe-S clusters, fragile sentinels of the cell. *Curr Opin Microbiol*. Apr; v. 14(2), p. 218–23, 2011.
- RACZKOWSKA, A.; TRZOS, J.; LEWANDOWSKA, O.; NIECKARZ, M.; BRZOSTEK, K. Expression of the AcrAB Components of the AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump of *Yersinia enterocolitica* Is Subject to Dual Regulation by OmpR. *PLoS ONE*, v. 10(4), p. e0124248, 2015.
- RADFORD, S.E. GroEL: More than just a folding cage. *Cell*, v. 125 (5), p. 831 – 833, 2006.
- RATAJCZAK, E.; ZIETKIEWICZ, S.; LIBEREK, K. Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. *J Mol Biol.*, v. 386, p. 178–189, 2009.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E.. *Biologia Vegetal*, 7^a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.
- REEVE, W. G.; TIWARI, R. P.; WONG, C. M.; DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium mefifoti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology*, v. 144, p. 3335–3342, 2008.

REHM, BERND H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, p. 578, 2010

REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* v. 6, p. 139–144, 1998.

REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F. DA.; HIPÓLITO, G.; OLIVEIRA, G. P.; MORAES, R. F.; LEITE, J. M.; NIVALDO, S. Eficiência agrônômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 22, 2009a.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadores 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* (BR11366). Circular técnica 30, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, 2009.

REIS, V.M.; PITARD, R. M.; DOURADO, F. S.; CAMACHO, N. N.; VIDEIRA, S. S.; CAMARGO, A. B.; BOA SORTE, P. F.; VIDAL, M. S.; SCHWAB, S.; BALDANI, J. I. Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 31, (Embrapa agrobiologia. Documentos, 280). ISSN: 1517-8498, 2013.

REIS, V.W.; OLIVARES, F. L.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biochemistry*, v. 10, p. 401-405, 1994.

ROBINSON, C.; BOLHUIS, A. Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, v. 1694(1–3), p. 135–147, 2004.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, v. 26(1), p. 139–140, 2010.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil*, v. 302, p. 249–261, 2008.

ROMEIRO, R. S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Roteiro das aulas práticas. 2001.

RONSON, C. W.; ASTWOOD, P. M.; DOWNIE, J. A. Molecular cloning and genetic organization of C4-dicarboxylate transport genes from *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*, v. 160(3), p. 903–909, 1984.

ROSEN, R.; SACHER, A.; SHECHTER, N.; BECHER, D.; BUTTNER, K.; BIRAN, D.; HECKER, M.; RON, E. Z. Two dimensional reference map of *Agrobacterium tumefaciens* proteins. *Proteomics*, v. 4, p. 1061–1073, 2004.

ROSENBLUETH, M., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and heir interactions with hosts. *Molec. Plant Microbe Interact*, v. 19, p. 827–837, 2006.

SAIBIL, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 14, n.10, p. 630–642, 2013.

- SALAH UD-DIN, A.I.M.; ROUJEINIKOVA, A. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *A. Cell. Mol. Life Sci.* v. 74, p. 3293, 2017.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência na utilização de uréia (15N) em aplicação única ou parcelada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 19, p. 943-949, 1984.
- SANT'ANNA, F. H.; ALMEIDA, L. G. P.; CECAGNO, R.; REOLON, L. A.; SIQUEIRA, F. M.; MACHADO, M. R. S.; VASCONCELOS, A. T. R.; SCHRANK, I. S. Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMG Genomics*, v. 12, p. 409-422, 2011.
- SANYAL, I.; COHEN, G.; FLINT, D. H. Biotin Synthase Purification, Characterization as a [2Fe-2S] Cluster Protein, and in vitro Activity of the Escherichia coli bio B Gene Product. *Biochemistry*, v. 33, p. 3625-3621, 1994.
- SAUER, F. G.; KNIGHT, S. D.; WAKSMAN, G. J., HULTGREN, S. J. PapD-like chaperones and pilus biogenesis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 11, Issue 1, 2000, Pages 27-34,
- SCHNEIDER, G.; LINDQUIST, Y. Structural enzymology of biotin biosynthesis. *FEBS Lett.*, v. 495, p. 7-11, 2001.
- SCHUHMACHER J. S.; THORMANN K. M.; BANGE G. How bacteria maintain location and number of flagella? *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 39, p. 812-822, 2015.
- SCHULTZ, N.; MORAIS, R.F. de; SILVA, J.A. da; BAPTISTA, R.B.; OLIVEIRA, R.P.; LEITE, J.M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J.B.; ALVES, B.J.R.; BALDANI, J.I.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Avaliação agronômica de duas variedades de cana de açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, p.261-268, 2012.
- SCHWAB, S.; TERRA, L.A.; BALDANI, J. I. Genomic characterization of *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC, a nitrogen-fixing bacterium isolated from surface-sterilized sugarcane stems. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 293 (4), p. 997-1016, 2018.
- SHIMIZU, K. Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites*, v. 4(1), p. 1-35, 2014.
- SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, v. 5, p. 9-23, 1993.
- SHROUT, J. D.; CHOPP, D. L.; JUST, C. L.; HENTZER, M.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. R. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, v. 62, p. 1264-1277, 2006.
- SHUKLA, S.K.; YADAV, R.L.; SUMAN, A.; SINGH, P.N. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in *udic ustochrept* soil. *Soil and Tillage Research*, v.99, p.158-168, 2008.
- SILVA, P.R.A. O líquido apoplástico de cana-de-açúcar modula o perfil transcriptômico global da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica in vitro*. Seropédica: UFRRJ, 2016, 165 p. (Tese de doutorado).
- SINGH, K.P.; SUMAN, A.; SINGH, P.N.; LAL, M. Yield and soil nutrient balance of sugarcane plant-ratoon system with conventional and organic nutrient management in subtropical India. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.79, p.209-219, 2007.

- STREIT, W.; ENTCHEVA, P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 61, p. 21–31, 2003.
- SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M.; SHAHI, H.N.; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.17, p.39-45, 2001.
- TAKAHASHI, S.; WATANABE, R.; FUKUSHIMA, Y.; FUJITA, N.; NOGUCHI, A.; YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K.; NISHINO, T.; NAKAYAMA, T. An isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics, and cellular localization. *J Biol Chem.*, v. 281(40), p. 30251-9, 2006.
- TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; CAMILIOS-NETO, D.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.; BALSANELLI, E.; WEISS, V.; BAURA, V. A.; WASSEN, R.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. DE O.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A. Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenin. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 491., 2015
- TAKESHIMA, K.; HIDAKA, T.; WEI, M.; YOKOYAMA, T.; MINAMISAWA, K.; MITSUI, H.; ITAKURA, M.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SAEKI, K.; OOMORI, H.; TAJIMA, S.; UCHIUMI, T.; ABE, M.; TOKUJI, Y.; OHWADA, T. Involvement of a Novel Genistein-Inducible Multidrug Efflux Pump of *Bradyrhizobium japonicum* Early in the Interaction with *Glycine max* (L.) Merr. *Microbes and Environments*, v. 28(4), p. 414–421, 2013.
- TATSUKAMI, Y.; NAMBU, M.; MORISAKA, H.; KURODA, K.; UEDA, M. Disclosure of the differences of *Mesorhizobium loti* under the free-living and symbiotic conditions by comparative proteome analysis without bacteroid isolation. *BMC. Microbiol.* v. 13, p. 180, 2013.
- TEJERA, N.; ORTEGA, E.; ROBES, R.; LLUNCH, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes. *Journal of Plant Physiology*, v. 163, p. 80-85, 2006.
- TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L. & RODRIGUES, J.C.S. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-15N e uréia-15N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. *Pesq. Agropec. Bras.*, 30:1375-1385, 1995.
- TROXELL, B.; HASSAN, H. M. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, v. 3, p. 59, 2013.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. *Plant and Soil*, v.152, p.131-138, 1993.
- TSENG, T.-T.; TYLER, B.M.; SETUBAL, J.C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology* , v. 9 (Suppl. 1), 2009.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

- URQUIAGA, S.; LIMA, R. de M.; XAVIER, R. P.; RESENDE, A. S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Avaliação da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio em diferentes variedades de cana-de-açúcar. *Agronomia, Seropédica*, v. 37, n. 1, p. 53-58, 2003.
- URQUIAGA, S.; XAVIER, R.P.; MORAIS, R.F. de; BATISTA, R.B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; SÁ, J.M. e; BARBOSA, K.P.; RESENDE, A.S. de; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data of the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant and Soil*, v.356, p.5-21, 2012
- VAN DER PLOEG, J. R.; CUMMINGS, N. J.; LEISINGER, T.; CONNERTON, I. F. *Bacillus subtilis* genes for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates. *Microbiology*, v. 144, p. 2555-2561, 1998.
- VAN DER PLOEG, J. R.; IWANICKA-NOWICKA, R.; BYKOWSKI, T.; HRYNIEWICZ, M.M.; LEISINGER, T. The *Escherichia coli* *ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 29358-29365, 1999.
- VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGAO, F. A. S. de. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: Embrapa Agroindústria Tropical. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 87, 2013
- VERCRUYSSSE, M.; FAUVART, M.; BEULLENS, S.; BRAEKEN, K.; CLOOTS, L.; ENGELEN, K.; MARCHAL, K.; MICHIELS, J.. A comparative Transcriptome Analysis of *Rhizobium etli* Bacteroids : Specific Gene Expression During Symbiotic Nongrowth. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24(12), p. 1553-1561, 2011.
- VITOUSEK, P. M.; MOONEY, H. A.; LUBCHENCO, J.; MELILLO, J. M. Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science*, p. 277-494, 1997.
- VITTI, A.C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; ROSSETO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de; LANDELL, M.G. de A. Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agronômico, p.239-269, 2008.
- VITTI, A.C.; FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FERREIRA, D.A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C.E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, p.287-293, 2011.
- VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, p. 149-167, 2008.
- WALTER, W.; SÁNCHEZ-CABO, F.; RICOTE, M. GOplot: na R package for visually combining expression. Data with functional analysis. *Bioinformatics*, v. 31, p. 2912-4, 2015.
- WELBAUM, G. E. & MEINZER, F. C. Compartmentation of Solutes and Water in Developing Sugarcane Stalk Tissue . *Plant Physiology*, v. 93(3), p. 1147-1153, 1990.
- WINTER, J.; LINKE, K.; JATZEK, A.; JAKOB, U. Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol Cell*, v. 17(3), p. 381-92, 2005.
- WU, Y. & OUTTEN, F. W. IscR Controls Iron-Dependent Biofilm Formation in *Escherichia coli* by Regulating Type I Fimbria Expression . *Journal of Bacteriology*, v.191(4), p. 1248-1257, 2009.
- YADAV, R.L.; SUMAN, A.; PRASAD, S.R.; PRAKASH, O. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane

cultivation under subtropical climatic conditions of India. *European Journal of Agronomy*, v.30, p.296-303, 2009

YANG, J.; KLOPPER, J.W.; RYU, C.-M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14, 1–4, 2009.

YEO, W.; LEE, J.; LEE, K.; ROE, J. IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe- S assembly proteins. *Molecular Microbiology*, v. 61 p. 206-218, 2006.

YEUNG, N.; GOLD, B.; LIU, N. L.; PRATHAPAM, R.; STERLING, H. J.; WILLAMS, E. R.; BUTLAND, G. The *E. coli* Monothiol Glutaredoxin GrxD Forms Homodimeric and Heterodimeric FeS Cluster Containing Complexes . *Biochemistry*, v. 50, n.41, p. 8957–8969, 2011.

YOSHIZAWA S. & BÖCK A. The many levels of control on bacterial selenoprotein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1790, p. 1404–1414, 2009.

YUAN, J.; WEI, B.; SHI, M.; GAO, H. Functional Assessment of EnvZ/OmpR Two-Component System in *Shewanella oneidensis*. *PLoS ONE*, v. 6(8), 2011.

ZHANG, Y.-M.; C. O. Rock. Membrane lipid homeostasis in bacteria *Nat. Rev. Microbiol*, v. 6, p. 222-233, 2008.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; CAMPO, R. J.; GIANLUPPI, V.; HUNGRIA, M. Avaliação da fixação biológica do nitrogênio na soja em áreas de primeiro cultivo no cerrado de Roraima. *Boa vista: Embrapa Roraima*. 9p. (Comunicado Técnico nº 20), 2006.

9. ANEXOS

Anexo A: Transcritos e proteínas diferencialmente expressos em *N. amazonense* estirpe CBAmC na presença do fluido de apoplasto da cana-de-açúcar RB867515

Código do Locus	gene	Descrição	COG Classe	COG Descrição	Transcriptômica Mudança de expressão	Proteômica Mudança de expressão
Y958_RS21430		hypothetical protein	A	RNA processing and modification	4,00	
Y958_RS00105		malonic semialdehyde reductase	C	Energy production and conversion	7,48	
Y958_RS00410		GNAT family N-acetyltransferase	C	Energy production and conversion	-5,49	
Y958_RS00585		nitric oxide dioxygenase	C	Energy production and conversion	3,14	
Y958_RS00660		hypothetical protein	C	Energy production and conversion	2,96	1,55
Y958_RS00665		aldehyde oxidase	C	Energy production and conversion	2,40	
Y958_RS01345		2,4-dienoyl-CoA reductase	C	Energy production and conversion	6,49	
Y958_RS03520		SUF system NifU family Fe-S cluster assembly protein	C	Energy production and conversion	5,96	
Y958_RS03645		aldo/keto reductase	C	Energy production and conversion	2,52	
Y958_RS03845		F0F1 ATP synthase subunit A	C	Energy production and conversion	2,59	
Y958_RS03855		F0F1 ATP synthase subunit B'	C	Energy production and conversion	2,46	
Y958_RS06150		isocitrate dehydrogenase (NADP(+))	C	Energy production and conversion	3,20	
Y958_RS06160		Cytochrome c556	C	Energy production and conversion		-1,99
Y958_RS06215	ccoO	cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit II	C	Energy production and conversion	-52,14	
Y958_RS06225	ccoP	cytochrome-c oxidase, cbb3-type subunit III	C	Energy production and conversion	-13,66	
Y958_RS06230	ccoG	cytochrome c oxidase accessory protein CcoG	C	Energy production and conversion	-8,06	
Y958_RS06530		cytochrome B	C	Energy production and conversion	-7,43	
Y958_RS06575		succinate-semialdehyde dehydrogenase	C	Energy production and conversion	-21,72	
Y958_RS06705		excisionase	C	Energy production and conversion	2,84	
Y958_RS07205	hppA	sodium-translocating pyrophosphatase	C	Energy production and conversion	-2,53	

Y958_RS07660		aldehyde dehydrogenase family protein	C	Energy production and conversion	5,32	
Y958_RS08310		molybdopterin-binding oxidoreductase	C	Energy production and conversion	-2,83	
Y958_RS09010		FAD-linked oxidase	C	Energy production and conversion	-4,73	
Y958_RS09275		LLM class flavin-dependent oxidoreductase NAD(P)(+) transhydrogenase (Re/Si-specific)	C	Energy production and conversion	12,42	21,57
Y958_RS09350		subunit alpha	C	Energy production and conversion	-2,18	
Y958_RS09355		hypothetical protein	C	Energy production and conversion	-2,45	
Y958_RS09360		NAD synthetase	C	Energy production and conversion	-2,04	
Y958_RS09850		alkene reductase	C	Energy production and conversion	6,19	2,38
Y958_RS10230		cytochrome c	C	Energy production and conversion	-3,85	
Y958_RS10235		cytochrome b	C	Energy production and conversion	-3,27	
Y958_RS10280		cytochrome C	C	Energy production and conversion	-7,55	
Y958_RS10655		cytochrome c oxidase subunit 3	C	Energy production and conversion	-3,19	
Y958_RS10675	ctaD	cytochrome c oxidase subunit I	C	Energy production and conversion	-3,57	
Y958_RS10805		dihydrolipoyl dehydrogenase	C	Energy production and conversion	4,83	1,60
Y958_RS10810		dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	C	Energy production and conversion	2,62	
Y958_RS10815		2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	C	Energy production and conversion	2,45	
Y958_RS11175		indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase	C	Energy production and conversion	-7,90	
Y958_RS11210		F0F1 ATP synthase subunit delta	C	Energy production and conversion	2,14	
Y958_RS12165		dicarboxylate/amino acid:cation symporter	C	Energy production and conversion	-2,48	
Y958_RS13320		aldo/keto reductase	C	Energy production and conversion	3,81	
Y958_RS13785		isocitrate lyase	C	Energy production and conversion	3,52	
Y958_RS15925		acetate kinase	C	Energy production and conversion	-4,85	
Y958_RS15930		phosphate acetyltransferase	C	Energy production and conversion	-4,12	
Y958_RS16050		aldehyde dehydrogenase (NADP(+))	C	Energy production and conversion	8,22	2,70
Y958_RS16160		nitrite reductase large subunit	C	Energy production and conversion		1,66
Y958_RS16390	cyoD	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	C	Energy production and conversion	2,09	
Y958_RS16405		ubiquinol oxidase subunit II	C	Energy production and conversion		1,56
Y958_RS16910		hypothetical protein	C	Energy production and conversion	-36,65	
Y958_RS16915		malate dehydrogenase	C	Energy production and conversion	-6,84	
Y958_RS18095	gor	glutathione-disulfide reductase	C	Energy production and conversion	5,69	
Y958_RS18510	gabD	succinate-semialdehyde dehydrogenase (NADP(+))	C	Energy production and conversion	10,77	
Y958_RS18880	fdxH	formate dehydrogenase subunit beta	C	Energy production and conversion	7,46	
Y958_RS18885	fdnG	formate dehydrogenase-N subunit alpha	C	Energy production and conversion	5,85	
Y958_RS18890		molybdopterin oxidoreductase	C	Energy production and conversion	3,94	
Y958_RS18965		NADH:flavin oxidoreductase	C	Energy production and conversion		4,35

