

Pâmela Dall'Asta

**INTERAÇÃO ENTRE O MILHO (*Zea mays*), A BACTÉRIA
BENÉFICA ENDOFÍTICA *Herbaspirillum seropedicae* E O
FUNGO PATOGÊNICO *Colletotrichum graminicola***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção de Grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina
Maisonave Arisi
Coorientador: Prof. Dr. Marciel João Stadnik

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dall'Asta, Pâmela
INTERAÇÃO ENTRE O MILHO (*Zea mays*), A BACTÉRIA
BENÉFICA ENDOPÍTICA *Herbaspirillum seropedicae* E O
FUNGO PATOGENICO *Colletotrichum graminicola* / Pâmela
Dall'Asta ; orientador, Ana Carolina Maisonnave
Arisi; coorientador, Marciel João Stadnik - SC,
2017.
120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Bactérias
promotoras de crescimento vegetal. 3.
Herbaspirillum seropedicae. 4. *Colletotrichum*
graminicola. 5. qPCR. I. Maisonnave Arisi, Ana
Carolina. II. Stadnik, Marciel João. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV.
Título.

**Interação entre o milho (*Zea mays*), a bactéria
benéfica endofítica *Herbaspirillum seropedicae*
e o fungo patogênico *Colletotrichum*
*graminicola***

por

Pâmela Dall'Asta

Tese julgada e aprovada em 21/02/2017, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

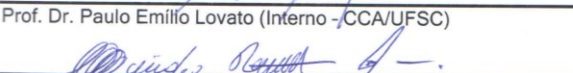
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Ana Carolina Maisonave Arisi (Presidente - CCA/UFSC)

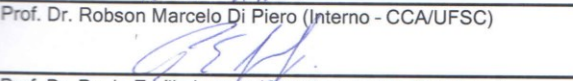

Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz (Externo-UFRR/PR)


Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares (Externo - UENF/RJ)


Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Interno - CCA/UFSC)


Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares (Interno - CCB/UFSC)


Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (Interno - CCA/UFSC)


Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2017

Ao meu avô Alfredo Daron (*in memoriam*)

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Ana Carolina Maisonnave Arisi, orientadora desse trabalho, pelo conhecimento, pelos ensinamentos, pela oportunidade de cursar o doutorado junto ao Laboratório de Biologia Molecular, e pela confiança depositada.

Ao coorientador deste trabalho, professor Marciel João Stadnik, pela disposição e confiança, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar este trabalho em conjunto com o Laboratório de Fitopatologia da UFSC.

Aos queridos colegas e eternos amigos do Laboratório de Biologia Molecular. Desde os mais antigos até os mais recentes, cada um deixou sua marca e contribuiu para o presente trabalho. Um agradecimento especial ao querido Tomás Pereira, que, além de amigo de todas as horas, também foi um grande parceiro no desenvolvimento deste trabalho e tornou cada atividade do dia-a-dia mais leve, divertida e agradável, seja dentro ou fora do laboratório. Um especial muito obrigado também a Fernanda do Amaral, pela ajuda e ensinamentos passados. Ao amigo Pedro Alexandre Valentim pelos inúmeros jantares, constante disponibilidade em ouvir e alegria contagiante. As amigas Gabriela Rossi e Mirella Scariot pela amizade, pelo apoio, pelas conversas e pelos acontecimentos compartilhados. Também a Carla Mello e Vanessa Hermes, amigas muito especiais. E aos queridos Gustavo Venturelli, Jéssica Bueno, Geisi Bálsamo, Aline Cardozo, Ângelo Matos, Cibele Ferrari, Michelle Loss, Helena Santeli, Joana Bischoff, Kelly Justins, Maryella Vargas e Marla Barbieri.

A Aline C. Velho, pela ajuda, disposição e parceria no desenvolvimento da pesquisa, especialmente nas dependências do Laboratório de Fitopatologia.

A base de tudo: a família, de sempre e para sempre. Aos meus queridos pais, Ademir e Rosana Dall'Asta, pelo incentivo, pelo suporte, pela confiança, pelo amor incondicional de todas as horas e pelo zelo em todos os momentos. A minha querida irmã Mônica, por estar sempre disposta a ouvir, pelas risadas e confissões. Pelo bom-humor, apoio e pela parceria ao longo dos anos, especialmente nos momentos mais difíceis da vida.

As amigas Leidiane Accordi, Ana Torres e Mayara Cardozo, pelos momentos de descontração, conversas e apoio. A Rafaela Duarte, Marília Shibata e Aline C. Velho pelos bons momentos em comum vivenciados.

Aos professores relatores desse trabalho de tese, professor Leonardo Magalhães Cruz da Universidade Federal do Paraná, e Cláudio Roberto Fonseca Soares da UFSC, pela disponibilidade em avaliar o trabalho de forma preliminar, bem como aos demais membros da banca avaliadora.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade de realização do doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Nacional Ciência e Tecnologia (INCT) de Fixação Biológica de Nitrogênio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento.