Y958_RS18990		electron transfer flavoprotein subunit alpha	C	Energy production and conversion	-4,67	
Y958_RS18995		electron transfer flavoprotein subunit beta	C	Energy production and conversion	-6,01	
Y958_RS19165		S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase/class III alcohol dehydrogenase	C	Energy production and conversion	5,13	
Y958_RS19445		hypothetical protein	C	Energy production and conversion	-2,79	
Y958_RS19590		propionyl-CoA--succinate CoA transferase	C	Energy production and conversion	127,98	
Y958_RS19595		tryptophan halogenase	C	Energy production and conversion	4,28	
Y958_RS19990		hypothetical protein	C	Energy production and conversion	-9,07	
Y958_RS20360		transketolase	C	Energy production and conversion	4,60	
Y958_RS21295		tryptophan halogenase	C	Energy production and conversion	-2,41	
Y958_RS21550		cytochrome C	C	Energy production and conversion	-33,23	
Y958_RS21760		hypothetical protein B12-binding domain-containing radical SAM protein	C	Energy production and conversion	9,69	
Y958_RS22095		protein	C	Energy production and conversion	-2,81	
Y958_RS22510		formate dehydrogenase subunit gamma	C	Energy production and conversion	2,28	
Y958_RS22515		formate dehydrogenase	C	Energy production and conversion	2,60	
Y958_RS22525		sulfurtransferase FdhD	C	Energy production and conversion	2,98	
Y958_RS22745		cytochrome B	C	Energy production and conversion	5,71	
Y958_RS22780		12-oxophytodienoate reductase	C	Energy production and conversion	6,17	
Y958_RS23190		L-lactate permease	C	Energy production and conversion	-2,72	
Y958_RS23290		fumarate hydratase	C	Energy production and conversion	2,37	
Y958_RS23455		oxidoreductase	C	Energy production and conversion	3,63	
Y958_RS23470		formamidase	C	Energy production and conversion	-4,78	
Y958_RS23495		LLM class flavin-dependent oxidoreductase	C	Energy production and conversion	-3,93	
Y958_RS24295		pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	C	Energy production and conversion	-8,28	
Y958_RS24320		cytochrome d terminal oxidase subunit I	C	Energy production and conversion	-2,93	
Y958_RS24325	cydB	cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	C	Energy production and conversion	-3,45	
Y958_RS24690		xanthine dehydrogenase	C	Energy production and conversion	-2,28	
Y958_RS24955	nosZ	nitrous-oxide reductase	C	Energy production and conversion	-9,75	
Y958_RS24960		4Fe-4S binding protein	C	Energy production and conversion	-3,37	
Y958_RS25630		hypothetical protein	C	Energy production and conversion	3,26	
Y958_RS25635		aldehyde oxidase	C	Energy production and conversion	2,44	
Y958_RS25765	ssuD	alkanesulfonate monooxygenase, FMNH(2)-dependent	C	Energy production and conversion	-6,63	-1,58
Y958_RS26895		nitroreductase	C	Energy production and conversion	-10,51	
Y958_RS27185		aldehyde dehydrogenase family protein	C	Energy production and conversion	3,37	
Y958_RS28405		pseudoazurin	C	Energy production and conversion	-9,50	

Y958_RS29550		alcohol dehydrogenase	C	Energy production and conversion	-5,73	
Y958_RS30415		tryptophan halogenase	C	Energy production and conversion	-3,43	
Y958_RS31075		cytochrome c protein	C	Energy production and conversion	-18,85	
Y958_RS31090		cytochrome c family protein	C	Energy production and conversion	-4,08	-2,38
Y958_RS06140	icd	isocitrate dehydrogenase	CE	Multiple classes	3,31	
Y958_RS29130		oxidoreductase	CP	Multiple classes	17,02	
Y958_RS05625		NADPH:quinone reductase	CR	Multiple classes	5,40	
Y958_RS09860		NAD(P)H-quinone oxidoreductase	CR	Multiple classes	18,52	
Y958_RS18865		NADPH:quinone reductase	CR	Multiple classes	3,61	
Y958_RS30595		NADPH:quinone oxidoreductase	CR	Multiple classes	-9,17	
Y958_RS00255		tRNA uridine-5-carboxymethylaminomethyl(34) synthesis enzyme MnmG	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	2,61	
Y958_RS03370		Fe-S-binding ATPase	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	3,23	
Y958_RS08955		MinD/ParA family protein	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-7,47	
Y958_RS10040	ftsA	cell division protein FtsA	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-2,25	
Y958_RS10045		cell division protein FtsZ	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	-3,85	-1,63
Y958_RS14310		cobyrinic acid a,c-diamide synthase	D	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	2,10	-1,57
Y958_RS17025	maf	septum formation protein Maf	D	chromosome partitioning	3,03	
Y958_RS00155	metZ	O-succinylhomoserine sulfhydrylase	E	Amino acid transport and metabolism	2,69	
Y958_RS00375		nitrogen regulatory protein P-II 1	E	Amino acid transport and metabolism	6,04	
Y958_RS00425		hypothetical protein	E	Amino acid transport and metabolism	4,46	
Y958_RS00695		lysine 2,3-aminomutase	E	Amino acid transport and metabolism	2,94	
Y958_RS00700		peptidase	E	Amino acid transport and metabolism	-5,08	
Y958_RS01150		shikimate kinase	E	Amino acid transport and metabolism	2,48	
Y958_RS01580		aspartate kinase	E	Amino acid transport and metabolism	2,73	
Y958_RS01910	argB	acetylglutamate kinase	E	Amino acid transport and metabolism	2,54	
Y958_RS02500	eat	ethanolamine permease	E	Amino acid transport and metabolism	-3,98	
Y958_RS02610		ABC transporter permease	E	Amino acid transport and metabolism	-4,05	
Y958_RS03050	rocD	ornithine--oxo-acid transaminase	E	Amino acid transport and metabolism	3,99	
Y958_RS03210		pyrroline-5-carboxylate reductase	E	Amino acid transport and metabolism	3,06	
Y958_RS03475		aminopeptidase N	E	Amino acid transport and metabolism	-4,29	
Y958_RS03490		threonine aldolase	E	Amino acid transport and metabolism	7,16	
Y958_RS03525		cysteine desulfurase	E	Amino acid transport and metabolism	6,68	1,95

Y958_RS03625		chorismate synthase	E	Amino acid transport and metabolism	3,52	
Y958_RS03920		hypothetical protein	E	Amino acid transport and metabolism	-6,72	
Y958_RS04155	metF	methylenetetrahydrofolate reductase [NAD(P)H]	E	Amino acid transport and metabolism	-6,58	
Y958_RS04535		peptidase S10	E	Amino acid transport and metabolism	-4,32	
Y958_RS05255		transglutaminase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,01	
Y958_RS05760		peptidase S10	E	Amino acid transport and metabolism	-3,09	
Y958_RS05790		hypothetical protein O-acetylhomoserine	E	Amino acid transport and metabolism	-3,76	
Y958_RS06345		aminocarboxypropyltransferase	E	Amino acid transport and metabolism	-4,41	
Y958_RS06890		peptidase S10	E	Amino acid transport and metabolism	-3,22	
Y958_RS07665		saccharopine dehydrogenase	E	Amino acid transport and metabolism	13,28	
Y958_RS07695		transglutaminase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,82	
Y958_RS07875		prolyl oligopeptidase	E	Amino acid transport and metabolism	3,94	
Y958_RS08690		agmatine deiminase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,45	-1,52
Y958_RS08695		putrescine ABC transporter permease PotI polyamine ABC transporter substrate-binding protein	E	Amino acid transport and metabolism	-3,63	
Y958_RS08710			E	Amino acid transport and metabolism	-2,77	
Y958_RS09300		D-amino-acid oxidase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,37	
Y958_RS09375		X-Pro aminopeptidase	E	Amino acid transport and metabolism	3,60	
Y958_RS09675	ggt	gamma-glutamyltransferase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,42	-1,50
Y958_RS10275		flavin monoamine oxidase	E	Amino acid transport and metabolism	-11,35	
Y958_RS10370		cystathionine beta-lyase	E	Amino acid transport and metabolism	2,05	
Y958_RS10870		aspartate-semialdehyde dehydrogenase	E	Amino acid transport and metabolism	2,54	
Y958_RS10985		diaminopimelate epimerase	E	Amino acid transport and metabolism	3,20	
Y958_RS11855		hypothetical protein	E	Amino acid transport and metabolism	3,78	
Y958_RS11905		X-Pro dipeptidase	E	Amino acid transport and metabolism	-3,71	
Y958_RS13325		arylesterase	E	Amino acid transport and metabolism	7,03	
Y958_RS13430	trpB	tryptophan synthase subunit beta	E	Amino acid transport and metabolism	2,65	
Y958_RS13630		peptidase S9	E	Amino acid transport and metabolism		-1,64
Y958_RS13905		BMP family ABC transporter substrate-binding	E	Amino acid transport and metabolism		-5,28
Y958_RS14040	aroQ	type II 3-dehydroquininate dehydratase	E	Amino acid transport and metabolism	2,30	
Y958_RS15850		peptidase S9 family protein	E	Amino acid transport and metabolism	-3,90	
Y958_RS16100		amino acid permease	E	Amino acid transport and metabolism	-5,26	
Y958_RS16210		aromatic amino acid aminotransferase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,56	
Y958_RS16830		Zn-dependent hydrolase	E	Amino acid transport and metabolism	-4,11	
Y958_RS17155	ald	alanine dehydrogenase	E	Amino acid transport and metabolism	-4,86	

Y958_RS18100		branched chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	E	Amino acid transport and metabolism	-6,54	
Y958_RS18220		leucyl aminopeptidase	E	Amino acid transport and metabolism	4,36	1,64
Y958_RS18850		selenide, water dikinase SelD	E	Amino acid transport and metabolism	22,77	4,01
Y958_RS19055		oligopeptidase A	E	Amino acid transport and metabolism	6,94	1,61
Y958_RS19985		glucose-methanol-choline oxidoreductase	E	Amino acid transport and metabolism	-20,00	
Y958_RS20025		peptidase M4 family protein	E	Amino acid transport and metabolism	-3,56	
Y958_RS20390		P-II family nitrogen regulator	E	Amino acid transport and metabolism	3,18	
Y958_RS20945		3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase class II	E	Amino acid transport and metabolism	2,07	
Y958_RS21050		cysteine desulfurase	E	Amino acid transport and metabolism	2,90	
Y958_RS21100		hypothetical protein	E	Amino acid transport and metabolism	-3,30	
Y958_RS21345	leuC	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	E	Amino acid transport and metabolism	-14,41	
Y958_RS21350	leuD	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	E	Amino acid transport and metabolism	-3,49	
Y958_RS21530		threonine transporter	E	Amino acid transport and metabolism	-2,74	
Y958_RS21545		monoamine oxidase	E	Amino acid transport and metabolism	-40,54	
Y958_RS21740		S9 family peptidase	E	Amino acid transport and metabolism	-5,79	
Y958_RS21745		S9 family peptidase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,92	
Y958_RS21900		KpsF/GutQ family sugar-phosphate isomerase	E	Amino acid transport and metabolism	3,29	
Y958_RS22080		hypothetical protein	E	Amino acid transport and metabolism	-4,02	
Y958_RS22345		allantoate amidohydrolase	E	Amino acid transport and metabolism	-4,00	
Y958_RS23040		transcriptional regulator	E	Amino acid transport and metabolism	-19,84	
Y958_RS23915	metC	cystathionine beta-lyase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,92	
Y958_RS25170		ethanolamine ammonia lyase large subunit	E	Amino acid transport and metabolism	-2,18	
Y958_RS25640		hypothetical protein	E	Amino acid transport and metabolism	-3,86	
Y958_RS25745		peptidase S10	E	Amino acid transport and metabolism	-5,35	
Y958_RS25885		serine O-acetyltransferase	E	Amino acid transport and metabolism		2,06
Y958_RS26305		diaminobutyrate--2-oxoglutarate transaminase	E	Amino acid transport and metabolism	5,08	
Y958_RS26365		FAD-dependent oxidoreductase	E	Amino acid transport and metabolism	-9,28	
Y958_RS26415		hypothetical protein	E	Amino acid transport and metabolism	-2,43	
Y958_RS26900		histidine/lysine/arginine/ornithine ABC transporter ATP-binding protein	E	Amino acid transport and metabolism	-11,46	
Y958_RS26905		ABC transporter permease	E	Amino acid transport and metabolism	-2,28	
Y958_RS27650		peptidase M19	E	Amino acid transport and metabolism	-4,44	
Y958_RS28860		chorismate mutase	E	Amino acid transport and metabolism	-2,17	
Y958_RS30320		GDSL family lipase	E	Amino acid transport and metabolism	3,25	
Y958_RS10435		carbamoyl phosphate synthase small subunit	EF	Multiple classes	2,05	

Y958_RS28195		dihydroxy-acid dehydratase	EG	Multiple classes	10,36	
Y958_RS17675		sulfate adenyltransferase small subunit	EH	Multiple classes	-3,53	
Y958_RS25790		branched-chain amino acid aminotransferase	EH	Multiple classes		-1,97
Y958_RS06955		4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	EM	Multiple classes	2,86	
Y958_RS11895		dihydrodipicolinate synthase family protein	EM	Multiple classes	-3,04	
Y958_RS30630		methylhydantoinase	EQ	Multiple classes	-12,42	
Y958_RS30635		hydantoin utilization protein B	EQ	Multiple classes	-8,11	
Y958_RS12210	hppD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	ER	Multiple classes	-4,14	
Y958_RS16820		dihydropyrimidine dehydrogenase	ER	Multiple classes	-3,39	-1,80
Y958_RS30540		alcohol dehydrogenase	ER	Multiple classes	-57,20	
Y958_RS00655		amino acid ABC transporter substrate-binding protein	ET	Multiple classes	-2,46	
Y958_RS00990		hypothetical protein	ET	Multiple classes	-2,15	
Y958_RS01400		hypothetical protein	ET	Multiple classes	8,69	
Y958_RS10740		amino acid ABC transporter substrate-binding protein	ET	Multiple classes	-5,53	
Y958_RS20800		hypothetical protein	ET	Multiple classes	-5,17	
Y958_RS21065		hypothetical protein	ET	Multiple classes	3,36	
Y958_RS21445		hypothetical protein	ET	Multiple classes	-3,39	
Y958_RS22255		hypothetical protein	ET	Multiple classes	-2,45	
Y958_RS22260		hypothetical protein	ET	Multiple classes	-4,04	
Y958_RS00740		thymidylate synthase	F	Nucleotide transport and metabolism	-10,95	
Y958_RS01965	deoA	thymidine phosphorylase bifunctional	F	Nucleotide transport and metabolism	2,09	
Y958_RS02280		phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	F	Nucleotide transport and metabolism	3,18	
Y958_RS03270		orotate phosphoribosyltransferase	F	Nucleotide transport and metabolism	2,29	
Y958_RS03275		dihydroorotase	F	Nucleotide transport and metabolism	2,11	
Y958_RS03780		ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	F	Nucleotide transport and metabolism	-2,49	-1,74
Y958_RS03970		5 -methylthioadenosine S-adenosylhomocysteine nucleosidase	F	Nucleotide transport and metabolism		-1,75
Y958_RS05815		nucleoside hydrolase	F	Nucleotide transport and metabolism	-3,03	
Y958_RS09280		hypothetical protein	F	Nucleotide transport and metabolism	-3,60	
Y958_RS10400	thyA	thymidylate synthase	F	Nucleotide transport and metabolism	3,07	
Y958_RS12440		phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS	F	Nucleotide transport and metabolism	2,22	
Y958_RS12460		adenylosuccinate lyase	F	Nucleotide transport and metabolism	2,17	
Y958_RS12760		uracil phosphoribosyltransferase	F	Nucleotide transport and metabolism	-12,06	

Y958_RS13040		xanthine phosphoribosyltransferase	F	Nucleotide transport and metabolism	2,72	
Y958_RS13215	rdgB	non-canonical purine NTP pyrophosphatase, RdgB/HAM1 family	F	Nucleotide transport and metabolism	2,76	
Y958_RS13880		nucleoside 2-deoxyribosyltransferase	F	Nucleotide transport and metabolism	-2,70	
Y958_RS13885		2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	F	Nucleotide transport and metabolism	-2,54	
Y958_RS13995		ribonucleoside-diphosphate reductase, adenosylcobalamin-dependent	F	Nucleotide transport and metabolism	-4,36	-3,60
Y958_RS16810		nucleoside-diphosphate kinase	F	Nucleotide transport and metabolism	3,02	
Y958_RS16825		dihydropyrimidine dehydrogenase subunit B	F	Nucleotide transport and metabolism	-3,86	
Y958_RS16840	hydA	dihydropyrimidinase	F	Nucleotide transport and metabolism	-3,81	
Y958_RS18085		aspartate carbamoyltransferase	F	Nucleotide transport and metabolism	2,18	
Y958_RS18160		deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase	F	Nucleotide transport and metabolism	4,34	
Y958_RS20470		hypothetical protein	F	Nucleotide transport and metabolism	-4,51	
Y958_RS20545		endonuclease	F	Nucleotide transport and metabolism	-5,73	
Y958_RS20780		dCTP deaminase	F	Nucleotide transport and metabolism	2,77	
Y958_RS21955		bifunctional transcriptional regulator/O6-methylguanine-DNA methyltransferase	F	Nucleotide transport and metabolism	11,78	
Y958_RS22245		nucleoside hydrolase	F	Nucleotide transport and metabolism		-7,01
Y958_RS22270		adenosine deaminase	F	Nucleotide transport and metabolism	-2,34	
Y958_RS23370		3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	F	Nucleotide transport and metabolism	2,34	
Y958_RS24070		hypothetical protein	F	Nucleotide transport and metabolism	-13,62	
Y958_RS27680		phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	F	Nucleotide transport and metabolism	2,63	
Y958_RS27685		phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	F	Nucleotide transport and metabolism	3,44	
Y958_RS28465		adenosine deaminase	F	Nucleotide transport and metabolism		-2,20
Y958_RS26795		ribose-phosphate pyrophosphokinase	FE	Multiple classes	-33,54	
Y958_RS16845		nitrate reductase	FH	Multiple classes	-18,51	
Y958_RS23850		cytosine deaminase	FR	Multiple classes	-2,98	
Y958_RS26940		formimidoylglutamate deiminase	FR	Multiple classes	3,44	
Y958_RS00420		adenosine kinase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,74	
Y958_RS02290		ribulose-phosphate 3-epimerase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,06	
Y958_RS04265		NAD kinase	G	Carbohydrate transport and metabolism	4,15	
Y958_RS05605		beta-galactosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	4,14	
Y958_RS05610		alpha-L-fucosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	16,47	
Y958_RS06130		hypothetical protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	10,05	
Y958_RS07285		hypothetical protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	3,12	
Y958_RS09290		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	7,64	

Y958_RS09315		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	-13,51	
Y958_RS09560	tkt	transketolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,27	
Y958_RS09655		inositol monophosphatase	G	Carbohydrate transport and metabolism	3,59	
Y958_RS10785	fsa	fructose-6-phosphate aldolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	4,12	
Y958_RS12375		sorbose dehydrogenase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,62	
Y958_RS13835		Bcr/CflA family drug resistance efflux transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	-2,02	
Y958_RS14960		PTS fructose transporter subunit EIIBC	G	Carbohydrate transport and metabolism	-48,24	
Y958_RS14965	pfkB	1-phosphofructokinase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-15,77	-1,66
Y958_RS14970	ptsP	phosphoenolpyruvate--protein phosphotransferase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-6,46	
Y958_RS15500		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	-4,95	
Y958_RS15775		AP endonuclease	G	Carbohydrate transport and metabolism	-4,92	
Y958_RS15780		xylose isomerase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-9,54	
Y958_RS16515		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,47	
Y958_RS16540		EmrB/QacA family drug resistance transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	5,02	
Y958_RS17145		cupin	G	Carbohydrate transport and metabolism	-7,60	
Y958_RS17385		glycoside hydrolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	4,42	
Y958_RS17440		D-xylose transporter XylE	G	Carbohydrate transport and metabolism	-2,53	
Y958_RS17475		TMAO reductase system periplasmic protein TorT	G	Carbohydrate transport and metabolism	-4,36	
Y958_RS18145		beta-N-acetylhexosaminidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,32	
Y958_RS18605		glycogen phosphorylase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-3,15	
Y958_RS18610		1,4-alpha-glucan branching enzyme	G	Carbohydrate transport and metabolism	-3,28	
Y958_RS18615	glgC	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-14,44	
Y958_RS18620		starch synthase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-8,42	
Y958_RS19205		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,33	
Y958_RS20085		hypothetical protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	3,09	
Y958_RS20880		alpha-galactosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	4,97	
Y958_RS21330		class II aldolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-2,09	
Y958_RS21610		pyruvate, phosphate dikinase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-2,25	
Y958_RS21680		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,62	
Y958_RS22355		allantoinase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-10,79	
Y958_RS22900		C4-dicarboxylate ABC transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	-3,41	
Y958_RS22935		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	6,79	
Y958_RS24480		2-methylisocitrate lyase	G	Carbohydrate transport and metabolism	3,33	
Y958_RS25420		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	8,86	
Y958_RS25795		3-(3-hydroxy-phenyl)propionate transporter MhpT	G	Carbohydrate transport and metabolism	-2,23	

Y958_RS26880		polysaccharide deacetylase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-17,81	
Y958_RS27365	otsB	trehalose-phosphatase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,87	
Y958_RS27370		trehalose-6-phosphate synthase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,99	
Y958_RS27375		amylo-alpha-1,6-glucosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,75	
Y958_RS27440		hypothetical protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	-4,01	-2,59
Y958_RS27780		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	3,43	
Y958_RS28165		methylglyoxal synthase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-4,28	
Y958_RS28175		gluconolactonase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-2,18	
Y958_RS28185		2-dehydro-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase	G	Carbohydrate transport and metabolism	3,67	
Y958_RS28190		2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	G	Carbohydrate transport and metabolism	6,53	
Y958_RS28700		alpha-xylosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	2,47	
Y958_RS28830		amylsucrase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-42,08	
Y958_RS29405		hypothetical protein	G	Carbohydrate transport and metabolism	-3,37	
Y958_RS29595		MFS transporter	G	Carbohydrate transport and metabolism	6,13	
Y958_RS30120		6-phospho-beta-glucosidase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-3,93	
Y958_RS30710		polysaccharide deacetylase	G	Carbohydrate transport and metabolism	-2,73	
Y958_RS31070		PQQ-dependent dehydrogenase, methanol/ethanol family	G	Carbohydrate transport and metabolism	-6,05	
Y958_RS01505		EamA family transporter	GER	Multiple classes	5,11	
Y958_RS12630		EamA family transporter	GER	Multiple classes	17,16	
Y958_RS00550		multidrug ABC transporter permease	GM	Multiple classes	5,53	
Y958_RS22940		hypothetical protein	GM	Multiple classes	-2,11	
Y958_RS00190		uroporphyrinogen decarboxylase	H	Coenzyme transport and metabolism		-1,50
Y958_RS01080		quinolinate synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	-4,12	
Y958_RS01085		L-aspartate oxidase	H	Coenzyme transport and metabolism	-3,77	
Y958_RS01090		nicotinate-nucleotide diphosphorylase (carboxylating)	H	Coenzyme transport and metabolism	-2,28	
Y958_RS02130		hydroxymethylbilane synthase	H	Coenzyme transport and metabolism		-2,86
Y958_RS02170	cobT	nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase	H	Coenzyme transport and metabolism	2,40	-3,25
Y958_RS03090		hypothetical protein	H	Coenzyme transport and metabolism	-5,36	
Y958_RS03305	ribF	riboflavin biosynthesis protein RibF	H	Coenzyme transport and metabolism	3,21	
Y958_RS03660	pdxH	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	H	Coenzyme transport and metabolism	-4,00	
Y958_RS03720		2-dehydropantoate 2-reductase	H	Coenzyme transport and metabolism	2,17	
Y958_RS04150		ArsR family transcriptional regulator	H	Coenzyme transport and metabolism	-5,05	
Y958_RS04270		GTP 3',8-cyclase MoaA	H	Coenzyme transport and metabolism	5,49	
Y958_RS04320		lipoate-protein ligase B	H	Coenzyme transport and metabolism	5,87	

Y958_RS07125		delta-aminolevulinic acid dehydratase	H	Coenzyme transport and metabolism		1,65
Y958_RS07170		riboflavin synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	3,93	
Y958_RS07175	ribB	3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	2,81	
Y958_RS07180	ribH	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	3,52	
Y958_RS07895		lipoyl synthase	H	Coenzyme transport and metabolism		1,56
Y958_RS08525		hypothetical protein	H	Coenzyme transport and metabolism	2,58	
Y958_RS08800	hemA	5-aminolevulinate synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	-5,60	1,61
Y958_RS09455	thiD	bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethylpyrimidine kinase	H	Coenzyme transport and metabolism	2,47	
Y958_RS09465	folP	dihydropteroate synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	2,07	
Y958_RS09540		5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	H	Coenzyme transport and metabolism	2,29	
Y958_RS09870		SAM-dependent methyltransferase adenosylmethionine--8-amino-7-oxononanoate transaminase	H	Coenzyme transport and metabolism	-2,85	
Y958_RS09885			H	Coenzyme transport and metabolism	2,83	
Y958_RS09890	bioB	biotin synthase BioB	H	Coenzyme transport and metabolism	2,62	
Y958_RS09895		8-amino-7-oxononanoate synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	3,93	
Y958_RS09900	bioD	dethiobiotin synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	3,79	
Y958_RS11080	moaB	molybdenum cofactor biosynthesis protein B oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	H	Coenzyme transport and metabolism	7,78	3,74
Y958_RS11130	hemN		H	Coenzyme transport and metabolism	-7,62	
Y958_RS12240		SAM-dependent methyltransferase	H	Coenzyme transport and metabolism	3,10	
Y958_RS12325	thiG	thiazole synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	-2,38	
Y958_RS12705	folE	GTP cyclohydrolase I FolE	H	Coenzyme transport and metabolism	3,89	
Y958_RS12985	coaBC	bifunctional phosphopantothenoylecysteine decarboxylase/phosphopantothenate--cysteine ligase CoaBC	H	Coenzyme transport and metabolism	3,21	
Y958_RS13210		coproporphyrinogen III oxidase	H	Coenzyme transport and metabolism	2,51	
Y958_RS13760		TonB-dependent receptor	H	Coenzyme transport and metabolism	-7,79	
Y958_RS14075		farnesyltranstransferase	H	Coenzyme transport and metabolism	2,11	
Y958_RS16095		TonB-dependent receptor	H	Coenzyme transport and metabolism	-2,72	
Y958_RS16815		aspartate aminotransferase family protein	H	Coenzyme transport and metabolism	-4,15	
Y958_RS19840		phosphomethylpyrimidine synthase ThiC	H	Coenzyme transport and metabolism	-14,72	-1,71
Y958_RS21585		aminotransferase	H	Coenzyme transport and metabolism	-2,16	
Y958_RS22075		hypothetical protein	H	Coenzyme transport and metabolism	-30,11	-1,70
Y958_RS23065		hypothetical protein	H	Coenzyme transport and metabolism	-8,27	
Y958_RS24045		hypothetical protein	H	Coenzyme transport and metabolism	-11,25	
Y958_RS25315		bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate	H	Coenzyme transport and metabolism	2,35	

		cyclohydrolase			
Y958_RS25400		S-adenosylmethionine--2-demethylmenaquinone methyltransferase	H	Coenzyme transport and metabolism	-3,96
Y958_RS26725		8-amino-7-oxononanoate synthase	H	Coenzyme transport and metabolism	5,88
Y958_RS26760		nicotinate phosphoribosyltransferase	H	Coenzyme transport and metabolism	-7,64
Y958_RS27055		hypothetical protein	H	Coenzyme transport and metabolism	-4,21
Y958_RS27215		TonB-dependent receptor	H	Coenzyme transport and metabolism	-6,85
Y958_RS27810		cobyric acid synthase CobQ	H	Coenzyme transport and metabolism	-2,47
Y958_RS28820		TonB-dependent receptor	H	Coenzyme transport and metabolism	-5,78
Y958_RS01195		hypothetical protein	HC	Multiple classes	5,93
Y958_RS19855		FAD-dependent oxidoreductase	HC	Multiple classes	6,45
Y958_RS24340		hypothetical protein	HC	Multiple classes	7,01
Y958_RS01795		glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A	HE	Multiple classes	-14,28
Y958_RS09430		phosphoglycerate dehydrogenase	HE	Multiple classes	-11,41
Y958_RS09435		phosphoserine transaminase	HE	Multiple classes	-8,42
Y958_RS30665		hydroxyacid dehydrogenase	HE	Multiple classes	-3,87
Y958_RS03585		1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	HI	Multiple classes	2,36
Y958_RS22580		1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	HI	Multiple classes	2,21
Y958_RS00510		glutathione synthase	HJ	Multiple classes	2,10
Y958_RS01165		acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	I	Lipid transport and metabolism	2,53
Y958_RS01280		polyhydroxyalkanoate depolymerase	I	Lipid transport and metabolism	8,32
Y958_RS01510		3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	4,54
Y958_RS02065	acs	acetyl-coenzyme A synthetase	I	Lipid transport and metabolism	-12,85
Y958_RS02725		thiolase family protein	I	Lipid transport and metabolism	-3,70
Y958_RS02730		3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	-3,14
Y958_RS03630		enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	I	Lipid transport and metabolism	3,10
Y958_RS04950		hypothetical protein	I	Lipid transport and metabolism	-26,79
Y958_RS07230		phosphate acyltransferase	I	Lipid transport and metabolism	2,48
Y958_RS07235		3-oxoacyl-ACP synthase	I	Lipid transport and metabolism	2,50
Y958_RS08075	fabZ	beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	I	Lipid transport and metabolism	-3,38
Y958_RS09745	prpE	propionyl-CoA synthetase	I	Lipid transport and metabolism	-21,57
Y958_RS10770		alpha/beta hydrolase	I	Lipid transport and metabolism	5,02
Y958_RS11095		acyl-CoA desaturase	I	Lipid transport and metabolism	-4,53
Y958_RS11770		acetyl-CoA acetyltransferase	I	Lipid transport and metabolism	-7,20
Y958_RS13420		acetyl-CoA carboxylase, carboxyltransferase subunit beta	I	Lipid transport and metabolism	3,73

1,59

Y958_RS14030	accC	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	I	Lipid transport and metabolism	2,74	
Y958_RS14035	accB	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein	I	Lipid transport and metabolism	3,83	
Y958_RS14275		acyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	-3,02	
Y958_RS14360		3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	2,79	
Y958_RS14445		class I poly(R)-hydroxyalkanoic acid synthase	I	Lipid transport and metabolism	-2,13	
Y958_RS15920		enoyl-ACP reductase	I	Lipid transport and metabolism	-5,94	
Y958_RS15935		hypothetical protein	I	Lipid transport and metabolism	-4,89	
Y958_RS16330		hypothetical protein	I	Lipid transport and metabolism	4,24	
Y958_RS16420		acyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	6,45	
Y958_RS16425		acetyl-CoA acetyltransferase	I	Lipid transport and metabolism	7,14	
Y958_RS16430		3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	4,09	
Y958_RS17545		phytoene synthase	I	Lipid transport and metabolism	3,78	
Y958_RS17715		methylmalonyl-CoA mutase	I	Lipid transport and metabolism	-2,94	
Y958_RS17720		acetyl/propionyl-CoA carboxylase subunit alpha	I	Lipid transport and metabolism	-3,12	
Y958_RS17725		methylmalonyl-CoA carboxyltransferase	I	Lipid transport and metabolism	-2,75	
Y958_RS17945		phosphoesterase	I	Lipid transport and metabolism	2,75	
Y958_RS18285	fabD	[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase	I	Lipid transport and metabolism	2,92	
Y958_RS18795		alpha/beta hydrolase	I	Lipid transport and metabolism	-3,14	
Y958_RS19000		acyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	-13,28	
Y958_RS20035		alpha/beta hydrolase	I	Lipid transport and metabolism	-2,03	
Y958_RS22665	shc	squalene--hopene cyclase	I	Lipid transport and metabolism	3,25	
Y958_RS23565	mdcA	malonate decarboxylase subunit alpha	I	Lipid transport and metabolism	4,22	
Y958_RS25380		enoyl- hydratase	I	Lipid transport and metabolism		-1,52
Y958_RS25455		acyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	-2,01	
Y958_RS26650		inositol-3-phosphate synthase	I	Lipid transport and metabolism	-2,87	
Y958_RS26715		inositol-3-phosphate synthase	I	Lipid transport and metabolism	4,49	
Y958_RS26765		polyhydroxyalkanoate depolymerase	I	Lipid transport and metabolism	-10,77	
Y958_RS28085		acyl-CoA dehydrogenase	I	Lipid transport and metabolism	-3,65	
Y958_RS28240		FMN-dependent NADH-azoreductase	I	Lipid transport and metabolism	3,82	
Y958_RS28720		alpha/beta hydrolase	I	Lipid transport and metabolism	6,95	
Y958_RS28935		p-hydroxycinnamoyl CoA hydratase/lyase	I	Lipid transport and metabolism	-2,73	
Y958_RS29160		3-oxoacyl-ACP synthase	I	Lipid transport and metabolism	-2,88	
Y958_RS30590		poly-beta-hydroxybutyrate polymerase	I	Lipid transport and metabolism	-16,03	
Y958_RS22650		4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	IM	Multiple classes		-1,88

Y958_RS02705		dicarboxylate--CoA ligase PimA beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	IQ	Multiple classes	-2,58	
Y958_RS18270	fabF	II	IQ	Multiple classes	2,47	
Y958_RS25510		acid--CoA ligase	IQ	Multiple classes	-2,33	
Y958_RS26720		acyl carrier protein	IQ	Multiple classes	5,30	
Y958_RS29365		acyl carrier protein	IQ	Multiple classes	-3,01	
Y958_RS01515		3-oxoacyl-ACP reductase	IQR	Multiple classes	4,35	
Y958_RS04480		oxidoreductase	IQR	Multiple classes	3,49	
Y958_RS11765		beta-ketoacyl-ACP reductase	IQR	Multiple classes	-10,38	
Y958_RS12195		hypothetical protein	IQR	Multiple classes	-3,32	
Y958_RS16415		gluconate 5-dehydrogenase	IQR	Multiple classes	11,71	
Y958_RS19210		short chain dehydrogenase	IQR	Multiple classes	8,84	6,49
Y958_RS19215		oxidoreductase	IQR	Multiple classes	3,30	4,70
Y958_RS21070		3-oxoacyl-ACP reductase	IQR	Multiple classes	13,93	
Y958_RS21780		short-chain dehydrogenase	IQR	Multiple classes	-2,02	
Y958_RS22150		oxidoreductase	IQR	Multiple classes	14,95	
Y958_RS22540		3-hydroxybutyrate dehydrogenase	IQR	Multiple classes	3,63	
Y958_RS29370		hypothetical protein	IQR	Multiple classes	-3,73	
Y958_RS30575		beta-ketoacyl-ACP reductase	IQR	Multiple classes	-24,43	
Y958_RS10140		hypothetical protein tRNA (N6-isopentenyl	IR	Multiple classes	-2,98	
Y958_RS00065		adenosine(37)-C2)-methylthiotransferase MiaB	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,34	
Y958_RS00135	trpS	tryptophan--tRNA ligase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,06	
Y958_RS01540	prmC	protein-(glutamine-N5) methyltransferase, release factor-specific	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,62	
Y958_RS01545		peptide chain release factor 1	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,00	
Y958_RS01620		ribonuclease D	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,45	
Y958_RS01860		peptide deformylase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,52	
Y958_RS01865		methionyl-tRNA formyltransferase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,52	
Y958_RS01930	mpA	ribonuclease P protein component	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,43	
Y958_RS02235		phenylalanine--tRNA ligase subunit alpha	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,55	
Y958_RS02240		phenylalanine--tRNA ligase subunit beta	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,77	
Y958_RS02295		MFS transporter	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,73	