“It is madness to hate all roses because you got scratched with one thorn. To give up on your dreams because one didn’t come true. To lose faith in prayers because one was not answered. To give up on your efforts because one of them failed. To condemn all your friends because one betrayed you. Not to believe in love because someone didn’t love you back. To throw away all your chances to be happy because you didn’t succeed on the first attempt. I hope that as you go on your way, you don’t give in nor give up”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica endofítica promotora de crescimento vegetal (BPCV) capaz de exercer inúmeros benefícios às gramíneas com as quais se associa, incluindo o milho. Por outro lado, *Colletotrichum graminicola*, é um fungo patogênico que causa antracnose no milho, doença que pode acometer todos os órgãos dessa planta e causar severos danos às lavouras. O objetivo geral do trabalho consistiu em estudar a interação entre o milho e *H. seropedicae* SmR1 em duas condições de cultivo, em relação a detecção e quantificação de transcritos da bactéria na planta; e entre o milho, *H. seropedicae* e *C. graminicola* na presença ou ausência de substâncias húmicas, em relação à expressão dos sintomas da antracnose na planta. Num primeiro momento, realizou-se a inoculação de plantas de milho (P30F53) crescidas *in vitro* e em solo com *H. seropedicae* SmR1. As plantas *in vitro* foram coletadas aos 4, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI), e as cultivadas em solo aos 14, 21 e 28 DAI. Raízes e folhas foram submetidas a ensaios de qPCR a fim de se detectar a presença do DNA de *H. seropedicae* utilizando-se os sistemas de detecção SYBR Green (previamente estabelecido), e sonda TaqMan. Os resultados apontam para o estabelecimento de uma metodologia mais específica para o monitoramento da colonização de *H. seropedicae* em tecidos vegetais cultivados em condições estéreis ou não estéreis com a utilização da sonda TaqMan em comparação com SYBR Green. Ensaios de RT-qPCR também foram realizados a fim de se medir os transcritos dos genes *nifH*, *rpoC* e *hrcN* de *H. seropedicae* em raízes de milho por quantificação absoluta. Assim, foi possível monitorar os genes *nifH* e *rpoC* em condições experimentais estéreis e não-estéreis. O segundo trabalho envolveu a investigação do potencial de *H. seropedicae* como agente de controle biológico para conter a antracnose foliar causada pelo fungo patogênico *C. graminicola* em milho. Foram realizados dois ensaios. O primeiro consistiu no tratamento de plântulas de milho (P30F53) com *H. seropedicae* SmR1 e inoculação de *C. graminicola* aos 7, 14 e 21 dias após o tratamento (DAT). O segundo, foi realizado com tratamento de *H. seropedicae* associado a substâncias húmicas e inoculação do fungo patogênico aos 3 e 7 DAT. Foi realizado ensaio de quantificação de DNA por qPCR para comprovar a colonização das plantas por *H. seropedicae*. A análise da severidade da doença foi realizada através da medição da área foliar necrótica e clorótica, com o auxílio do software Quant®. Foi demonstrado que *H. seropedicae* colonizou efetivamente as folhas de milho, porém não foi constatado

efeito do tratamento com *H. seropedicae* sobre a severidade da doença em ambos os ensaios. Sendo assim, pode se concluir que a partir do presente trabalho foi possível detectar a presença e medir a quantidade de transcritos da bactéria *H. seropedicae* em plantas de milho. Além disso, não foi verificado efeito da bactéria *H. seropedicae* associada ou não a substâncias húmicas, no controle da antracnose nas plantas de milho.

Palavras-chave: BPCV, bactérias diazotróficas, antracnose, qPCR, RT-qPCR.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic diazotrophic plant growth promoting bacteria (BPCV). It is able to exert numerous benefits to the associated host plant, including maize. On the other hand, *Colletotrichum graminicola* is a pathogenic fungus that causes anthracnose in maize, which attack every organs of this plant and cause severe damages to the crops. This study's main goal was to study the association between maize cultivated in two different growth conditions and *H. seropedicae* SmR1 related to bacterial detection and quantification of transcripts *in planta*; and between maize, *H. seropedicae* and *C. graminicola* with or without humic substances, related to anthracnose symptoms in plants. The first part of this study consisted on *H. seropedicae* SmR1 inoculation of maize plants (P30F53) grown *in vitro* and in soil. *In vitro* plants were collected at 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI), and soil plants were harvested at 14, 21 and 28 DAI. Plants roots and leaves were submitted to qPCR assays to detect the presence of *H. seropedicae* DNA using as detection systems both SYBR Green (previously established) and TaqMan probe reagents. Results allow the establishment of a more specific methodology for monitoring the colonization of *H. seropedicae* in plant tissues cultivated in sterile or nonsterile conditions with TaqMan probe in comparison with SYBR Green. Assays using RT-qPCR were also performed to measure the expression of *H. seropedicae* *nifH*, *rpoC* and *hrcN* genes in roots of maize by absolute quantification. As a result, it was possible to monitor the expression of *nifH* and *rpoC* *H. seropedicae* genes in maize grown under sterile and non-sterile experimental conditions. The second part of this work consisted in investigation of *H. seropedicae* potential use as biological agent in controlling foliar anthracnose caused by *C. graminicola* in maize. In this sense, two tests were performed. The first one consisted of maize plantlets (P30F53) treatment with *H. seropedicae* SmR1, followed by inoculation of *C. graminicola* at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT). The second one was carried out by *H. seropedicae* associated to humic substances treatment, followed by pathogen inoculation at 3 and 7 DAT. *H. seropedicae* DNA quantification was performed by qPCR to confirm the plant colonization by the bacteria. Assessments of disease severity were performed by necrotic and chlorotic leaf area measurements, using software Quant®. As results, it was shown effective leaf colonization by *H. seropedicae*. Despite that, no effects in disease severity was observed by *H. seropedicae* treatment in both assays. In conclusion, in this study

it was possible to detect and quantify *H. seropedicae* transcripts contents in maize plants. In addition, it was not observed any effect of *H. seropedicae*, associated or not to humic substances, in anthracnose disease control in maize plants.