Y958_RS03170		aminoacyl-tRNA hydrolase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,10
Y958_RS03175		50S ribosomal protein L25	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,65
Y958_RS03310		isoleucine--tRNA ligase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,08
Y958_RS03590		TlyA family rRNA (cytidine-2'-O)-methyltransferase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,59
Y958_RS04030		23S rRNA (guanosine(2251)-2'-O)-methyltransferase RlmB	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,11
Y958_RS04070		50S ribosomal protein L1	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,50
Y958_RS04235		aldolase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	-2,82
Y958_RS05955		peptide chain release factor 3	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,23
Y958_RS06455		rRNA methyltransferase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	-2,60
Y958_RS06510		30S ribosomal protein S4	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,47
Y958_RS06600	map	type I methionyl aminopeptidase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,90
Y958_RS07275		50S ribosomal protein L13	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,59
Y958_RS07280		30S ribosomal protein S9	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,96
Y958_RS07295		aminoacyl-tRNA hydrolase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	4,46
Y958_RS08030		glutamate--tRNA ligase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	5,01
Y958_RS09250		30S ribosomal protein S7	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,11
Y958_RS09255		30S ribosomal protein S12	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,02
Y958_RS09260		30S ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,24
Y958_RS09660	efp	elongation factor P	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,25
Y958_RS10620		30S ribosomal protein S5 alanine N-acetyltransferase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	-2,02
Y958_RS10980		tRNA (N(6)-L-threonylcarbamoyladenosine(37)-C(2))- methylthiotransferase MtaB	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,35
Y958_RS11020	rimM	ribosome maturation factor RimM	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,50
Y958_RS11360		50S ribosomal protein L27	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	5,19
Y958_RS11365	rplU	50S ribosomal protein L21	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	4,22

Y958_RS12405	type I methionyl aminopeptidase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis		2,60
Y958_RS12945	30S ribosomal protein S20	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,38	
Y958_RS13005	RNA methyltransferase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,25	
Y958_RS13030	RNA methyltransferase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,54	
Y958_RS13220	ribonuclease PH	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,29	
Y958_RS13315	RNA 2',3'-cyclic phosphodiesterase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	10,06	
Y958_RS13540	ribosome-binding factor A	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	6,49	
Y958_RS17030	ribonuclease E	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	4,02	
Y958_RS17285	Asp-tRNA(Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferase GatCAB subunit C	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,01	
Y958_RS17290	Asp-tRNA(Asn)/Glu-tRNA(Gln) amidotransferase GatCAB subunit A	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,60	
Y958_RS17300	hypothetical protein methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil(54)-C(5))-methyltransferase (FADH(2)-oxidizing)	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	-2,18	-1,93
Y958_RS17550	TrmFO	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	3,12	
Y958_RS17900	methionine--tRNA ligase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,28	
Y958_RS19410	peptide chain release factor 2	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,07	
Y958_RS19690	rnd ribonuclease D	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	2,07	
Y958_RS21020	tRNA 2-thiouridine(34) synthase MnmA	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	5,78	
Y958_RS21540	endoribonuclease L-PSP	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	-11,53	
Y958_RS24050	asparaginase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	-7,22	
Y958_RS25580	RNA pseudouridine synthase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	4,74	8,30
Y958_RS25755	tyrosine--tRNA ligase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	-4,85	-1,84
Y958_RS29800	YER057c UK114 family	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis		-1,56
Y958_RS30550	MBL fold metallo-hydrolase	J	Translation, ribosomal structure and biogenesis	-16,66	1,56
Y958_RS00040	transcriptional regulator	K	Transcription		1,84
Y958_RS00675	MarR family transcriptional regulator	K	Transcription	4,17	
Y958_RS01225	RNA polymerase	K	Transcription	3,51	

Y958_RS01340	MerR family transcriptional regulator	K	Transcription	2,89	
Y958_RS01495	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,33	
Y958_RS01765	MarR family transcriptional regulator	K	Transcription	-4,37	
Y958_RS02345	RNA polymerase factor sigma-32	K	Transcription	2,64	
Y958_RS02580	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	4,17	
Y958_RS03885	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,70	
Y958_RS04000	transcriptional regulator transcription termination/antitermination protein NusG	K	Transcription	21,83	29,51
Y958_RS04060	chromosome partitioning protein ParB	K	Transcription	3,72	
Y958_RS04670	transcriptional regulator	K	Transcription	-3,69	
Y958_RS04960	transcriptional regulator	K	Transcription	-2,70	
Y958_RS05060	transcriptional regulator	K	Transcription	-3,84	
Y958_RS05615	LacI family transcriptional regulator	K	Transcription	4,27	
Y958_RS05630	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	13,25	
Y958_RS05640	TetR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,89	
Y958_RS05805	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	5,33	
Y958_RS06315	antitoxin	K	Transcription	4,75	
Y958_RS06635	MarR family transcriptional regulator	K	Transcription	4,14	
Y958_RS06785	hypothetical protein	K	Transcription	-16,99	
Y958_RS07145	transcriptional regulator	K	Transcription	6,16	2,15
Y958_RS07185	transcription antitermination factor NusB	K	Transcription	4,20	
Y958_RS07245	MerR family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,57	
Y958_RS07640	LacI family transcriptional regulator	K	Transcription	-3,20	
Y958_RS08015	transcriptional regulator	K	Transcription	2,12	
Y958_RS08140	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	5,20	
Y958_RS08435	hypothetical protein	K	Transcription	-2,05	
Y958_RS08480	hypothetical protein	K	Transcription	-2,86	
Y958_RS08815	transcriptional regulator	K	Transcription	-2,32	
Y958_RS08915	ArsR family transcriptional regulator	K	Transcription	4,30	
Y958_RS09615	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,47	
Y958_RS09820	RNA polymerase sigma 70	K	Transcription	-8,47	
Y958_RS09875	XRE family transcriptional regulator	K	Transcription	6,41	
Y958_RS10190	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	4,36	
Y958_RS10420	RNA polymerase sigma factor RpoD	K	Transcription	2,34	
Y958_RS10735	transcriptional regulator	K	Transcription	-3,63	

Y958_RS11070	CarD family transcriptional regulator	K	Transcription	3,40	
Y958_RS11915	GntR family transcriptional regulator	K	Transcription	-3,21	
Y958_RS12280	transcription elongation factor GreB	K	Transcription	2,51	
Y958_RS12975	Rrf2 family transcriptional regulator	K	Transcription		3,49
Y958_RS13555	transcription termination/antitermination protein NusA	K	Transcription	2,22	
Y958_RS14580	TetR family transcriptional regulator	K	Transcription	-4,40	
Y958_RS15065	nodulation protein NfeD	K	Transcription	-2,83	
Y958_RS15260	AraC family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,99	
Y958_RS16365	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,95	
Y958_RS16410	transcriptional regulator	K	Transcription	8,72	
Y958_RS16530	transcriptional regulator	K	Transcription	38,26	
Y958_RS16715	AraC family transcriptional regulator	K	Transcription	2,42	
Y958_RS16835	TetR family transcriptional regulator	K	Transcription	-3,56	
Y958_RS17480	hypothetical protein	K	Transcription	-2,15	
Y958_RS18125	MarR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,67	
Y958_RS18800	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	-4,32	
Y958_RS19740	MarR family transcriptional regulator	K	Transcription	-8,06	
Y958_RS20010	transcriptional regulator	K	Transcription	-3,01	
Y958_RS20555	MucR family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,41	
Y958_RS20760	DNA-binding transcriptional regulator	K	Transcription	3,17	
Y958_RS21075	AraC family transcriptional regulator	K	Transcription	4,04	
Y958_RS21190	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,44	
Y958_RS21260	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,66	
Y958_RS21300	LacI family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,88	
Y958_RS22045	chromosome partitioning protein	K	Transcription	2,22	
Y958_RS22135	MarR family transcriptional regulator	K	Transcription	4,67	
Y958_RS22500	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	5,22	
Y958_RS22915	GntR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,09	
Y958_RS23325	LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	2,34	

Y958_RS23420		hypothetical protein	K	Transcription	-5,16	
Y958_RS23450		AraC family transcriptional regulator	K	Transcription	8,50	
Y958_RS23970		AraC family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,55	
Y958_RS24520		RNA polymerase subunit sigma-70	K	Transcription	-3,22	
Y958_RS25185		TetR family transcriptional regulator	K	Transcription	3,47	
Y958_RS25575	rpoH	RNA polymerase sigma factor RpoH	K	Transcription	3,39	
Y958_RS25960		LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,22	
Y958_RS26175		AraC family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,28	
Y958_RS27200		GntR family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,32	
Y958_RS27385		acyl dehydratase	K	Transcription	4,10	
Y958_RS27690		AraC family transcriptional regulator	K	Transcription	3,48	
Y958_RS27920		LysR family transcriptional regulator	K	Transcription	4,86	
Y958_RS28170		FadR family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,40	
Y958_RS28560		Rrf2 family transcriptional regulator	K	Transcription	2,09	
Y958_RS28620		TetR family transcriptional regulator	K	Transcription	-2,07	
Y958_RS28845		LacI family transcriptional regulator	K	Transcription	-4,04	
Y958_RS29095		hypothetical protein	K	Transcription	-7,69	
Y958_RS29590		XRE family transcriptional regulator	K	Transcription	-3,04	
Y958_RS29865		LacI family transcriptional regulator	K	Transcription	-3,48	
Y958_RS08050		GntR family transcriptional regulator	KE	Multiple classes	2,56	
Y958_RS08795		GntR family transcriptional regulator	KE	Multiple classes	11,95	
Y958_RS28205		GntR family transcriptional regulator	KE	Multiple classes	-5,24	
Y958_RS05875		transcriptional regulator	KG	Multiple classes	3,52	
Y958_RS28825		fructokinase	KG	Multiple classes	-37,35	
Y958_RS30045		fructokinase	KG	Multiple classes	3,22	
Y958_RS30145		transcriptional regulator	KG	Multiple classes	2,90	
Y958_RS01375	pspA	phage shock protein PspA	KT	Multiple classes	14,39	4,79
Y958_RS05450	nifA	nif-specific transcriptional activator NifA	KT	Multiple classes	-2,51	
Y958_RS08010		repressor LexA	KT	Multiple classes	3,15	
Y958_RS10565		hypothetical protein	KT	Multiple classes	21,53	

Y958_RS10570		phage shock protein PspA	KT	Multiple classes	28,05	
Y958_RS13680		two-component system response regulator	KT	Multiple classes	-8,41	
Y958_RS17110		response regulator	KT	Multiple classes	-7,26	
Y958_RS01845		recombination protein RecR	L	Replication, recombination and repair	4,15	
Y958_RS02770		excinuclease ABC subunit C	L	Replication, recombination and repair	2,78	
Y958_RS02795		excinuclease ABC subunit B	L	Replication, recombination and repair	4,79	
Y958_RS04635		integrase	L	Replication, recombination and repair	2,59	
Y958_RS06080	recA	recombinase RecA	L	Replication, recombination and repair	2,99	
Y958_RS06255		mismatch-specific DNA-glycosylase	L	Replication, recombination and repair	-2,92	
Y958_RS09410		DNA helicase II	L	Replication, recombination and repair	2,82	
Y958_RS09520		Holliday junction branch migration protein RuvA	L	Replication, recombination and repair	2,81	
Y958_RS09525		crossover junction endodeoxyribonuclease RuvC	L	Replication, recombination and repair	3,16	
Y958_RS10425		DNA primase	L	Replication, recombination and repair	3,04	
Y958_RS10560		cysteine methyltransferase	L	Replication, recombination and repair	5,85	
Y958_RS11100		radical SAM protein	L	Replication, recombination and repair	11,21	
Y958_RS12025		DNA polymerase IV	L	Replication, recombination and repair	3,28	
Y958_RS12130		disulfide oxidoreductase	L	Replication, recombination and repair	2,99	
Y958_RS12500		DNA mismatch repair protein MutS	L	Replication, recombination and repair	2,28	
Y958_RS12550	ihfB	integration host factor subunit beta	L	Replication, recombination and repair	-2,86	
Y958_RS18035		excinuclease ABC subunit A	L	Replication, recombination and repair	5,36	
Y958_RS18170	xth	exodeoxyribonuclease III	L	Replication, recombination and repair	8,33	
Y958_RS18895		cysteine methyltransferase	L	Replication, recombination and repair	3,71	
Y958_RS18915		alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB	L	Replication, recombination and repair	19,76	
Y958_RS19150		alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB	L	Replication, recombination and repair	2,63	
Y958_RS20175		DNA-3-methyladenine glycosylase	L	Replication, recombination and repair	6,36	
Y958_RS24125		very short patch repair endonuclease	L	Replication, recombination and repair	-3,02	
Y958_RS24205		hypothetical protein	L	Replication, recombination and repair	-2,25	
Y958_RS29190		ISL3 family transposase	L	Replication, recombination and repair	-20,09	
Y958_RS29340		IS481 family transposase	L	Replication, recombination and repair	-4,15	
Y958_RS05950		RNA helicase	LKJ	Multiple classes	2,42	
Y958_RS08375		ATP-dependent RNA helicase	LKJ	Multiple classes		2,70
Y958_RS10290		CoA pyrophosphatase	LR	Multiple classes	-2,91	
Y958_RS19490	dprA	DNA-protecting protein DprA	LU	Multiple classes	-2,99	

Y958_RS00010		ADP-heptose--LPS heptosyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	6,11	
Y958_RS00100		D-alanyl-D-alanine dipeptidase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	8,46	
Y958_RS00390		cell envelope biogenesis protein LolA	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,01	
Y958_RS00430		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,06	
Y958_RS01365		carboxypeptidase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,13	
Y958_RS01770		peptidase P60	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,31	
Y958_RS01805		3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis		-1,81
Y958_RS02180		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-6,13	
Y958_RS02680		efflux transporter periplasmic adaptor subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	17,36	
Y958_RS03195		prolipoprotein diacylglyceryl transferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,92	
Y958_RS03655		membrane	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis		2,20
Y958_RS04145		ABC transporter	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	4,23	
Y958_RS07400		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,60	
Y958_RS07745		glycosyl transferase family 2	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,83	
Y958_RS08060		lipid-A-disaccharide synthase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,52	
Y958_RS08080	lpxD	UDP-3-O-(3-hydroxymyristoyl)glucosamine N-acyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	4,49	
Y958_RS08085		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,38	
Y958_RS08090	bamA	outer membrane protein assembly factor BamA	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,45	
Y958_RS09630		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	4,63	
Y958_RS09640		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	6,66	
Y958_RS09800		phosphoethanolamine methyltransferase 16S rRNA	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,40	
Y958_RS09975		(cytosine(1402)-N(4))-methyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,06	
Y958_RS09985		penicillin-binding protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,98	
Y958_RS10205		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,31	-1,68
Y958_RS10775		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,46	
Y958_RS11165		curli production assembly protein CsgG	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,72	
Y958_RS12485		murein transglycosylase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	4,28	
Y958_RS13520		hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	51,33	36,43
Y958_RS14090	rfbC	dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose epimerase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,27	
Y958_RS14425		glycosyl transferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	7,33	
Y958_RS14955		carbohydrate porin	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-74,98	
Y958_RS15810		efflux transporter periplasmic adaptor subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	5,18	
Y958_RS16675		glycosyl transferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,99	
Y958_RS16685		glycosyl transferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,77	

Y958_RS16920	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,58	
Y958_RS17005	SAM-dependent methyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,22	
Y958_RS18520	bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase glucosamine-1-phosphate acetyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis		-1,61
Y958_RS19200	efflux transporter periplasmic adaptor subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,91	-1,99
Y958_RS19420	OmpW family protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-27,54	
Y958_RS19540	glycosyl transferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,64	
Y958_RS20785	murA UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,26	
Y958_RS20925	aspartate/glutamate racemase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,24	
Y958_RS21500	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,55	
Y958_RS21925	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,87	
Y958_RS21930	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,41	
Y958_RS21990	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,92	
Y958_RS22595	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,55	
Y958_RS23360	polysaccharide biosynthesis-like protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,92	
Y958_RS24250	efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis		5,45
Y958_RS26605	peptidase M23	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	4,99	
Y958_RS26655	nucleotidyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,21	
Y958_RS26690	glycosyl transferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	7,11	
Y958_RS26710	glycosyl transferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2,11	
Y958_RS27050	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-5,19	
Y958_RS27380	glycosyl transferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	9,73	
Y958_RS27835	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,39	
Y958_RS27945	efflux transporter periplasmic adaptor subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	34,56	9,60
Y958_RS28110	bifunctional heptose 7-phosphate kinase/heptose 1-phosphate adenylyltransferase	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,40	
Y958_RS28690	glycosyl transferase family 8	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis		-1,70
Y958_RS28710	efflux transporter periplasmic adaptor subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,61	
Y958_RS28715	family multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	3,61	2,46
Y958_RS29355	hypothetical protein	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-3,03	
Y958_RS30950	efflux transporter periplasmic adaptor subunit	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,45	
Y958_RS30960	hemolysin D	M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-2,93	
Y958_RS00340	NADH-ubiquinone oxidoreductase	MG	Multiple classes	-6,98	
Y958_RS01635	complex I NDUFA9 subunit family protein	MG	Multiple classes	2,08	
Y958_RS02075	flavin reductase	MG	Multiple classes	-2,29	