Key-words: PGPB, diazotrophic bacteria, anthracnose, qPCR, RT-qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Processo infeccioso de *C. graminicola* e sintomas da doença na folha de milho. SP, esporo; AP, apressório; PH, hifa primária biotrófica; SH, hifa secundária necrotrófica. -----37
- Figura 2** Interação planta-patógeno e desenvolvimento de resistência à doença.-----41
- Figura 3** Funções das ROS produzidas em resposta a patógenos. O reconhecimento do patógeno leva à produção de ROS, as quais possuem diferentes funções relacionadas às defesas vegetais. Setas finas representam eventos de sinalização que apontam para a produção de ROS, no apoplasto e no interior celular. Setas com duas pontas indicam o *crossstalk* entre as ROS nesses compartimentos. As setas mais espessas apontam para as funções das ROS com relação à ativação das respostas de defesa. -----44
- Figura 4** Modelo representando o sistema imune vegetal.-----44
- Figura 5** Algumas formas de antagonismo por BPVC contra fitopatógenos.
- (A) ISR – desencadeada por moléculas elicitoras das BPCV. Esta resposta é dependente da rota de sinalização do etileno e ácido jasmônico na planta e reduz a doença através da modulação de propriedades físicas e químicas nas plantas hospedeiras; (B) Competição por ferro – em ambientes aeróbicos, Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} , formando compostos insolúveis, tornando-o indisponível para os microrganismos. BPCV produzem sideróforos que formam complexos com Fe^{3+} , prevenindo sua insolubilização. Na membrana da BPCV, esse íon é reduzido a Fe^{2+} e liberado para dentro da célula. Assim, faltará Fe^{2+} para os patógenos; (C) Inibição do crescimento – mecanismos responsáveis por atividade antagonística incluem inibição do patógeno por antibióticos, toxinas, biosurfactantes e

produção extracelular de enzimas que degradam parede celular, como quitinase e 1,3-β-glucanase. ----- 49

Figure 6 TaqMan HERBAS1 assay standard curves performed in six qPCR runs (six different days) using DNA extract from culture of *H. seropedicae* SmR1, in triplicate (n=18). ----- 61

Figure 7 qPCR standard curves for *H. seropedicae* transcript quantification generated using 3 DNA extractions from *H. seropedicae* strain SmR1 as template and (a) *nifH*, (b) *rpoC* and (c) *hrcN* primers (n = 9). ---- 67

Figure 8 Quantification of bacterial cDNA copy number per 40 ng of total cDNA, maize (P30F53 variety) grown *in vitro* after inoculation with *H. seropedicae* strain SmR1. (a) *nifH* transcripts abundance (b) *rpoC* transcripts abundance (c) *hrcN* transcripts abundance. Data are presented as mean ± SD (n=9).----- 68

Figure 9 Quantification of bacterial cDNA copy number per 40 ng of total cDNA, maize (P30F53 variety) grown in soil after inoculation with *H. seropedicae* strain SmR1. (a) *nifH* transcripts abundance and (b) *rpoC* transcripts abundance. Data are presented as mean ± SD (n=9). ---- 69

Figure 10 qPCR standard curves for *H. seropedicae* quantification. Average Ct (n = 2): A) Curve generated using DNA isolated from pure culture of *H. seropedicae* SmR1 as template. Ct versus log DNA copy number. B) Curve generated using DNA isolated from 100 μL of each serial dilution of *H. seropedicae* culture mixed with 100 mg of crushed *in vitro* plant-leaf tissues as template. Ct versus log CFU. ----- 89

Figure 11 *H. seropedicae* DNA quantification in leaves of P30F53 *Zea mays*, after inoculation with *C. graminicola* 3 and 7 days after treatment with *H. seropedicae* with or without humic substances. --- 90

LISTA DE TABELAS

- Table 1** HERBAS1 forward (F) and reverse (R) primers and probe sequences used for *H. seropedicae* SmR1 detection and bacterial DNA quantification*-----58
- Table 2** Primer sequences forward (F) and reverse (R) and concentrations used in RT-qPCR assays for absolute quantification of *H. seropedicae* gene expression-----60
- Table 3** Parameters of SYBR Green qPCR standard curves for *H. seropedicae* quantification using HERBAS1 primers (100 nmol/L) and bacterial DNA serial dilution-----62
- Table 4** Parameters of TaqMan qPCR standard curves for *H. seropedicae* quantification using HERBAS1 primers (100 nmol/L), HERBAS1 probe (100 nmol/L) and bacterial DNA serial dilution-----62
- Table 5** Positive amplifications and Ct values generated by TaqMan qPCR specificity assay using primers HERBAS1, HERBAS1 Probe and template DNA extracted from *H. seropedicae* or other bacteria. All samples were analyzed at a final concentration of 6 ng DNA per reaction (n = 3)-----63
- Table 6** Bacterial DNA copy number/g root or leaf (fresh weight) of P30F53 *Zea mays* cultivated *in vitro*, inoculated and control samples after inoculation with *H. seropedicae* SmR1-----65
- Table 7** Bacterial DNA copy number/g root or leaf (fresh weight) of P30F53 *Zea mays* cultivated in soil, inoculated and control samples after inoculation with *H. seropedicae* SmR1-----66
- Table 8** Amplification efficiencies and correlation coefficients (R^2) for RT-qPCR validation assay. The values were obtained using standard curves of serial dilution of an *in vitro* inoculated root cDNA sample-----67

Table 9 Chlorotic and necrotic area of maize leaves pre-treated with *H. seropedicae* and inoculated with *C. graminicola* at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT)-----85

Table 10 Area of maize leaves (cm²) pre-treated with *H. seropedicae* and inoculated with *C. graminicola* at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT). Mean values correspond to the average of 4 replicates, each one being comprised of three leaves (n = 12). Data are presented as mean ± SD. The groups represent: -H (non-treated) and +H (treated)-----85

Table 11 Chlorotic and necrotic area of maize leaves pre-treated with *H. seropedicae* with or without humic substances and inoculated with *C. graminicola* at 3 and 7 days after treatment (DAT)-----86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 O Nitrogênio, as Plantas e o Meio Ambiente	23
2.2 Bactérias Diazotróficas	25
2.3 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal	27
2.4 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	29
2.5 Substâncias Húmicas	32
2.6 A Relação Desvantajosa entre <i>Colletotrichum graminicola</i> e o Milho e Formas de Defesa das Plantas	34
2.7 Bactérias que Atuam no Controle de Doenças e seus Benefícios	45
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4 CAPÍTULO I	53
Tools to evaluate <i>Herbaspirillum seropedicae</i> abundance and <i>nifH</i> , <i>rpoC</i> and <i>hrcN</i> expression in inoculated maize seedlings grown <i>in vitro</i> and in soil	53
Abstract	53
Introduction	54
Material and Methods	56
Results	61

Discussion	70
5 CAPÍTULO II	77
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> colonize and promote plant growth but do not control anthracnose in maize leaves.....	77
Abstract	77
Introduction	78
Material and Methods.....	80
Results	83
Discussion	85
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

As plantas são externa e internamente habitadas por uma ampla variedade de microrganismos, os quais exercem importante papel na manutenção da vida na Terra. A coletividade desses organismos é conhecida como microbiota da planta (Mendes *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2013). Essa microbiota é composta por vírus, bactérias e fungos, os quais tentam explorar diferentes habitats para obtenção de fontes de nutrientes. No curso da evolução, os parceiros das interações formadas entre seres vivos desenvolveram-se paralelamente na busca de mecanismos para beneficiar-se da associação ou para lutar por sobrevivência. Exemplos de formas de interações ocorreram, por exemplo, em relações estabelecidas entre as bactérias associativas diazotróficas, que realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), e os vegetais. Além disso, estabeleceram-se também, as interações de patogenicidade entre os seres vivos (Baron e Zambryski, 1995; Chubatsu *et al.*, 2012).

Microrganismos diazotróficos podem ser de vida livre ou podem estabelecer íntima associação com seres vivos, formando relação harmoniosa. Em associação com vegetais, tais organismos são capazes de transferir o nitrogênio fixado à planta hospedeira e colonizar os tecidos internos vegetais sem causar danos ao hospedeiro (Chubatsu *et al.*, 2012). Exemplar do grupo dos diazotróficos, *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria endofítica capaz de colonizar raízes, caules e folhas de gramíneas, como por exemplo, o milho (Olivares *et al.*, 1996).

Estudos recentes têm contribuído para a maior compreensão dos mecanismos envolvidos nas bases da interação entre milho e *H. seropedicae* (Do Amaral *et al.*, 2014; Ferrari *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2015), apesar disto, a continuação dos estudos na área deve ser priorizada, uma vez que ainda existem lacunas a serem preenchidas. Assim, uma vez que diferentes condições experimentais são importantes quando se almeja buscar o entendimento acerca das funções dos microrganismos quando em associação com plantas hospedeiras, apenas condições controladas de cultivo das plantas (experimentos laboratoriais *in vitro*, por exemplo), podem não representar o real efeito do microrganismo endofítico na planta hospedeira como quando a planta é cultivada em condições variáveis mais próximas à realidade (Hardoim *et al.*, 2015). Em vista das razões mencionadas, o presente trabalho realizou a investigação da interação entre *H. seropedicae* SmR1 e milho cultivar P30F53 em duas condições

experimentais. Para tanto, plantas de milho cultivadas *in vitro* e em solo foram usadas para quantificar a presença do DNA bacteriano, bem como quantificar genes bacterianos *in planta* através de ferramentas moleculares.

Por outro lado, relação desarmônica ocorre entre o fungo patogênico *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wilson e o milho. Nesse caso, o fungo causa a doença conhecida como antracnose, a qual pode afetar grande parte dos tecidos vegetais (Sukno *et al.*, 2008), sendo a doença mais importante que acomete plantas de milho no Brasil (Cota *et al.*, 2012). Apesar de a doença poder afetar todas as partes da planta, folhas (na forma de podridão da folha) e colmos (no estágio de podridão do colmo) são as partes mais comumente prejudicadas (Bergstrom e Nicholson, 1999). A patologia nestas duas fases pode reduzir o rendimento das culturas, seja através da senescência prematura das plantas ou ainda por prejuízos na colheita dos grãos devido ao tombamento dos colmos (Jirak-Peterson e Esker, 2011).

Está bem estabelecido, que muitos microrganismos associativos são capazes de induzir respostas sistêmicas em plantas e isto pode resultar na ativação de mecanismos de defesa vegetal (Pieterse *et al.*, 2003; Compant *et al.*, 2005), incluindo, por exemplo, indução de resistência contra antracnose em plantas de milho por espécies de *Pseudomonas* (Planchamp *et al.*, 2015), bem como em outras plantas por espécies de *Bacillus* e *Azospirillum* (Tortora *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). Além disso, a associação entre bactérias benéficas e substâncias húmicas tem se mostrado um caminho promissor para expandir os benefícios da utilização de microrganismos diazotróficos endofíticos (Canellas *et al.*, 2013). Nesse sentido, investigou-se uma possível influência exercida por *H. seropedicae* e aplicação de substâncias húmicas no controle da antracnose causada por *C. graminicola* em plantas de milho P30F53.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Nitrogênio, as Plantas e o Meio Ambiente

O nitrogênio constitui elemento primário de nucleotídeos e proteínas, sendo, portanto, essencial para a vida. O maior *pool* de nitrogênio na atmosfera é constituído pelo nitrogênio atmosférico (N_2), que compõe cerca de 79% do ar seco, porém, a ligação tripla que une os dois átomos de nitrogênio é extremamente forte, sendo passível de quebra apenas mediante alguns poucos processos. Na natureza, por exemplo, apesar de pouco comum, a energia para a quebra da molécula pode ser proveniente de relâmpagos. No entanto, a forma mais comum de quebra se dá através da ação de microrganismos (Robertson e Vitousek, 2009). Como o N_2 não é assimilável à maioria dos organismos, algumas espécies de procariotos podem reduzir o nitrogênio atmosférico a amônio (NH_4^+), num processo que incorre em gasto energético, chamado fixação de nitrogênio (Chubatsu *et al.*, 2012). Assim, a forma biologicamente disponível do nitrogênio está presente em poucas quantidades na maioria dos ecossistemas terrestres, e pelo menos no mesmo nível que os outros nutrientes, a disponibilidade de nitrogênio limita o crescimento das plantas e a produção primária, afetando a estrutura e função da maioria dos ecossistemas (Robertson e Vitousek, 2009).