Y958_RS28105		ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase	MG	Multiple classes		-1,50
Y958_RS28305		NAD-dependent dehydratase	MG	Multiple classes	-2,55	
Y958_RS29600		dipeptide epimerase	MR	Multiple classes	4,15	
Y958_RS13840		hypothetical protein	MU	Multiple classes	4,89	5,68
Y958_RS19190		transporter	MU	Multiple classes	2,75	
Y958_RS19570		RND transporter	MU	Multiple classes	6,26	
Y958_RS22020		RND transporter	MU	Multiple classes		-1,90
Y958_RS24305		RND transporter	MU	Multiple classes	-3,85	
Y958_RS26850		RND transporter	MU	Multiple classes	-6,80	
Y958_RS27955		multidrug transporter	MU	Multiple classes	20,24	6,56
Y958_RS30440		hypothetical protein	MU	Multiple classes	6,91	
Y958_RS30945		transporter	MU	Multiple classes	-10,91	
Y958_RS02005		hypothetical protein	N	Cell motility	-2,76	
Y958_RS05970		flagellar basal body protein FliL	N	Cell motility	-2,29	
Y958_RS05975		flagellar motor switch protein FliM	N	Cell motility	-3,20	
Y958_RS06005		hypothetical protein	N	Cell motility	-2,30	
Y958_RS06050	flgC	flagellar basal body rod protein FlgC	N	Cell motility	-3,34	
Y958_RS07105		chemotaxis protein MotB	N	Cell motility	-2,71	
Y958_RS08425		flagellar basal body L-ring protein	N	Cell motility	-2,49	
Y958_RS08470		flagellar hook capping protein	N	Cell motility	-2,07	
Y958_RS08950		GTPase	N	Cell motility	-4,46	
Y958_RS09055		flagellar motor protein MotB	N	Cell motility	-3,66	
Y958_RS09620		hypothetical protein	N	Cell motility	4,57	
Y958_RS12340	motA	flagellar motor stator protein MotA	N	Cell motility	-2,09	
Y958_RS17610	flgK	flagellar hook-associated protein FlgK	N	Cell motility	-2,31	
Y958_RS17615		hypothetical protein	N	Cell motility	-2,28	
Y958_RS17645		hypothetical protein, partial	N	Cell motility		-13,82
Y958_RS19300		flagellin	N	Cell motility	-4,00	
Y958_RS02245		chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-2,16	
Y958_RS02425		chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-2,66	
Y958_RS03135		chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-6,14	
Y958_RS03255		chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-2,07	
Y958_RS04285		hybrid sensor histidine kinase/response regulator	NT	Multiple classes	-5,61	
Y958_RS04290		chemotaxis protein CheW	NT	Multiple classes	-6,69	
Y958_RS04300		chemotaxis response regulator protein-glutamate	NT	Multiple classes	-3,34	

	methylesterase				
Y958_RS04305	chemotaxis protein CheR	NT	Multiple classes	-3,76	
Y958_RS04465	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	6,95	
Y958_RS05995	chemotaxis protein CheZ	NT	Multiple classes	-2,42	
Y958_RS06445	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-3,28	
Y958_RS06905	hypothetical protein	NT	Multiple classes	-3,00	
Y958_RS07420	methyl-accepting chemotaxis	NT	Multiple classes		1,80
Y958_RS08620	hypothetical protein	NT	Multiple classes	-4,31	
Y958_RS08840	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-10,06	
Y958_RS08885	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-2,41	
Y958_RS11955	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-2,38	
Y958_RS12285	hypothetical protein	NT	Multiple classes	3,93	
Y958_RS15840	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-4,60	
Y958_RS16925	chemotaxis sensory transducer	NT	Multiple classes	-5,27	
Y958_RS17335	methyl-accepting chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-6,89	
Y958_RS18255	histidine kinase	NT	Multiple classes	-4,81	
Y958_RS19015	chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	NT	Multiple classes	-2,36	
Y958_RS19415	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-7,52	
Y958_RS20090	hypothetical protein	NT	Multiple classes	-3,63	
Y958_RS20135	methyl-accepting chemotaxis	NT	Multiple classes		-1,57
Y958_RS21755	hypothetical protein	NT	Multiple classes	-4,12	
Y958_RS21940	hypothetical protein	NT	Multiple classes	-4,75	
Y958_RS22215	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-2,39	
Y958_RS22860	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-2,67	
Y958_RS22895	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-4,63	
Y958_RS23805	chemotaxis protein CheR	NT	Multiple classes	-12,93	
Y958_RS23810	methyl-accepting chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-8,70	
Y958_RS23815	chemotaxis protein CheW	NT	Multiple classes	-8,19	
Y958_RS23820	methyl-accepting chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-17,99	
Y958_RS23825	chemotaxis protein CheW	NT	Multiple classes	-31,42	
Y958_RS23830	chemotaxis protein CheA	NT	Multiple classes	-23,71	
Y958_RS25095	methyl-accepting chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-13,60	2,68
Y958_RS27715	chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-5,46	

Y958_RS28450		methyl-accepting chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-5,80	
Y958_RS28775		methyl-accepting chemotaxis protein	NT	Multiple classes	-3,55	
Y958_RS06055	fliE	flagellar hook-basal body complex protein FliE	NU	Multiple classes	-2,15	
Y958_RS06265	fliN	flagellar motor switch protein FliN	NU	Multiple classes	-2,07	
Y958_RS06375		usher protein	NU	Multiple classes	-10,35	
Y958_RS06380		chaperone protein EcpD	NU	Multiple classes	-18,38	
Y958_RS14150		pilus assembly protein PapD	NU	Multiple classes	-3,11	-1,50
Y958_RS15970		type II secretion system protein GspE	NU	Multiple classes	-8,78	
Y958_RS22505		hypothetical protein	NU	Multiple classes	3,22	
Y958_RS26105	gspD	type II secretion system protein GspD	NU	Multiple classes	-4,58	
Y958_RS26145		hypothetical protein	NU	Multiple classes	-2,26	
Y958_RS19790		flagellin-specific chaperone FliS tRNA (adenosine(37)-N6)- threonylcarbamoyltransferase complex	NUO	Multiple classes	6,06	
Y958_RS00095	tsaB	dimerization subunit type 1 TsaB	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	4,80	
Y958_RS00115		NifU family protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	5,80	3,40
Y958_RS00625		ATP-dependent protease subunit HslV	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	8,72	
Y958_RS00630		HslU--HslV peptidase ATPase subunit	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	5,45	
Y958_RS00845		metal ABC transporter permease	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	4,22	
Y958_RS01435		co-chaperone YbbN tRNA (adenosine(37)-N6)- threonylcarbamoyltransferase complex transferase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	5,80	1,85
Y958_RS02125	tsaD	subunit TsaD	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,45	
Y958_RS02465		disulfide bond formation protein B	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,10	
Y958_RS02915		glutathione S-transferase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	16,24	
Y958_RS02935		disulfide bond formation	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		-2,80
Y958_RS03375	hflK	FtsH protease activity modulator HflK	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,95	
Y958_RS03380		protease modulator	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		1,71
Y958_RS03390		serine protease	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		-2,18
Y958_RS03530	sufD	Fe-S cluster assembly protein SufD	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	6,34	

Y958_RS03535	sufC	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	5,92	1,99
Y958_RS03540		Fe-S cluster assembly protein SufB	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	5,02	2,30
Y958_RS03650		molecular chaperone DnaJ	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,52	
Y958_RS06210	ccoN	cytochrome c oxidase, cbb3-type subunit I	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-34,39	
Y958_RS06555	grxD	monothiol glutaredoxin, Grx4 family	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,39	
Y958_RS06815		glutathione transferase GstA	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,06	-1,99
Y958_RS06960		SsrA-binding protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,68	
Y958_RS07100		arginyltransferase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-4,04	
Y958_RS07355	clpA	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,32	
Y958_RS07775		co-chaperone GroES	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,25	
Y958_RS07955		peptidylprolyl isomerase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,60	
Y958_RS08210		hypothetical protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-49,33	
Y958_RS08245		molecular chaperone HscC	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,26	
Y958_RS08390		glutathione peroxidase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,57	
Y958_RS08960		hypothetical protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,47	
Y958_RS09090		serine protease	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,38	
Y958_RS09635		glutathione peroxidase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	4,51	
Y958_RS09740		heat-shock protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	7,89	11,05
Y958_RS10225		hypothetical protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-8,06	
Y958_RS10495	trxB	thioredoxin-disulfide reductase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,38	
Y958_RS10670		protoheme IX farnesyltransferase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-4,74	
Y958_RS11400		glutathione S-transferase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		1,59
Y958_RS12095		ATP-dependent chaperone	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		2,53
Y958_RS12145		molecular chaperone HtpG	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,14	1,74

Y958_RS12230	grxC	glutaredoxin 3	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	5,15	2,13
Y958_RS12625	msrA	peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	8,35	2,05
Y958_RS12635		molecular chaperone Hsp33	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	13,39	4,39
Y958_RS12715		heat-shock Hsp20	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		2,33
Y958_RS12730		molecular chaperone	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		1,59
Y958_RS12735		molecular chaperone	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		1,50
Y958_RS12800		heme transporter HemC	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,43	
Y958_RS13180		AAA family ATPase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-3,66	
Y958_RS13230		nucleotide exchange factor GrpE	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,90	
Y958_RS13405		thioredoxin	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	7,72	1,70
Y958_RS13705		aspartyl beta-hydroxylase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,57	
Y958_RS13920		hypothetical protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-4,07	
Y958_RS14020		leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,13	
Y958_RS14130		peptidylprolyl isomerase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,12	
Y958_RS15585	hypE	hydrogenase expression/formation protein HypE	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-4,16	
Y958_RS17740	msrB	peptide-methionine (R)-S-oxide reductase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	9,02	
Y958_RS17855		glutathione-dependent reductase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,57	
Y958_RS18400		XdhC/CoxI family protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	4,58	
Y958_RS18870	fdhE	formate dehydrogenase accessory protein FdhE	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	4,66	
Y958_RS19915		alkyl hydroperoxide reductase subunit F	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	8,06	
Y958_RS20070		serine protease	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	16,90	3,26
Y958_RS20330		endopeptidase La	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	3,12	1,98
Y958_RS20950		hypothetical protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,57	
Y958_RS21000		lipo	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		-1,54

Y958_RS21630		molecular chaperone DnaJ	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-6,65	
Y958_RS26750		AAA family ATPase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-46,81	
Y958_RS26755		Hsp20/alpha crystallin family protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-38,22	
Y958_RS26820	groL	molecular chaperone GroEL	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-20,26	
Y958_RS27245		anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,72	
Y958_RS27510		aspartyl beta-hydroxylase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-4,31	
Y958_RS27545		peptidase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2,63	2,28
Y958_RS28370		glycosyl transferase family 1	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-2,50	
Y958_RS29560		U32 family peptidase	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-18,25	
Y958_RS29810		hypothetical protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-10,75	
Y958_RS30265		molecular chaperone Hsp20	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones		5,86
Y958_RS30530		hypothetical protein	O	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	-70,72	
Y958_RS10490		thiol:disulfide interchange protein	OC	Multiple classes	3,80	
Y958_RS28250		hypothetical protein	OC	Multiple classes	-9,22	
Y958_RS15570	hypB	hydrogenase accessory protein HypB	OK	Multiple classes	-2,52	
Y958_RS08605		ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	OU	Multiple classes	2,09	
Y958_RS13300		serine protease	OU	Multiple classes	-3,68	
Y958_RS00955		iron transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	8,94	
Y958_RS00960	feoB	ferrous iron transport protein B	P	Inorganic ion transport and metabolism	8,85	
Y958_RS01265	phoU	phosphate transport system regulatory protein PhoU	P	Inorganic ion transport and metabolism	2,71	
Y958_RS02200		K ⁺ /H ⁺ antiporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	3,24	
Y958_RS02560		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,30	
Y958_RS02615	trkD	potassium transporter Kup	P	Inorganic ion transport and metabolism	4,62	
Y958_RS03085		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-32,40	
Y958_RS03160		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-5,30	
Y958_RS03595		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	3,98	
Y958_RS03665	fieF	divalent metal cation transporter FieF	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,48	
Y958_RS03675		anion transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	6,07	
Y958_RS03700		Fur family transcriptional regulator	P	Inorganic ion transport and metabolism	4,59	

Y958_RS04510		TonB-dependent siderophore receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	12,55	
Y958_RS05810		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-3,12	
Y958_RS06235		nitrogen fixation protein FixH	P	Inorganic ion transport and metabolism	-12,81	
Y958_RS06240		copper-translocating P-type ATPase	P	Inorganic ion transport and metabolism	-5,83	
Y958_RS06535		ATPase	P	Inorganic ion transport and metabolism	-10,10	
Y958_RS07020		NADPH-dependent ferric siderophore reductase	P	Inorganic ion transport and metabolism	6,43	
Y958_RS07040		copper-translocating P-type ATPase	P	Inorganic ion transport and metabolism	2,05	
Y958_RS08900		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,68	
Y958_RS10110		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-5,44	
Y958_RS11815		chloride channel protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	5,36	
Y958_RS11835	pstS	phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS	P	Inorganic ion transport and metabolism	-4,16	-1,70
Y958_RS11840		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-4,23	
Y958_RS12745		copper-translocating P-type ATPase	P	Inorganic ion transport and metabolism	-21,56	
Y958_RS13475		transcriptional repressor	P	Inorganic ion transport and metabolism	3,80	
Y958_RS13625		nitrate ABC transporter ATP-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-4,55	
Y958_RS13730		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-7,89	
Y958_RS13755		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-13,64	
Y958_RS15075		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,78	
Y958_RS15140		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-4,62	
Y958_RS15295		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,50	
Y958_RS15375		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-7,97	
Y958_RS16175		nitrate transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism		-1,71
Y958_RS16315		sulfatase	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,89	
Y958_RS16355		DNA starvation/stationary phase protection protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	3,32	1,80
Y958_RS16485		dicarboxylate transporter/tellurite-resistance protein TehA	P	Inorganic ion transport and metabolism	9,11	
Y958_RS16585		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-3,05	
Y958_RS17670		adenylyl-sulfate kinase	P	Inorganic ion transport and metabolism	-4,21	
Y958_RS17885		porin	P	Inorganic ion transport and metabolism	19,79	
Y958_RS18430		nitrate ABC transporter substrate-binding	P	Inorganic ion transport and metabolism		-1,51
Y958_RS18515		sodium-independent anion transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	-3,20	
Y958_RS19245		GNAT family N-acetyltransferase	P	Inorganic ion transport and metabolism	3,40	
Y958_RS19325		iron permease	P	Inorganic ion transport and metabolism	2,88	
Y958_RS19645		TonB-dependent siderophore receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	84,89	
Y958_RS19685		TonB-dependent siderophore receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	30,65	

Y958_RS19935		ABC transporter permease	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,92	-1,50
Y958_RS20765		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-13,04	
Y958_RS21555		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-324,54	
Y958_RS22240		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,21	
Y958_RS22280		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-15,19	
Y958_RS23035		ammonia channel protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-8,07	
Y958_RS23265		TonB-dependent siderophore receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	16,91	
Y958_RS23855		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-17,50	
Y958_RS24750		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-3,62	
Y958_RS25240		myristoyl transferase	P	Inorganic ion transport and metabolism	-28,05	
Y958_RS25245		ABC transporter permease	P	Inorganic ion transport and metabolism	-104,20	
Y958_RS25250		sulfonate ABC transporter ATP-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-41,14	
Y958_RS25425		ABC transporter substrate-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	77,03	
Y958_RS25760		sulfonate ABC transporter substrate-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-18,46	
Y958_RS25770	ssuC	alkanesulfonate transporter permease subunit	P	Inorganic ion transport and metabolism	-5,39	
Y958_RS25775		aliphatic sulfonate ABC transporter ATP-binding protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-6,05	
Y958_RS26395		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-6,64	
Y958_RS26495		TonB-dependent siderophore receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-3,56	
Y958_RS26845	mgtA	magnesium-translocating P-type ATPase	P	Inorganic ion transport and metabolism	-11,41	
Y958_RS26950		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-11,98	-1,60
Y958_RS27890		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,32	
Y958_RS28780		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,33	
Y958_RS28835		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-22,34	
Y958_RS30070		TonB-dependent receptor	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,03	
Y958_RS30450		CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter	P	Inorganic ion transport and metabolism	10,77	
Y958_RS30670		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-2,70	
Y958_RS30720		hypothetical protein	P	Inorganic ion transport and metabolism	-3,57	
Y958_RS03880		2Fe-2S ferredoxin	PR	Multiple classes	-3,94	
Y958_RS16155		nitrite reductase (NAD(P)H) small subunit	PR	Multiple classes		1,78
Y958_RS21915		(2Fe-2S)-binding protein	PR	Multiple classes	-3,06	
Y958_RS23465		(2Fe-2S)-binding protein	PR	Multiple classes	-10,44	
Y958_RS28525		iron dicitrate transport regulator FecR	PT	Multiple classes	-2,13	
Y958_RS02110		amidohydrolase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-8,31	

Y958_RS02675	hypothetical protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	4,80	
Y958_RS04140	toluene tolerance protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	3,49	
Y958_RS08575	MCE family protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-2,97	
Y958_RS08580	ABC transporter ATP-binding protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-2,22	
Y958_RS08585	ABC transporter permease	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-2,61	
Y958_RS12435	TetR family transcriptional regulator	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	3,01	
Y958_RS13330	ABC transporter	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	7,04	
Y958_RS13335	glycosyl transferase family 1	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	4,46	
Y958_RS13810	amidohydrolase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-3,11	
Y958_RS14010	mlaD outer membrane lipid asymmetry maintenance protein MlaD	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2,31	
Y958_RS14165	disulfide bond formation protein DsbA	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	10,19	8,54
Y958_RS14320	phytanoyl-CoA dioxygenase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-3,48	-1,60
Y958_RS16635	hypothetical protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-2,20	
Y958_RS17170	carboxymethylenebutenolidase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-2,62	
Y958_RS19805	Xaa-Pro dipeptidase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-2,57	
Y958_RS21310	hypothetical protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2,61	
Y958_RS21860	amidohydrolase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-3,08	
Y958_RS22585	hypothetical protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2,26	
Y958_RS23500	taurine dioxygenase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-2,30	
Y958_RS24060	hypothetical protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-11,25	
Y958_RS26320	non-ribosomal peptide synthetase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2,54	
Y958_RS26775	hypothetical protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-4,62	
Y958_RS28230	copper oxidase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-16,43	
Y958_RS28460	L-ascorbate oxidase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-31,15	

Y958_RS29360	methoxymalonyl-ACP biosynthesis protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-6,46	
Y958_RS29840	hypothetical protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-5,68	
Y958_RS29845	hypothetical protein	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-4,04	
Y958_RS31105	hydrolase	Q	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	-11,48	
Y958_RS29830	cyclic peptide transporter	QP	Multiple classes	-4,26	
Y958_RS00110	hypothetical protein	R	General function prediction only	24,72	
Y958_RS00130	anion permease	R	General function prediction only	-2,54	
Y958_RS00395	peptidase C26	R	General function prediction only	3,13	
Y958_RS00455	hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,56	
Y958_RS00580	Rossmann fold protein, TIGR00730 family	R	General function prediction only	3,21	
Y958_RS00610	N-acetyltransferase	R	General function prediction only		-1,81
Y958_RS00770	nuclease PIN	R	General function prediction only	2,60	
Y958_RS01055	23S rRNA (adenine(2503)-C(2))-methyltransferase RlmN	R	General function prediction only	2,46	
Y958_RS01060	alpha/beta hydrolase	R	General function prediction only	-3,19	
Y958_RS01430	peptidase S16	R	General function prediction only	6,63	
Y958_RS01470	short-chain dehydrogenase/reductase	R	General function prediction only	8,94	
Y958_RS01500	flavin reductase	R	General function prediction only	5,08	
Y958_RS01655	hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,24	
Y958_RS01675	hypothetical protein	R	General function prediction only	5,54	
Y958_RS01915	YihA family ribosome biogenesis GTP-binding protein	R	General function prediction only	4,15	
Y958_RS01945	trans-aconitate 2-methyltransferase	R	General function prediction only	4,88	
Y958_RS02220	Appr-1-p processing protein	R	General function prediction only	-2,08	
Y958_RS02310	preprotein translocase subunit TatC	R	General function prediction only	4,58	
Y958_RS02715	hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,72	
Y958_RS02840	mononuclear molybdenum enzyme YedY	R	General function prediction only	3,58	
Y958_RS03070	type II toxin-antitoxin system mRNA interferase toxin, RelE/StbE family	R	General function prediction only	6,24	
Y958_RS03330	peptidase M16	R	General function prediction only	-2,80	
Y958_RS03515	SUF system Fe-S cluster assembly protein	R	General function prediction only	14,77	
Y958_RS03555	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV	R	General function prediction only		1,65
Y958_RS03705	GTP-binding protein	R	General function prediction only	4,34	
Y958_RS03995	hypothetical protein	R	General function prediction only	3,10	
Y958_RS04430	hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,84	

Y958_RS04475		tautomerase family protein	R	General function prediction only	4,93	
Y958_RS04570		hypothetical protein	R	General function prediction only	2,95	
Y958_RS04665		esterase	R	General function prediction only	-12,58	
Y958_RS04865		hypothetical protein	R	General function prediction only	-3,56	
Y958_RS05650		alpha/beta hydrolase	R	General function prediction only	9,77	
Y958_RS05655		acetyltransferase	R	General function prediction only	29,35	
Y958_RS05710		alpha/beta hydrolase	R	General function prediction only	-2,67	
Y958_RS05920		SAM-dependent methyltransferase	R	General function prediction only	4,03	
Y958_RS06010		hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,48	
Y958_RS06155		Rossmann fold protein, TIGR00730 family type II toxin-antitoxin system mRNA interferase	R	General function prediction only	3,36	
Y958_RS06320		toxin, RelE/StbE family	R	General function prediction only	2,68	
Y958_RS06435		hypothetical protein	R	General function prediction only	3,17	
Y958_RS06475		triacylglycerol lipase	R	General function prediction only	-4,88	
Y958_RS06480		amidohydrolase	R	General function prediction only	-4,59	
Y958_RS06485		hypothetical protein	R	General function prediction only	-7,69	
Y958_RS06540		hypothetical protein	R	General function prediction only	-3,20	
Y958_RS07035		GTPase Era	R	General function prediction only	2,26	
Y958_RS07115		hypothetical protein	R	General function prediction only	3,22	
Y958_RS07550		2-nitropropane dioxygenase	R	General function prediction only	4,58	
Y958_RS07780	hflX	GTPase HflX	R	General function prediction only	3,17	
Y958_RS07785		RNA-binding protein Hfq	R	General function prediction only	2,39	
Y958_RS07860		RNA-binding protein	R	General function prediction only	7,57	
Y958_RS08025		competence protein ComEC	R	General function prediction only	2,36	
Y958_RS08570		hypothetical protein	R	General function prediction only	-3,83	
Y958_RS08775		amidohydrolase	R	General function prediction only		-3,15
Y958_RS08965		oxidoreductase	R	General function prediction only	5,22	
Y958_RS09270		peptidase M28	R	General function prediction only	2,17	
Y958_RS09405		PEBP family protein	R	General function prediction only	3,42	
Y958_RS09750		alpha/beta hydrolase	R	General function prediction only	3,59	
Y958_RS10065		hypothetical protein	R	General function prediction only	2,34	
Y958_RS10115		hypothetical protein	R	General function prediction only	-4,42	
Y958_RS10120		RND transporter	R	General function prediction only	-4,34	
Y958_RS10145		cytochrome c family	R	General function prediction only		-2,06
Y958_RS10150		hypothetical protein	R	General function prediction only	6,69	
Y958_RS10165		hydroxyacylglutathione hydrolase	R	General function prediction only		-1,51

Y958_RS10200		glyoxalase	R	General function prediction only	-3,91	
Y958_RS10210		hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,37	
Y958_RS10575		homoserine kinase	R	General function prediction only	2,31	
Y958_RS10685		metalloprotease TldD	R	General function prediction only	3,75	
Y958_RS10765		modulator protein	R	General function prediction only	3,31	
Y958_RS10840		cell division protein ZapE	R	General function prediction only	3,40	
Y958_RS11345		haloacid dehalogenase	R	General function prediction only	2,59	
Y958_RS11355	obgE	GTPase ObgE	R	General function prediction only	5,01	1,74
Y958_RS12100		MOSC domain-containing	R	General function prediction only		1,65
Y958_RS12225		amidohydrolase	R	General function prediction only	3,35	
Y958_RS12345		peptidase C56	R	General function prediction only	2,21	2,69
Y958_RS12365		haloacid dehalogenase	R	General function prediction only	2,52	
Y958_RS12495		exclusion protein FxsA	R	General function prediction only	6,38	
Y958_RS12540		subclass B3 metallo-beta-lactamase	R	General function prediction only	2,17	
Y958_RS12685		hypothetical protein	R	General function prediction only	4,89	
Y958_RS12840		ABC transporter permease	R	General function prediction only	7,01	
Y958_RS13270		RNase adaptor protein RapZ	R	General function prediction only	2,07	
Y958_RS13280		patatin	R	General function prediction only	2,19	
Y958_RS13360		NAD(P) FAD-dependent oxidoreductase	R	General function prediction only		-1,66
Y958_RS13480		nitronate monooxygenase	R	General function prediction only	2,20	
Y958_RS13580	mtnK	S-methyl-5-thioribose kinase	R	General function prediction only	-2,17	
Y958_RS14085		methyltransferase	R	General function prediction only	3,26	
Y958_RS15770		oxidoreductase	R	General function prediction only	-3,73	
Y958_RS16055		galactose 1-dehydrogenase	R	General function prediction only	3,11	
Y958_RS16350		alpha/beta hydrolase	R	General function prediction only	4,35	
Y958_RS16360		hypothetical protein	R	General function prediction only	11,93	
Y958_RS16655		hypothetical protein	R	General function prediction only	-4,39	
Y958_RS16765		short-chain dehydrogenase	R	General function prediction only	-4,36	
Y958_RS16850		tRNA-binding protein	R	General function prediction only	-4,15	
Y958_RS17685		glutaryl-7-ACA acylase	R	General function prediction only	3,52	
Y958_RS17700		hydroxyacid dehydrogenase	R	General function prediction only	12,58	2,89
Y958_RS18040		alpha/beta hydrolase	R	General function prediction only	3,03	
Y958_RS18210	lptG	LPS export ABC transporter permease LptG	R	General function prediction only	5,23	
Y958_RS18215	lptF	LPS export ABC transporter permease LptF	R	General function prediction only	4,42	
Y958_RS18265		aminodeoxychorismate lyase	R	General function prediction only	2,06	

Y958_RS18405		4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase	R	General function prediction only	4,06	
Y958_RS18525		phosphoglycolate bacterial	R	General function prediction only		-6,05
Y958_RS18855		hypothetical protein	R	General function prediction only	4,31	
Y958_RS18960		type 1 glutamine amidotransferase domain-containing	R	General function prediction only		24,77
Y958_RS19160	fghA	S-formylglutathione hydrolase	R	General function prediction only	6,43	
Y958_RS19250		GNAT family N-acetyltransferase	R	General function prediction only	2,15	
Y958_RS19270		N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	R	General function prediction only	-5,43	
Y958_RS19640		peptidase M16	R	General function prediction only	3,55	
Y958_RS19650		hypothetical protein	R	General function prediction only	-9,08	
Y958_RS19655		plasmid stabilization protein	R	General function prediction only	-9,40	
Y958_RS19710		GNAT family N-acetyltransferase	R	General function prediction only	4,41	
Y958_RS19745		hypothetical protein	R	General function prediction only	-9,21	
Y958_RS19820		oxidase	R	General function prediction only	2,69	
Y958_RS20105		hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,51	
Y958_RS20520		VapC toxin family PIN domain ribonuclease	R	General function prediction only	-7,38	
Y958_RS20665		hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,35	
Y958_RS20850		alpha/beta hydrolase	R	General function prediction only	2,46	
Y958_RS21035		X-Pro dipeptidyl-peptidase	R	General function prediction only	-3,69	
Y958_RS21245		phosphotransferase family protein	R	General function prediction only	-4,52	
Y958_RS21360		hypothetical protein	R	General function prediction only	-5,69	
Y958_RS21365		hypothetical protein	R	General function prediction only	-4,47	
Y958_RS21495		glycine cleavage system protein T	R	General function prediction only	7,22	3,96
Y958_RS21640		alcohol dehydrogenase AdhP	R	General function prediction only	-10,20	
Y958_RS21945		BMP family ABC transporter substrate-binding protein	R	General function prediction only	-2,71	
Y958_RS22190		glyoxalase/bleomycin resistance/extradial dioxygenase family protein	R	General function prediction only	2,94	
Y958_RS22520		formate dehydrogenase subunit alpha	R	General function prediction only	2,71	
Y958_RS22730		histidine kinase	R	General function prediction only	-7,64	
Y958_RS22890		aryl-sulfate sulfotransferase	R	General function prediction only		-1,65
Y958_RS22950		alkaline phosphatase	R	General function prediction only	-2,47	
Y958_RS22980		flavin reductase	R	General function prediction only	-2,85	
Y958_RS23355		hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,26	
Y958_RS23520	wrbA	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV	R	General function prediction only	-3,21	
Y958_RS24755		Asp/Glu/hydantoin racemase	R	General function prediction only	4,05	

Y958_RS24760	hypothetical protein	R	General function prediction only	4,75
Y958_RS24825	short-chain dehydrogenase/reductase	R	General function prediction only	13,04
Y958_RS24925	glycosyl transferase family 1	R	General function prediction only	2,78
Y958_RS25150	hypothetical protein	R	General function prediction only	-3,94
Y958_RS25180	hypothetical protein	R	General function prediction only	3,96
Y958_RS25820	alpha/beta hydrolase	R	General function prediction only	2,83
Y958_RS26700	radical SAM protein	R	General function prediction only	2,93
Y958_RS26705	lipopolysaccharide biosynthesis protein	R	General function prediction only	4,08
Y958_RS26770	phosphoribosyltransferase	R	General function prediction only	-7,04
Y958_RS26800	hypothetical protein	R	General function prediction only	-4,41
Y958_RS26810	hypothetical protein	R	General function prediction only	-29,93
Y958_RS26815	hypothetical protein	R	General function prediction only	-52,34
Y958_RS26825	BAX inhibitor (BI)-1/YccA family protein	R	General function prediction only	-11,96
Y958_RS26875	hypothetical protein	R	General function prediction only	-12,89
Y958_RS27205	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	R	General function prediction only	-2,64
Y958_RS27240	hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,70
Y958_RS27410	muramidase	R	General function prediction only	-7,04
Y958_RS28030	GHMP kinase	R	General function prediction only	-2,69
Y958_RS28215	short-chain dehydrogenase	R	General function prediction only	2,92
Y958_RS28300	short-chain dehydrogenase	R	General function prediction only	-3,04
Y958_RS28360	hypothetical protein	R	General function prediction only	-2,75
Y958_RS28840	sodium transporter	R	General function prediction only	-8,32
Y958_RS29165	MBL fold metallo-hydrolase	R	General function prediction only	-4,64
Y958_RS29345	hypothetical protein	R	General function prediction only	-5,87
Y958_RS29575	hypothetical protein	R	General function prediction only	7,34
Y958_RS29610	globin	R	General function prediction only	6,86
Y958_RS30285	hypothetical protein	R	General function prediction only	2,80
Y958_RS30545	3-isopropylmalate dehydrogenase	R	General function prediction only	-14,46
Y958_RS30570	alcohol dehydrogenase	R	General function prediction only	-16,45
Y958_RS30585	site-2 protease family protein	R	General function prediction only	-11,04
Y958_RS30915	GNAT family N-acetyltransferase	R	General function prediction only	-5,15
Y958_RS30940	hypothetical protein	R	General function prediction only	-4,42
Y958_RS18440	serine/threonine protein kinase	RTKL	Multiple classes	-5,19
Y958_RS00150	hypothetical protein	S	Function unknown	2,99
Y958_RS00335	DUF393 domain-containing protein	S	Function unknown	-7,46

Y958_RS00345		hypothetical protein	S	Function unknown	-4,36	
Y958_RS01325		hypothetical protein	S	Function unknown	2,71	
Y958_RS01420		hypothetical protein	S	Function unknown	2,91	
Y958_RS01425		hypothetical protein	S	Function unknown	3,31	
Y958_RS01610		hypothetical protein	S	Function unknown	3,09	
Y958_RS01615	lptC	LPS export ABC transporter periplasmic protein LptC	S	Function unknown	2,41	
Y958_RS01900		hypothetical protein	S	Function unknown	-3,22	
Y958_RS01925		membrane protein insertion efficiency factor YidD	S	Function unknown	4,87	
Y958_RS02155		hypothetical protein	S	Function unknown	5,65	
Y958_RS02250		DUF1223 domain-containing protein	S	Function unknown	4,36	
Y958_RS02285		hypothetical protein	S	Function unknown	2,69	
Y958_RS02490		YitT family protein	S	Function unknown	-9,58	
Y958_RS02640		Uncharacterized conserved DUF1501 family	S	Function unknown		-3,40
Y958_RS02690		hypothetical protein	S	Function unknown	4,38	
Y958_RS02800		hypothetical protein	S	Function unknown	5,57	
Y958_RS02870		bleomycin resistance protein	S	Function unknown	5,32	
Y958_RS03080		hypothetical protein	S	Function unknown	-10,28	
Y958_RS03100	rsfS	ribosome silencing factor	S	Function unknown	2,20	
Y958_RS03205		hypothetical protein	S	Function unknown	2,97	
Y958_RS03215		prolyl-tRNA editing protein	S	Function unknown	3,32	
Y958_RS03510		Fe-S cluster assembly scaffold SufA	S	Function unknown	11,48	
Y958_RS03840		phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	S	Function unknown	2,40	
Y958_RS03890		dioxygenase	S	Function unknown	4,64	
Y958_RS03905		DUF2312 domain-containing protein	S	Function unknown	2,34	
Y958_RS03910		hypothetical protein	S	Function unknown	4,29	2,51
Y958_RS04010		hypothetical protein	S	Function unknown	-2,00	
Y958_RS04240		CREA protein	S	Function unknown	-2,51	
Y958_RS04360		hypothetical protein	S	Function unknown	7,44	
Y958_RS05620		antibiotic biosynthesis monooxygenase	S	Function unknown	18,64	
Y958_RS05800		hypothetical protein	S	Function unknown	5,62	
Y958_RS05835		hypothetical protein	S	Function unknown	-7,11	
Y958_RS05990		hypothetical protein	S	Function unknown	-3,86	
Y958_RS06190		phosphoribosylformylglycinamide synthase	S	Function unknown	-6,75	
Y958_RS06205		hypothetical protein	S	Function unknown	-14,15	

Y958_RS06325	succinate dehydrogenase assembly factor 2	S	Function unknown	2,33	
Y958_RS06350	hypothetical protein	S	Function unknown	-8,05	
Y958_RS06370	spore coat protein	S	Function unknown	-2,72	
Y958_RS06385	spore coat protein	S	Function unknown	-19,65	
Y958_RS06660	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,04	
Y958_RS06665	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,72	
Y958_RS06895	transport protein	S	Function unknown	5,27	
Y958_RS07685	IMP dehydrogenase	S	Function unknown	-4,64	
Y958_RS07700	hypothetical protein	S	Function unknown	-5,61	
Y958_RS07965	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,11	
Y958_RS07970	hypothetical protein	S	Function unknown	-2,24	
Y958_RS08665	bestrophin	S	Function unknown	-2,66	
Y958_RS09075	hypothetical protein YebC/PmpR family DNA-binding transcriptional regulator	S	Function unknown	2,38	
Y958_RS09530	cytoplasmic protein	S	Function unknown	4,52	
Y958_RS09855	cytoplasmic protein	S	Function unknown	2,34	
Y958_RS09940	DUF1778 domain-containing protein	S	Function unknown	2,38	
Y958_RS09970	MraZ family transcriptional regulator	S	Function unknown	-2,28	
Y958_RS09980	hypothetical protein	S	Function unknown	-2,97	
Y958_RS10220	hypothetical protein	S	Function unknown	-36,03	
Y958_RS10380	hypothetical protein	S	Function unknown	-2,46	
Y958_RS10410	hypothetical protein	S	Function unknown	2,13	
Y958_RS10610	hypothetical protein	S	Function unknown	-6,08	
Y958_RS10645	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,00	-1,52
Y958_RS10650	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,28	
Y958_RS10800	hypothetical protein	S	Function unknown	2,53	
Y958_RS10940	hypothetical protein	S	Function unknown	3,02	
Y958_RS11150	hypothetical protein	S	Function unknown	-7,10	
Y958_RS11155	DUF4810 domain-containing protein	S	Function unknown	-6,55	
Y958_RS11305	hypothetical protein	S	Function unknown	3,31	
Y958_RS11435	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,63	
Y958_RS11875	hypothetical protein	S	Function unknown	3,53	
Y958_RS12155	membrane protein	S	Function unknown	-4,89	
Y958_RS12380	hypothetical protein	S	Function unknown	-2,49	
Y958_RS12450	hypothetical protein	S	Function unknown	6,71	2,28
Y958_RS12490	translocase	S	Function unknown	8,35	2,31