No ciclo do nitrogênio, quando reduzido à amônia (NH_3), o nitrogênio pode ser incorporado em precursores para macromoléculas biológicas (proteínas e ácidos nucleicos, por exemplo). A reoxidação da amônia a N_2 , por microrganismos (via nitrito e outros níveis de oxidação do nitrogênio), leva à depleção do *pool* de nitrogênio fixado e biologicamente utilizável (Howard e Rees, 1994).

O nitrogênio é muito importante para os sistemas agrícolas. A adição de nitrogênio para sustentar e aumentar o rendimento dos cultivos consiste em característica fundamental e difundida da agricultura moderna. Se por um lado o nitrogênio adicionado permite maior cultivo de alimentos em uma determinada área, por outro lado, existem prejuízos significativos associados a essa prática. Por exemplo, uma vez que o nitrogênio é móvel e de difícil contenção, mesmo que uma parte dele seja eficientemente levada na colheita, outra parte ainda permanece no meio ambiente. A maior fração do nitrogênio mobilizado a partir de sistemas agrícolas é reativa, estando presente em sua forma biologicamente ativa em solos e águas superficiais e/ou quimicamente reativa na atmosfera. Esse aumento na quantidade de nitrogênio reativo

em decorrência de práticas agrícolas é substancial e generalizado, levando a perdas na diversidade biológica, comprometimento da qualidade do ar e da água e ameaças à saúde humana (Robertson e Vitousek, 2009).

Em escala global, no ano de 2014, foram aplicadas mais de 109 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados (FAOSTAT, 2016). A organização para alimentação e agricultura da ONU (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT) monitora esse índice desde o ano de 2002, sendo notável o crescimento da utilização de tais insumos ano após ano, chegando a aumentar quase 32% nos 12 anos de monitoramento (de 2002 a 2014). Do total de fertilizantes nitrogenados aplicados em 2014, o Brasil foi responsável pelo consumo de aproximadamente 3,9 milhões de toneladas. A previsão, para o ano de 2030, é de que apenas no Brasil sejam utilizadas mais de 7 milhões de toneladas destes insumos (FAOSTAT, 2016). Embora a prática agrícola do uso de fertilizantes seja necessária, ela representa grande custo econômico e acarreta amplo impacto ambiental (Arruda *et al.*, 2013).

A eficiência do uso de nitrogênio pelas plantas depende de uma série de fatores, como as características do solo, fatores climáticos, práticas agrícolas, tipo de cultura e manuseio da aplicação do fertilizante (Malhi *et al.*, 2001). A eficiência geral do nitrogênio aplicado é menor que 50% nas regiões tropicais e subtropicais (Baligar e Bennett, 1986). As perdas do nitrogênio aplicado no solo são ocasionadas por processos de volatilização, imobilização, desnitrificação e lixiviação (Malhi *et al.*, 2001). Ao invés de ser aproveitado pelas plantas, esse nutriente escapa para a atmosfera ou atinge recursos hídricos, onde se torna um potencial poluente atmosférico e aquático, causando, por exemplo, impactos na água potável, eutrofização de águas doces e ecossistemas marinhos, alterando também o balanço nos gases do efeito estufa, sendo o óxido nitroso (N_2O) o principal gás emitido pelo uso de fertilizantes na agricultura. Além dos impactos ambientais citados, o preço dos fertilizantes e a quantidade utilizada apresentam índices crescentes (Good e Beatty, 2011).

Uma das culturas mais antigas, o milho (*Zea mays* L.), também requer a aplicação de fertilização mineral no solo, a fim de aumentar seu rendimento (Arruda *et al.*, 2013). Cultura amplamente cultivada em muitas áreas do mundo, o milho tem sido o segundo cultivo mundial desde o ano de 2001, sendo que em 2014 a produção totalizou mais de 1 bilhão de toneladas. No Brasil, no mesmo ano, a produção atingiu mais de 79 milhões de toneladas, sendo também a segunda cultura mais

produzida no país, que é o terceiro maior produtor mundial (FAOSTAT, 2016). Quanto ao valor da cultura, seu grão é utilizado como alimento humano e animal e como matéria-prima para a indústria. No Brasil, possui importância econômica e social tanto na agricultura familiar quanto na agroindústria (Arruda *et al.*, 2013). Além disso, o milho, por mais de um século, tem sido considerado como organismo modelo para a realização de pesquisas científicas na área biológica (Lawrence *et al.*, 2008).

Pesquisas científicas têm sido realizadas com vistas à redução da quantidade de fertilizantes aplicados em lavouras. Uma das formas de se atingir este objetivo consiste na utilização de bactérias de vida livre que habitam o solo, são benéficas às plantas e, quando associadas às raízes ou outros tecidos vegetais, podem melhorar o suprimento de nutrientes às plantas cultivadas (Arruda *et al.*, 2013). Sendo assim, busca-se aliar a aplicação de inoculantes bacterianos à redução da dose de adubação nitrogenada nas culturas, diminuindo os custos de produção e aumentando a eficiência do uso do nitrogênio pelas plantas.