Y958_RS12520	hypothetical protein	S	Function unknown	2,04	
Y958_RS12680	hypothetical protein	S	Function unknown	21,46	
Y958_RS12750	hypothetical protein	S	Function unknown	-40,44	
Y958_RS13515	Twin-arginine translocation pathway signal	S	Function unknown	15,58	
Y958_RS13560	ribosome maturation factor RimP	S	Function unknown	2,17	
Y958_RS13745	rubrerythrin	S	Function unknown	-3,06	
Y958_RS13825	hypothetical protein	S	Function unknown	3,31	
Y958_RS14195	hypothetical protein	S	Function unknown	-5,45	
Y958_RS14350	hypothetical protein	S	Function unknown	-2,72	
Y958_RS16090	FAH family protein	S	Function unknown	5,99	
Y958_RS16650	hypothetical protein	S	Function unknown	-7,30	
Y958_RS16660	GNAT family N-acetyltransferase	S	Function unknown	3,78	
Y958_RS17045	hypothetical protein	S	Function unknown	3,47	
Y958_RS17095	hypothetical protein	S	Function unknown	-8,02	
Y958_RS17215	hypothetical protein	S	Function unknown	3,67	
Y958_RS17355	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,09	
Y958_RS17495	hypothetical protein	S	Function unknown	8,67	
Y958_RS17580	tatB twin-arginine translocase subunit TatB	S	Function unknown	4,43	
Y958_RS17880	band 7 protein	S	Function unknown	-7,18	
Y958_RS18120	hypothetical protein	S	Function unknown	4,26	
Y958_RS18165	iron-sulfur cluster assembly accessory protein	S	Function unknown	7,63	
Y958_RS18395	carbon monoxide dehydrogenase	S	Function unknown		-1,76
Y958_RS18550	hypothetical protein	S	Function unknown	2,08	
Y958_RS18650	hypothetical protein	S	Function unknown	-8,08	
Y958_RS18970	antibiotic biosynthesis monooxygenase	S	Function unknown	14,63	33,01
Y958_RS19155	hypothetical protein	S	Function unknown	4,43	
Y958_RS19255	FUSC family protein	S	Function unknown	7,78	
Y958_RS19335	hypothetical protein	S	Function unknown	3,15	
Y958_RS19555	hypothetical protein	S	Function unknown	8,64	
Y958_RS19925	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,09	
Y958_RS19980	hypothetical protein	S	Function unknown	-9,55	
Y958_RS20065	hypothetical protein	S	Function unknown	20,52	2,11
Y958_RS20150	DUF885 domain-containing protein	S	Function unknown	3,10	
Y958_RS20380	hypothetical protein	S	Function unknown	-2,90	
Y958_RS20860	hypothetical protein	S	Function unknown	-5,27	

Y958_RS20955		hypothetical protein	S	Function unknown	9,42	3,53
Y958_RS21120		protease	S	Function unknown	-8,24	-1,53
Y958_RS21215		hypothetical protein	S	Function unknown	-6,63	
Y958_RS21275		MFS transporter	S	Function unknown	-2,38	
Y958_RS21315	ppk2	polyphosphate kinase 2	S	Function unknown	-14,22	
Y958_RS21355		hypothetical protein	S	Function unknown	-6,16	
Y958_RS21560		hypothetical protein	S	Function unknown	-7,72	
Y958_RS21625		hypothetical protein	S	Function unknown	-8,52	
Y958_RS21695		hypothetical protein	S	Function unknown	2,01	
Y958_RS21750		XRE family transcriptional regulator	S	Function unknown	-4,60	
Y958_RS21810		hypothetical protein	S	Function unknown	2,70	
Y958_RS22285		hypothetical protein	S	Function unknown	-2,37	
Y958_RS22350	uraD	OHCU decarboxylase	S	Function unknown	-16,67	
Y958_RS22395		cysteine desulfurase	S	Function unknown	-5,31	
Y958_RS22605		PTS cellobiose transporter	S	Function unknown	4,11	
Y958_RS22740		polyisoprenoid-binding protein	S	Function unknown	3,69	
Y958_RS22750		hypothetical protein	S	Function unknown	7,07	
Y958_RS22755		hypothetical protein	S	Function unknown	2,58	
Y958_RS22760		hypothetical protein	S	Function unknown	5,20	
Y958_RS23255		hypothetical protein	S	Function unknown	10,54	
Y958_RS23260		PKHD-type hydroxylase	S	Function unknown	8,87	
Y958_RS24005		hypothetical protein	S	Function unknown	-3,28	
Y958_RS24810		cytoplasmic protein	S	Function unknown	11,35	
Y958_RS24965		rubrerythrin family protein	S	Function unknown	-16,97	
Y958_RS25265		class III aminotransferase	S	Function unknown	-6,04	
Y958_RS26135	gspH	type II secretion system protein GspH	S	Function unknown	-2,59	
Y958_RS26270		peptidase	S	Function unknown	27,67	
Y958_RS26625		hypothetical protein	S	Function unknown	-14,13	
Y958_RS26785		hypothetical protein	S	Function unknown	-98,41	
Y958_RS26805		hypothetical protein	S	Function unknown	-61,19	
Y958_RS26885		GTP-binding protein	S	Function unknown	-15,48	
Y958_RS26890		serine hydrolase	S	Function unknown	-4,97	
Y958_RS27405		hypothetical protein	S	Function unknown	-2,04	
Y958_RS27960		DUF885 domain-containing protein	S	Function unknown	6,17	
Y958_RS28145		XRE family transcriptional regulator	S	Function unknown	-2,70	

Y958_RS28415	Tat pathway signal protein	S	Function unknown	3,94	
Y958_RS29140	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,38	
Y958_RS29820	hypothetical protein	S	Function unknown	-17,80	
Y958_RS30050	hypothetical protein	S	Function unknown	2,74	
Y958_RS30305	hypothetical protein	S	Function unknown	-6,94	
Y958_RS30470	Ku protein	S	Function unknown	-3,53	
Y958_RS30890	hypothetical protein	S	Function unknown	-3,18	
Y958_RS30920	microcystin-dependent protein	S	Function unknown	-7,18	
Y958_RS30925	phage tail protein	S	Function unknown	-6,76	
Y958_RS30930	phage tail protein	S	Function unknown	-14,83	
Y958_RS00525	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,17	
Y958_RS00860	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	4,33	
Y958_RS01065	Crp/Fnr family transcriptional regulator	T	Signal transduction mechanisms	-6,73	-1,96
Y958_RS01130	BolA family transcriptional regulator	T	Signal transduction mechanisms	2,74	
Y958_RS01785	response regulator	T	Signal transduction mechanisms	-2,65	
Y958_RS01790	Crp/Fnr family transcriptional regulator	T	Signal transduction mechanisms	-19,10	
Y958_RS01895	diguanylate cyclase	T	Signal transduction mechanisms	-2,42	
Y958_RS02970	protein tyrosine phosphatase	T	Signal transduction mechanisms	3,12	
Y958_RS03225	two-component sensor histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	2,39	
Y958_RS03470	universal stress protein UspA	T	Signal transduction mechanisms	-17,49	
Y958_RS03745	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	2,04	
Y958_RS03825	PhoH family protein	T	Signal transduction mechanisms	-8,84	
Y958_RS04295	two-component system response regulator	T	Signal transduction mechanisms	-4,24	
Y958_RS06200	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-12,36	
Y958_RS06260	GGDEF domain-containing protein	T	Signal transduction mechanisms	-5,69	
Y958_RS06560	BolA family transcriptional regulator	T	Signal transduction mechanisms	4,03	1,65
Y958_RS06580	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-10,36	
Y958_RS06585	histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	-4,54	
Y958_RS07290	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	6,86	
Y958_RS07405	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,24	
Y958_RS07810	nrnC nitrogen regulation protein NR(I)	T	Signal transduction mechanisms	-2,59	
Y958_RS07815	two-component sensor histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	-2,25	
Y958_RS08780	two-component sensor histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	2,94	
Y958_RS09575	GGDEF domain-containing protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,10	
Y958_RS10105	GGDEF domain-containing protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,04	

Y958_RS10325	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-3,16	-1,57
Y958_RS11060	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-3,17	
Y958_RS11795	typA translational GTPase TypA	T	Signal transduction mechanisms	2,03	
Y958_RS12175	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,63	
Y958_RS13235	sensor histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	2,29	
Y958_RS14050	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,00	
Y958_RS15630	two-component sensor histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	3,92	
Y958_RS16170	protein phosphatase	T	Signal transduction mechanisms	-3,40	
Y958_RS16320	ATP-binding protein	T	Signal transduction mechanisms	2,97	
Y958_RS16550	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	5,80	
Y958_RS17105	histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	-2,81	
Y958_RS17115	GGDEF-domain containing protein	T	Signal transduction mechanisms	-3,88	
Y958_RS17190	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-3,33	
Y958_RS18235	two-component sensor histidine kinase bifunctional diguanylate	T	Signal transduction mechanisms	8,36	
Y958_RS19010	cyclase/phosphodiesterase	T	Signal transduction mechanisms	-2,41	
Y958_RS19285	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,24	
Y958_RS19465	sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator	T	Signal transduction mechanisms	-3,01	
Y958_RS19470	histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	-4,03	
Y958_RS19545	diguanylate cyclase response regulator	T	Signal transduction mechanisms	-2,54	
Y958_RS20080	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	12,47	
Y958_RS20405	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,06	
Y958_RS20805	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,83	
Y958_RS21270	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,86	
Y958_RS21505	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,06	
Y958_RS21665	GGDEF domain-containing protein	T	Signal transduction mechanisms	-3,23	
Y958_RS22070	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-4,47	
Y958_RS22085	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,44	
Y958_RS22550	GGDEF-domain containing protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,98	
Y958_RS22560	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	2,48	
Y958_RS23015	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	2,34	
Y958_RS23025	histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms		-1,88
Y958_RS23295	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-3,31	
Y958_RS23300	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-6,90	
Y958_RS23690	hybrid sensor histidine kinase/response regulator	T	Signal transduction mechanisms	-5,29	

Y958_RS23835	two-component system response regulator	T	Signal transduction mechanisms	-26,39	
Y958_RS24150	histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	-3,87	
Y958_RS25255	ATPase sigma-54-dependent Fis family transcriptional regulator	T	Signal transduction mechanisms	-24,94	-2,44
Y958_RS25260	ATPase	T	Signal transduction mechanisms	-8,48	
Y958_RS26195	universal stress protein	T	Signal transduction mechanisms	-5,17	
Y958_RS26790	universal stress protein	T	Signal transduction mechanisms	-30,97	
Y958_RS26840	hybrid sensor histidine kinase/response regulator	T	Signal transduction mechanisms	-33,25	
Y958_RS27110	two-component system response regulator	T	Signal transduction mechanisms	-2,51	
Y958_RS27115	protein-glutamate methyltransferase	T	Signal transduction mechanisms	-4,79	
Y958_RS27350	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-5,49	
Y958_RS27540	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	-2,13	
Y958_RS28585	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	5,47	
Y958_RS29435	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	2,60	
Y958_RS29445	histidine kinase	T	Signal transduction mechanisms	4,10	
Y958_RS30330	hypothetical protein	T	Signal transduction mechanisms	8,32	
Y958_RS30525	universal stress protein	T	Signal transduction mechanisms	-21,50	
Y958_RS30535	universal stress protein hybrid sensor histidine kinase/response regulator	T	Signal transduction mechanisms	-36,16	-1,58
Y958_RS31030	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	-2,52	
Y958_RS00170	two-component system response regulator	TK	Multiple classes	-10,51	
Y958_RS02195	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	4,91	
Y958_RS04200	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	-4,96	-1,94
Y958_RS08785	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	6,34	
Y958_RS08990	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	-2,08	
Y958_RS13510	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	4,83	
Y958_RS16325	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	3,28	
Y958_RS16380	two-component system response regulator	TK	Multiple classes	-2,59	
Y958_RS18230	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	8,58	
Y958_RS20075	DNA-binding response regulator	TK	Multiple classes	16,00	
Y958_RS27345	response regulator	TK	Multiple classes	-3,94	
Y958_RS16640	hypothetical protein	TQ	Multiple classes	-2,40	
Y958_RS01415	antibiotic resistance protein MarC	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2,70	
Y958_RS01920	membrane protein insertase YidC	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	3,25	

Y958_RS02740		outer membrane lipoprotein-sorting protein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-5,40	
Y958_RS04650		hypothetical protein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2,64	
Y958_RS04880	trbB	P-type conjugative transfer ATPase TrbB	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	24,63	
Y958_RS09500	tolR	protein TolR	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2,38	
Y958_RS10975		signal recognition particle-docking protein FtsY	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	3,28	
Y958_RS11010		signal recognition particle protein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	3,03	
Y958_RS11110		biopolymer transporter ExbD	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-4,13	
Y958_RS11115		biopolymer transporter ExbD	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	-3,50	
Y958_RS12265		preprotein translocase subunit SecA	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2,85	
Y958_RS19695		protein translocase subunit SecDF	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2,01	
Y958_RS20885		hypothetical protein	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	12,80	
Y958_RS23245	exbD	TonB system transport protein ExbD	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	6,60	
Y958_RS23250	exbB	tonB-system energizer ExbB	U	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	4,66	
Y958_RS00555		hypothetical protein	V	Defense mechanisms	4,07	
Y958_RS02685		ABC transporter permease	V	Defense mechanisms	12,44	2,31
Y958_RS07470		serine hydrolase	V	Defense mechanisms	3,13	
Y958_RS09725		ABC transporter	V	Defense mechanisms	4,86	
Y958_RS15425		NHLP family bacteriocin export ABC transporter peptidase/permease/ATPase subunit	V	Defense mechanisms	-2,35	
Y958_RS15430		NHLP bacteriocin export ABC transporter permease/ATPase subunit	V	Defense mechanisms	-3,33	
Y958_RS15435		hypothetical protein	V	Defense mechanisms	-4,04	
Y958_RS16535		hemolysin D	V	Defense mechanisms	6,02	
Y958_RS17650		peptide ABC transporter permease	V	Defense mechanisms	-18,32	
Y958_RS17655		ABC transporter permease	V	Defense mechanisms	-49,23	
Y958_RS17660		ABC transporter ATP-binding protein	V	Defense mechanisms	-51,19	
Y958_RS17665		efflux transporter periplasmic adaptor subunit hydrophobe/amphiphile efflux-1 family RND transporter	V	Defense mechanisms	-25,88	
Y958_RS18905		hydrophobe/amphiphile efflux-1 family RND transporter	V	Defense mechanisms	2,73	
Y958_RS19195		hydrophobe/amphiphile efflux-1 family RND transporter	V	Defense mechanisms	2,16	
Y958_RS19575		efflux transporter periplasmic adaptor subunit	V	Defense mechanisms	39,93	

Y958_RS22705	hemolysin D	V	Defense mechanisms	2,53	
Y958_RS22945	ABC transporter	V	Defense mechanisms	-5,12	
Y958_RS23095	hypothetical protein	V	Defense mechanisms	14,48	
Y958_RS23100	hypothetical protein	V	Defense mechanisms	8,70	
Y958_RS23350	secretion protein	V	Defense mechanisms	-2,61	
Y958_RS24055	LD-carboxypeptidase	V	Defense mechanisms	-13,50	
Y958_RS24130	HNH endonuclease	V	Defense mechanisms	-5,11	
Y958_RS24470	NHLP family bacteriocin export ABC transporter peptidase permease ATPase	V	Defense mechanisms		-1,71
Y958_RS26855	glycosyl hydrolase family 18	V	Defense mechanisms	-7,36	
Y958_RS26860	ABC transporter	V	Defense mechanisms	-11,80	
Y958_RS26865	ABC transporter permease	V	Defense mechanisms	-22,99	
Y958_RS27695	serine hydrolase	V	Defense mechanisms	5,72	
Y958_RS27950	hydrophobe/amphiphile efflux-1 family RND transporter	V	Defense mechanisms	34,91	2,93
Y958_RS28075	hypothetical protein	V	Defense mechanisms	2,89	
Y958_RS30555	efflux transporter periplasmic adaptor subunit	V	Defense mechanisms	-13,60	
Y958_RS30560	multidrug ABC transporter ATP-binding protein	V	Defense mechanisms	-8,56	
Y958_RS30565	ABC transporter permease	V	Defense mechanisms	-28,88	
Y958_RS30955	hypothetical protein	V	Defense mechanisms	-2,24	
Y958_RS00165	hypothetical protein			-7,53	
Y958_RS00360	hypothetical protein			-2,61	
Y958_RS00565	hypothetical protein			-3,81	
Y958_RS00755	hypothetical protein			-8,15	
Y958_RS01005	hypothetical protein			-2,31	
Y958_RS01010	hypothetical protein			-7,55	
Y958_RS01095	hypothetical protein			-2,51	
Y958_RS01100	hypothetical protein			-2,10	
Y958_RS01135	hypothetical protein			3,72	
Y958_RS01250	hypothetical protein			-2,45	
Y958_RS01295	hypothetical protein			4,11	
Y958_RS01310	hypothetical protein			3,01	
Y958_RS01315	acid-shock protein			5,68	
Y958_RS01380	pspB envelope stress response membrane protein PspB			18,08	
Y958_RS01385	pspC envelope stress response membrane protein PspC			15,38	2,35

Y958_RS01390	hypothetical protein	12,86	
Y958_RS01395	hypothetical protein	17,23	
Y958_RS01520	hypothetical protein	3,61	
Y958_RS01660	hypothetical protein	-4,60	
Y958_RS01725	hypothetical protein	-2,72	
Y958_RS01740	hypothetical protein	2,28	
Y958_RS01820	phage tail protein	-2,00	
Y958_RS02070	hypothetical protein	-2,68	
Y958_RS02215	hypothetical protein	-3,19	
Y958_RS02485	hypothetical protein	-11,80	
Y958_RS02495	hypothetical protein	-9,75	
Y958_RS02750	hybrid sensor histidine kinase/response regulator	-2,04	
Y958_RS02810	hypothetical protein	-3,25	
Y958_RS02910	hypothetical protein	3,63	
Y958_RS02965	hypothetical protein	-2,59	
Y958_RS03065	CopG family transcriptional regulator	4,96	
Y958_RS03140	hypothetical protein	-3,74	
Y958_RS03165	hypothetical protein	-6,35	
Y958_RS03200	hypothetical protein	2,72	1,60
Y958_RS03250	hypothetical protein	-12,75	
Y958_RS03365	hypothetical protein	-5,60	
Y958_RS03710	hypothetical protein	4,30	
Y958_RS03805	hypothetical protein	4,22	
Y958_RS04055	preprotein translocase subunit SecE	5,72	
Y958_RS04170	methionine synthase	-2,20	
Y958_RS04180	hypothetical protein	-3,30	
Y958_RS04225	hypothetical protein	-2,29	
Y958_RS04245	hypothetical protein	-7,01	
Y958_RS04355	hypothetical protein	-3,21	

Y958_RS04690		hypothetical protein	-2,40	
Y958_RS04935		hypothetical protein	-22,22	
Y958_RS04940		helicase	-45,21	
Y958_RS04945		hypothetical protein	-35,57	
Y958_RS04955		hypothetical protein	-7,00	
Y958_RS05455		transporter	-2,67	
Y958_RS05695		hypothetical protein	-4,03	
Y958_RS05705		peptidase	-4,18	
Y958_RS05750		hypothetical protein	-3,08	
Y958_RS05880		hypothetical protein		-2,08
Y958_RS05885		hypothetical protein	11,12	
Y958_RS06115		hypothetical protein	2,22	
Y958_RS06195		hypothetical protein	-7,02	
Y958_RS06220		CcoQ/FixQ family Cbb3-type cytochrome c oxidase assembly chaperone	-39,52	
Y958_RS06245	ccoS	cbb3-type cytochrome oxidase assembly protein CcoS	-4,19	
Y958_RS06250		hypothetical protein	-9,72	
Y958_RS06275		hypothetical protein	-2,80	
Y958_RS06335		hypothetical protein	4,96	
Y958_RS06440		hypothetical protein	-3,29	
Y958_RS06460		hypothetical protein	-4,07	
Y958_RS06545		hypothetical protein	5,32	3,10
Y958_RS06625		AbrB/MazE/SpoVT family DNA-binding domain-containing protein	-2,41	
Y958_RS06790		hypothetical protein	-25,03	
Y958_RS06880		hypothetical protein	10,11	
Y958_RS07025		PadR family transcriptional regulator	8,93	
Y958_RS07225		50S ribosomal protein L32	2,31	
Y958_RS07305		sterol desaturase	-3,11	

Y958_RS07655		DUF1338 domain-containing protein	5,01
Y958_RS07705		hypothetical protein	-11,68
Y958_RS07710		hypothetical protein	-21,02
Y958_RS07885		prevent-host-death protein	2,19
Y958_RS08225		hypothetical protein	2,79
Y958_RS08340		hypothetical protein	2,95
Y958_RS08355		hypothetical protein	-5,84
Y958_RS08475		hypothetical protein	-5,01
Y958_RS08515		hypothetical protein	-3,13
Y958_RS08520		hypothetical protein	2,51
Y958_RS08565		hypothetical protein	-4,32
Y958_RS08790		hypothetical protein	125,12
Y958_RS08820		hypothetical protein	-2,41
Y958_RS08845		hypothetical protein	-2,25
Y958_RS09060		hypothetical protein	-20,28
Y958_RS09070		hypothetical protein	-2,36
Y958_RS09330	rpsU	30S ribosomal protein S21	2,85
Y958_RS09625		flagellar motor protein MotA	7,81
Y958_RS09665		hypothetical protein	14,66
Y958_RS09905		hypothetical protein	4,75
Y958_RS09910		addiction module toxin, HicA family	2,43
Y958_RS09915		hypothetical protein	7,21
Y958_RS10060		hypothetical protein	20,28
Y958_RS10085		hypothetical protein	17,07
Y958_RS10240	petA	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	-3,25
Y958_RS10260		hypothetical protein	66,23
Y958_RS10320		hypothetical protein	-3,13
Y958_RS10470		hypothetical protein	3,06
Y958_RS10475		hypothetical protein	2,49

Y958_RS10505	hypothetical protein	7,19	
Y958_RS10595	hypothetical protein	3,20	
Y958_RS10605	hypothetical protein	-3,04	
Y958_RS10640	hypothetical protein	-3,11	
Y958_RS10665	hypothetical protein	-3,67	
Y958_RS10690	hypothetical protein	3,44	
Y958_RS10860	hypothetical protein	-6,19	
Y958_RS10875	hypothetical protein	2,57	
Y958_RS10900	hypothetical protein	-2,49	
Y958_RS10945	hypothetical protein	12,24	
Y958_RS11065	4Fe-4S ferredoxin	3,39	
Y958_RS11105	hypothetical protein	-2,75	
Y958_RS11160	hypothetical protein	-5,90	
Y958_RS11185	rubrerythrin family protein	-2,80	
Y958_RS11290	pseudouridine synthase	2,39	
Y958_RS11410	hypothetical protein	-4,89	
Y958_RS11420	Tat pathway signal protein	-8,34	
Y958_RS11440	hypothetical protein	-7,10	
Y958_RS11485	hypothetical protein	4,29	
Y958_RS11940	hypothetical protein	3,74	
Y958_RS12030	hypothetical protein	-3,31	
Y958_RS12045	hypothetical protein	10,19	
Y958_RS12050	hypothetical protein	9,33	
Y958_RS12135	hypothetical protein	3,17	
Y958_RS12595	PIN domain-containing protein	2,02	
Y958_RS12600	DNA-binding protein	2,59	
Y958_RS12650	hypothetical protein	-4,52	
Y958_RS12710	hypothetical protein		-1,50
Y958_RS12755	hypothetical protein	-25,45	
Y958_RS13035	hypothetical protein	4,75	
Y958_RS13175	hypothetical protein	-7,18	
Y958_RS13395	hypothetical protein	-3,42	
Y958_RS13400	hypothetical protein	-4,22	
Y958_RS13415	bifunctional folylpolyglutamate synthase/dihydrofolate synthase	2,92	
Y958_RS13455	hypothetical protein	-6,41	

Y958_RS13505	hypothetical protein	2,32	
Y958_RS13665	hypothetical protein	-2,02	
Y958_RS13690	hypothetical protein	4,92	
Y958_RS13775	hypothetical protein	-4,58	
Y958_RS13815	hypothetical protein	-2,57	
Y958_RS13830	hypothetical protein	3,11	
Y958_RS13980	hypothetical protein	3,27	
Y958_RS14080	hypothetical protein	3,55	
Y958_RS14135	hypothetical protein	-3,28	
Y958_RS14155	hypothetical protein [Nitrospirillum amazonense]		-1,71
Y958_RS14190	hypothetical protein	-6,84	
Y958_RS14280	hypothetical protein	2,58	
Y958_RS14370	hypothetical protein	-6,63	
Y958_RS14430	lipocalin-like domain protein	3,59	
Y958_RS14485	hypothetical protein	-10,80	
Y958_RS14575	MFS transporter	-7,82	
Y958_RS15125	hypothetical protein	-2,56	
Y958_RS15130	hypothetical protein	-5,74	
Y958_RS15135	hypothetical protein	-3,54	
Y958_RS15180	hypothetical protein	6,35	
Y958_RS15255	hypothetical protein	-3,26	
Y958_RS16135	DUF4440 domain-containing protein	5,19	
Y958_RS16590	DEAD/DEAH box helicase	3,32	
Y958_RS16595	hypothetical protein	5,13	
Y958_RS16860	hypothetical protein	-2,97	
Y958_RS16945	hypothetical protein		-1,75
Y958_RS16980	hypothetical protein	4,83	
Y958_RS17035	DNA gyrase inhibitor YacG	4,71	
Y958_RS17120	hypothetical protein	-8,56	
Y958_RS17125	hypothetical protein	-17,34	
Y958_RS17150	hypothetical protein	-7,05	
Y958_RS17205	membrane protein	89,85	
Y958_RS17210	CsbD family protein	4,27	
Y958_RS17220	hypothetical protein	-4,30	
Y958_RS17230	hypothetical protein	-3,21	

Y958_RS17235	hypothetical protein	-4,75	
Y958_RS17330	hypothetical protein	-6,23	
Y958_RS17570	hypothetical protein	-2,37	
Y958_RS17575	twin-arginine translocase TatA/TatE family subunit	2,65	
Y958_RS17690	hypothetical protein	-6,45	
Y958_RS17695	hypothetical protein	-4,92	
Y958_RS17705	hypothetical protein	8,66	
Y958_RS17745	hypothetical protein	9,26	
Y958_RS17795	hypothetical protein	-3,10	
Y958_RS17940	hypothetical protein	-2,12	
Y958_RS18025	hypothetical protein	5,21	
Y958_RS18090	hypothetical protein	5,76	
Y958_RS18445	hypothetical protein	-3,39	
Y958_RS18530	hypothetical protein	-2,15	
Y958_RS18815	family		-1,65
Y958_RS18845	hypothetical protein	12,67	
Y958_RS19260	hypothetical protein	4,88	
Y958_RS19320	hypothetical protein	-10,43	
Y958_RS19375	hypothetical protein	-13,37	
Y958_RS19425	hypothetical protein	4,14	
Y958_RS19440	hypothetical protein	-3,99	
Y958_RS19450	hypothetical protein	-3,38	
Y958_RS19455	hypothetical protein	-3,16	
Y958_RS19485	hypothetical protein	-3,32	
Y958_RS19580	DUF1656 domain-containing protein	14,43	
Y958_RS19585	hypothetical protein	25,56	
Y958_RS19630	hypothetical protein	2,28	
Y958_RS19660	antitoxin	-3,22	
Y958_RS19815	hypothetical protein	2,81	
Y958_RS19905	hypothetical protein	24,07	19,58
Y958_RS19995	hypothetical protein	-8,62	
Y958_RS20015	hypothetical protein	-3,05	
Y958_RS20195	hypothetical protein	-4,63	
Y958_RS20200	hypothetical protein	-2,13	
Y958_RS20370	hypothetical protein	-3,94	

Y958_RS20515	hypothetical protein	-3,12	
Y958_RS20525	hypothetical protein	-8,43	
Y958_RS20540	hypothetical protein	-7,14	
Y958_RS20565	hypothetical protein	-7,70	
Y958_RS20570	hypothetical protein	-3,05	
Y958_RS20625	hypothetical protein	-3,18	
Y958_RS20635	hypothetical protein	-3,76	
Y958_RS20675	hypothetical protein	-6,98	
Y958_RS20715	hypothetical protein	-9,99	
Y958_RS21115	type II toxin-antitoxin system prevent-host-death family antitoxin	-3,21	
Y958_RS21125	ABC-type amino acid transport substrate-binding		1,60
Y958_RS21320	prevent-host-death family protein	-6,15	
Y958_RS21325	PIN domain nuclease	-5,25	
Y958_RS21470	hypothetical protein	10,07	
Y958_RS21480	hypothetical protein	3,41	
Y958_RS21635	hypothetical protein	-4,88	
Y958_RS21645	hypothetical protein	-12,33	
Y958_RS21805	TetR family transcriptional regulator	3,41	
Y958_RS21960	nickel resistance protein	2,42	
Y958_RS21965	hypothetical protein	3,94	
Y958_RS22090	hypothetical protein	-9,46	
Y958_RS22275	hypothetical protein	-2,95	
Y958_RS22530	formate dehydrogenase	5,67	
Y958_RS22765	DUF2063 domain-containing protein	3,15	
Y958_RS22995	hypothetical protein	-2,73	
Y958_RS23000	bacterioferritin-associated ferredoxin	7,62	
Y958_RS23030	hypothetical protein	-5,26	
Y958_RS23200	hypothetical protein	-4,25	
Y958_RS23215	hypothetical protein	11,18	
Y958_RS23385	hypothetical protein	-3,10	
Y958_RS23550	biotin-independent malonate decarboxylase subunit gamma	10,22	
Y958_RS23840	anti-anti-sigma factor	-34,19	
Y958_RS23845	chemotaxis protein	-13,73	
Y958_RS24010	IS630 family transposase	-61,18	

Y958_RS24035	hypothetical protein	-10,62
Y958_RS24040	hypothetical protein	-14,76
Y958_RS24135	hypothetical protein	-7,48
Y958_RS24140	hypothetical protein	-9,24
Y958_RS24145	hypothetical protein	-12,35
Y958_RS24345	hypothetical protein	3,16
Y958_RS24365	hypothetical protein	-2,01
Y958_RS24975	preprotein translocase	-11,40
Y958_RS25100	hypothetical protein	-4,60
Y958_RS25135	hypothetical protein	-2,14
Y958_RS25365	hypothetical protein	5,12
Y958_RS25585	hypothetical protein	4,42
Y958_RS25650	aldehyde dehydrogenase	-3,61
Y958_RS25750	hypothetical protein	-9,01
Y958_RS25995	hypothetical protein	9,19
Y958_RS26025	hypothetical protein	-4,60
Y958_RS26090	hypothetical protein	-2,96
Y958_RS26100	hypothetical protein	-4,98
Y958_RS26125	hypothetical protein	-4,03
Y958_RS26695	hypothetical protein	4,89
Y958_RS26735	RNA polymerase subunit sigma-54	-8,92
Y958_RS26740	hypothetical protein	-8,88
Y958_RS26745	hypothetical protein	-9,24
Y958_RS26780	hypothetical protein	-45,07
Y958_RS26870	hypothetical protein	-17,08
Y958_RS27355	hypothetical protein	-2,31
Y958_RS27450	hypothetical protein	-2,55
Y958_RS27525	hypothetical protein	-7,71
Y958_RS27965	hypothetical protein	5,50
Y958_RS28000	hypothetical protein	-3,68
Y958_RS28260	hypothetical protein	2,80
Y958_RS28285	hypothetical protein	-10,15
Y958_RS28350	hypothetical protein	-4,49
Y958_RS28375	hypothetical protein	-2,34
Y958_RS28380	hypothetical protein	-2,30

Y958_RS28455		sulfotransferase family protein	-27,10	
Y958_RS28875		hypothetical protein	4,66	
Y958_RS29110		cobalt ABC transporter	-2,63	
Y958_RS29335		IS630 family transposase	-4,66	
Y958_RS29350		hypothetical protein	-3,14	
Y958_RS29380		hypothetical protein	-3,21	
Y958_RS29385		hypothetical protein	-4,89	
Y958_RS29555		toxin-antitoxin system HicB family antitoxin	-14,90	
Y958_RS29565		protease	-8,68	
Y958_RS29620		hypothetical protein	-2,17	
Y958_RS29675		hypothetical protein		-2,48
Y958_RS29815		hypothetical protein	-17,59	
Y958_RS30080	iolB	5-deoxy-glucuronate isomerase	-6,41	
Y958_RS30105	iolG	inositol 2-dehydrogenase	-2,75	
Y958_RS30420		hypothetical protein	-5,18	
Y958_RS30580		hypothetical protein	-28,53	
Y958_RS30625		hypothetical protein	-5,96	
Y958_RS30645		hypothetical protein	-6,25	
Y958_RS30650		3-methylaspartate ammonia-lyase	-10,59	
Y958_RS31095		hypothetical protein	-2,51	

Anexo B. Artigo do genoma da estirpe CBAmC, organismo do presente estudo.

A versão on-line deste artigo encontra-se na página: <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1439-0>.

Molecular Genetics and Genomics
<https://doi.org/10.1007/s00438-018-1439-0>

ORIGINAL ARTICLE



Genomic characterization of *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC, a nitrogen-fixing bacterium isolated from surface-sterilized sugarcane stems

Stefan Schwab^{1,2} · Leonardo Araujo Terra^{1,2,3} · José Ivo Baldani^{1,2}

Received: 11 August 2017 / Accepted: 18 April 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Nitrospirillum amazonense is a nitrogen-fixing bacterium that shows potential to promote plant growth when inoculated into sugarcane and rice plants. This microorganism has been the subject of biochemical and genetic characterization to elucidate important functions related to host plant interaction and growth promotion, including the determination of draft genome sequences of two strains, Y2 and CBAmC, the second of which is the aim of the present study. CBAmC has been isolated from sugarcane (*Saccharum* spp.), and is currently used in a sugarcane consortium inoculant with four other nitrogen-fixing bacterial strains. The present paper describes a significant improvement in the genome sequence and assembly for the *N. amazonense* strain CBAmC, and determination for the first time of a complete genome sequence for this bacterial species, using PacBio technology. The analysis of the genomic data obtained allowed the discovery of genes coding for metabolic pathways and cellular structures that may be determinant for the success of the bacterial establishment and colonization into the host sugarcane plant, besides conferring important characteristics to the inoculant. These include genes for the use of sucrose and *N*-glycans, biosynthesis of autoinducer molecules, siderophore production and acquisition, auxin and polyamine biosynthesis, flagellum, σ -fimbriae, a variety of secretion systems, and a complete denitrification system. Concerning genes for nitrogenase and auxiliary proteins, it was possible to corroborate literature data that in *N. amazonense* these probably had originated from horizontal gene transfer, from bacteria of the Rhizobiales order. The complete genomic sequence of the CBAmC strain of *N. amazonense* revealed that the bacterium harbors four replicons, including three chromosomes and one chromid, a profile that coincides with that of other two strains, according to literature data, suggesting that as a replicon pattern for the species. Finally, results of phylogenomic analyses in this work support the recent reclassification of the species, separating it from the *Azospirillum* genus. More importantly, results of the present work shall guide subsequent studies on strain CBAmC as well as the development of a sugarcane inoculant.

Keywords Biological nitrogen fixation · Plant growth promotion · PacBio technology · Sugarcane inoculant

Introduction

Nitrospirillum amazonense, previously *Azospirillum amazonense* (Lin et al. 2014; Oren and Garrity 2016), is a nitrogen-fixing bacterium that shows the potential to promote plant growth, as has been shown by inoculation assays in rice under greenhouse conditions (Rodrigues et al. 2008). Initially, *N. amazonense* was isolated from forage grasses (e.g., *Brachiaria* spp., *Digitaria* sp., *Axonopus* sp., *Andropogon gayanus*, *Panicum pilosum*, *Paspalum virgatum*, *Hyparrhenia rufa*, *Pennisetum purpureum*) in the Amazon and Rio de Janeiro states, Brazil (Magalhães et al. 1983). Afterwards, it was also isolated from rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), and sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivated in Rio de

Communicated by S. Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00438-018-1439-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Stefan Schwab
stefan.schwab@embrapa.br

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 25 April 2018

Springer