2.2 Bactérias Diazotróficas

Interações entre o solo, as plantas e os microrganismos são complexas e conhecidas por influenciarem a saúde vegetal e a produtividade (Shahzad *et al.*, 2013). Quando a conversão do nitrogênio atmosférico em amônia ocorre por meio de bactérias simbiotes, associativas ou de vida livre, o processo passa a ser conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN), mecanismo que representa grande importância ao ambiente e à agricultura mundial. Tal fenômeno consiste numa importante etapa do ciclo do nitrogênio, pois restitui o conteúdo geral de nitrogênio da biosfera e compensa as perdas devido à desnitrificação. O nitrogênio fixado que é fornecido pela FBN é menos propenso à lixiviação e volatilização, uma vez que é utilizado *in situ*, sendo assim, tal processo biológico fornece um importante viés para a sustentabilidade na agricultura (Dixon e Kahn, 2004).

Assim, algumas espécies de microrganismos fisiologicamente diversos possuem o sistema enzimático da nitrogenase (Howard e Rees, 1994), o qual é capaz de realizar a catálise da redução do N_2 atmosférico. Tais microrganismos são chamados diazotróficos, sendo um dos grupos mais estudados, aqueles que vivem em associação íntima com vegetais, e que possuem potencial de transferir o nitrogênio fixado à planta associada. Quanto aos diazotróficos associativos, são

microrganismos capazes de colonizar tecidos internos das plantas sem causar alterações morfológicas no hospedeiro (Chubatsu *et al.*, 2012).

A diversidade dos organismos diazotróficos é muito grande, pois apesar de não haver representantes eucariotos, dentre os procariotos, existe grande diversidade entre Bacteria e Archeae. A habilidade de fixar nitrogênio é encontrada na maioria dos grupos filogenéticos de bactérias, incluindo as Proteobacterias. Tais organismos são encontrados em uma ampla gama de habitats, por exemplo, os diazotróficos de vida livre podem ser encontrados tanto na água quanto no solo, e os simbioses ou associativos, relacionando-se com gramíneas, vísceras de cupins, moluscos, plantas lenhosas (actinorrízicas) ou nódulos em raízes de plantas leguminosas (Dixon e Kahn, 2004).

A nitrogenase consiste num complexo de 2 componentes metaloenzimáticos, que catalisam a redução de N_2 , obtendo rendimento de 2 moléculas de amônia (NH_3), reação dependente de ATP (MgATP) (Simpson e Burris, 1984). A redução do N_2 atmosférico, envolvendo o H_2 , requer um mínimo de 8 elétrons e a hidrólise de 16 moléculas de ATP numa cascata de eventos (Duval *et al.*, 2013). Os dois componentes proteicos do complexo nitrogenase, que podem ser isolados um do outro, são geralmente designados por Fe-proteína e FeMo-proteína (Eady, 1996).

Vários tipos de associações/interações ocorrem entre diazotróficos e suas plantas hospedeiras. O mais específico e eficiente processo para fixação de nitrogênio envolve a formação de nódulos radiculares em leguminosas e não leguminosas. Um exemplo de associação com leguminosas consiste na simbiose entre bactérias do gênero *Rhizobium* e plantas da família Fabaceae. Em relação a não leguminosas, pode-se citar as bactérias do gênero *Frankia* em associação com plantas lenhosas, denominadas actinorrízicas, pertencentes a diversas famílias (Santi *et al.*, 2013).

Membros da família Poaceae não formam, naturalmente, associações simbióticas para realizar a fixação de nitrogênio. Entretanto, tem sido demonstrado que parte substancial de seu nitrogênio provém da FBN. Embora a quantidade de nitrogênio fixado não seja tão grande quanto à mensurada em leguminosas noduladas por rizóbios ou em plantas actinomicorrízicas, aumentos no rendimento têm sido reportados a campo (Santi *et al.*, 2013). Estudo recente utilizando marcação com Nitrogênio-13 e *Setaria viridis* como organismo modelo, demonstrou que de fato, a planta hospedeira incorpora em suas proteínas o nitrogênio proveniente da FBN realizada pela combinação de duas

bactérias fixadoras de nitrogênio (*Azospirillum brasilense* e *H. seropedicae*) (Pankiewicz *et al.*, 2015).

2.3 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

Muitas bactérias diazotróficas são capazes de promover o crescimento nas plantas às quais se associam, passando a serem denominadas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV, ou em inglês, *plant growth promoting bactéria* - PGPB) (Reis e Teixeira, 2015). Para as BPCV possuem um efeito benéfico no crescimento da planta via melhoria do status nutricional de seu hospedeiro, existe, em primeiro lugar, a necessidade de haver uma íntima relação entre a bactéria e sua planta hospedeira. Entretanto, o grau de intimidade entre os dois organismos depende da forma e do local de colonização da bactéria em seu hospedeiro. As relações entre BPCV/hospedeiro podem ser categorizadas em rizosféricas, endofíticas e epifíticas (James *et al.*, 2002; Vessey, 2003).

Por rizosfera entende-se a zona de solo que circunda a raiz da planta, na qual a biologia e a química desse solo são influenciadas pelas raízes. Compostos orgânicos liberados pelas raízes das plantas incluem aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos, ácidos orgânicos, fenólicos, reguladores de crescimento vegetal, açúcares, vitaminas e compostos antimicrobianos (Lugtenberg e Kamilova; 2009; Turner *et al.*, 2013). Os aminoácidos e açúcares liberados no exsudato das plantas constituem uma rica fonte de energia e nutrientes para as bactérias (Gray e Smith, 2005). Sendo assim, a estrutura da comunidade de rizobactérias é determinada pelas espécies vegetais, assim como as diferenças na composição e quantidade de exsudatos das raízes afetam as populações de microrganismos (Perez-Montano *et al.*, 2014). Em relações rizosféricas, BPCV colonizam a rizosfera, a superfície da raiz (podendo estar aderidas ao órgão vegetal) ou mesmo espaços intercelulares superficiais (nesse caso envolvendo camada de células mortas). As bactérias do gênero *Azospirillum* são exemplos de bactérias encontradas anexadas à raiz da planta hospedeira (Vessey, 2003).

Nas relações endofíticas, a BPCV reside, de fato, dentro de espaços apoplásticos no interior da planta hospedeira. Exemplo bem caracterizado consiste na já referida simbiose entre leguminosas e rizóbios. Porém, em muitas relações endofíticas, não existe a formação de uma estrutura especializada como os nódulos. Dependendo dos organismos envolvidos na relação, a bactéria pode ser encontrada em todas as partes da planta, como sementes, raízes, folhas, frutos, etc.

Endofíticos diazotróficos tendem a colonizar o córtex da raiz e devem penetrar a endoderme para colonizar o cilindro vascular, a partir do qual devem ser subsequentemente translocados para a parte aérea. Tais organismos não vivem no interior de células saudáveis do hospedeiro, mas sim, colonizam o apoplasto dos vasos do xilema ou espaços intercelulares (James, 2000; Vessey, 2003). Já nas relações epifíticas, a bactéria encontra-se associada à superfície da planta, sendo que no gênero *Herbaspirillum*, essa população é pelo menos tão grande quanto à endofítica (James *et al.*, 2002).

Desde a década de 90, tem-se observado um crescente interesse na utilização de bactérias diazotróficas dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Rhizobium* e *Herbaspirillum* como BPCV (Monteiro *et al.*, 2012).

A promoção do crescimento vegetal pode ocorrer de forma direta ou indireta. Diretamente ocorre quando a produção de compostos pelos microrganismos facilita a captação de nutrientes pelas plantas a partir do meio ambiente. Tais mecanismos incluem, por exemplo, a FBN, a solubilização de minerais, tais como o fósforo (P), produção de sideróforos e síntese de substâncias promotoras de crescimento, incluindo fitormônios. Já a produção indireta ocorre por meio da prevenção ou diminuição de efeitos deletérios causados por microrganismos patogênicos. Tal processo é acompanhado pela produção de substâncias antagonistas, o que leva à maior proteção do vegetal e resulta em aumento no crescimento, ou ainda pode ocorrer a partir da indução de resistência a patógenos (Glick, 1995; Penrose e Glick, 2003; Arruda *et al.*, 2013). Uma PGPB em particular pode afetar o crescimento e o desenvolvimento de uma planta através do uso de apenas um, ou ainda, mais de um desses mecanismos (Beneduzi *et al.*, 2012). Bactérias que possuem características que as tornam capazes de promover crescimento vegetal, incluindo solubilização de fosfatos, produção de ácido indolacético (AIA) e sideróforos, fixação de nitrogênio, entre outras, possuem potencial de uso como inoculantes promotores de crescimento vegetal a fim de aumentar o rendimento de culturas agrícolas (Arruda *et al.*, 2013).

Recentemente, propôs-se a existência de uma unidade coordenada formada pelos componentes dinâmicos “solo-rizosfera-rizoplano-endofíticos-planta”, a qual proporciona a integração da planta com o ambiente e gera respostas adaptativas nas mesmas a fim de promover seu crescimento (Carvalho *et al.*, 2016).

2.4 *Herbaspirillum seropedicae*

Inicialmente, a β -proteobactéria *H. seropedicae* foi descrita como *Azospirillum seropedicae*, devido a similaridades com o gênero *Azospirillum*. Porém, no ano de 1986 foi proposto o novo gênero *Herbaspirillum*, pois se observou que as espécies vibrióides (às vezes helicoidais), gram-negativas, móveis (contendo de um a três flagelos polares) e microaeróbicas isoladas de solo e raízes de milho, sorgo e arroz apresentavam algumas diferenças se comparadas ao gênero *Azospirillum*, havendo necessidade de uma nova classificação (Baldani *et al.*, 1986).

Parte do diverso gênero *Herbaspirillum*, a espécie *H. rubrisubalbicans*, proximamente relacionada com *H. seropedicae*, pode formar associações benéficas com membros da família Poaceae, porém, causa doença branda em variedades suscetíveis de cana-de-açúcar (Olivares *et al.*, 1997). Assim, devido à natureza patogênica de algumas cepas de *Herbaspirillum* e sua habilidade de penetrar em plantas hospedeiras, a associação *Herbaspirillum*-planta tem sido estudada em detalhes nos níveis moleculares, fisiológicos e microscópicos, tornando-se um modelo para o entendimento da complexidade da promoção de crescimento vegetal, especialmente em Poaceae, por bactérias diazotróficas geralmente não patogênicas. Muitas espécies do gênero *Herbaspirillum* não são diazotróficas e não formam associações com plantas, mas sim, vivem em ambientes aquáticos e/ou em solos poluídos ou não poluídos. No que se refere às espécies associativas pertencentes ao gênero, podem formar associações com uma ampla variedade de plantas, porém, mais particularmente associam-se com membros da família Poaceae (Monteiro *et al.*, 2012).

H. seropedicae foi encontrado em associação com plantas de interesse agrônômico, como milho, sorgo, arroz, trigo e cana de açúcar (Baldani *et al.*, 1986; Olivares *et al.*, 1996). Em estudo envolvendo a inoculação de arroz com *H. seropedicae*, foi demonstrado que a bactéria penetra na raiz via rachaduras nos pontos de emergência das raízes laterais. Em seguida, coloniza espaços intercelulares radiculares, aerênquima, o córtex e o xilema radicular, de onde se espalha para a parte aérea da planta (James *et al.*, 2002). Utilizando plantas de milho, sorgo, arroz e trigo inoculadas com *H. seropedicae*, confirmou-se que a bactéria inicialmente coloniza a superfície radicular e em seguida ocupa espaços internos. Na sequência ocupa os vasos do xilema, sendo também encontrada em caules e folhas (Roncato-Maccari *et al.*, 2003). Tais afirmações são confirmadas e complementadas em estudo

envolvendo a bactéria e plantas de milho, no qual foi demonstrado que o microrganismo está aderido à superfície radicular 30 minutos após a inoculação, visível em tecidos internos em 24 horas e na endoderme, cilindro central e xilema três dias após a inoculação (Monteiro *et al.*, 2008). A associação entre *H. seropedicae* e plantas provavelmente tem início com a atração exercida pelas raízes vegetais na bactéria, uma vez que esse órgão fornece fonte de carbono para o microrganismo (Monteiro *et al.*, 2012).

A cepa mais bem estudada de *H. seropedicae*, SmR1, é um mutante espontâneo resistente à estreptomicina da cepa Z78 (ATCC 35893) (Baldani *et al.*, 1986; Pedrosa *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2012). Ensaios apontam para a rápida colonização da planta de milho por *H. seropedicae* SmR1. Nesse sentido, foi detectada e quantificada, em ensaios de cultivo *in vitro* e *in vivo* em areia esterilizada, a presença da bactéria em raízes de milho aos 4, 7 e 10 dias após a inoculação (Pereira *et al.*, 2014). Utilizando também sistema de cultivo em areia autoclavada, foi demonstrado que a presença da bactéria na raiz da planta, quatro dias após a inoculação, foi capaz de modular a expressão de genes relacionados à sinalização de respostas de defesa vegetal (Amaral *et al.*, 2014). Assim, pode-se afirmar que a bactéria pode ser detectada, quantificada e modula respostas da planta logo no início do estabelecimento da interação.

O genoma de *H. seropedicae* SmR1 foi sequenciado e anotado pelo Programa Genoma do Estado do Paraná (GENOPAR), e está publicado no GenBank sob o número de acesso NC_014323.1. É composto por um cromossomo circular de 5,513,887 pares de bases e 4,804 genes, possuindo genes envolvidos na fixação de nitrogênio (genes *nif*) e genes que codificam proteínas de sistemas de secreção, como o sistema de secreção tipo 3 (T3SS, do inglês *type three secretion system*) (Pedrosa *et al.*, 2011).

Os genes *nif* são responsáveis pela biossíntese, maturação e montagem da enzima nitrogenase (Chubatsu *et al.*, 2012), que por sua vez realiza a catálise do N₂ a NH₃, processo central da FBN (Rees e Howard, 2000). Os genes *nifH*, por sua vez, codificam o componente menor da enzima nitrogenase, dependente de ferro (Peters *et al.*, 1995; Rees e Howard, 2000; Dixon e Kahn, 2004). A bactéria *H. seropedicae* expressa os genes *nif* no interior de tecidos de diversas plantas, dentre as quais o milho (Roncato-Maccari *et al.*, 2003).

Como mencionado, *H. seropedicae* SmR1 possui genes envolvidos na codificação de proteínas do sistema de secreção do tipo T3SS, entre os quais 8 genes *hrc* (*hypersensitive response conserved*)

(Pedrosa *et al.*, 2011), sendo um deles o gene *hrcN*. O sistema de secreção de proteínas pelo T3SS ocorre em bactérias Gram-negativas, por meio do injectiossomo, maquinário que tem por função realizar o transporte de proteínas efetoras da célula bacteriana até o citosol da célula hospedeira, através das membranas celulares. No interior das células hospedeiras, a proteína efetora irá modular uma ampla variedade de funções celulares, incluindo respostas imunes e de defesa (Desvaux *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2009).

Maquinaria altamente conservada desde as bactérias até os seres humanos, a RNA polimerase DNA-dependente, é responsável pela transcrição em todos os organismos celulares. Sendo formada por um conjunto de subunidades, a subunidade β' é a responsável por se ligar ao DNA molde durante a passagem das informações contidas no DNA para a fita simples de RNA (A Darst, 2001; Murakami e Darst, 2003). O gene da subunidade β' da RNA polimerase DNA-dependente (*rpoC*) de *H. seropedicae* já foi utilizado como gene de referência endógena para quantificação de expressão gênica da bactéria por RT-qPCR, para validar resultados de análise proteômica de *H. seropedicae* cultivado em presença de extrato de cana de açúcar (Cordeiro *et al.*, 2013). Sendo assim, tanto os genes envolvidos na fixação de nitrogênio (*nifH*), quanto os envolvidos no sistema de secreção T3SS (*hrcN*) e o pertencente a uma subunidade da RNA polimerase (*rpoC*) de *H. seropedicae* possuem potencial para serem utilizados para monitorar a presença da bactéria quando em associação com uma planta hospedeira.

Métodos diversos têm sido aplicados para a quantificação de bactérias do gênero *Herbaspirillum* quando em associação com plantas. Os métodos clássicos de quantificação, por exemplo, baseiam-se na capacidade do microrganismo crescer e se multiplicar em determinado meio de cultura (Nocker e Camper, 2009). Uma das formas clássicas de quantificação envolve a contagem em placas, técnica já empregada para a quantificação de *H. seropedicae* (Monteiro *et al.*, 2008; Pankiewicz *et al.*, 2015; Amaral *et al.*, 2016). Porém, a contagem em placas apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, consumir elevadas quantidades de reagentes e materiais e demandar dias para a obtenção do resultado final da análise (Nocker e Camper, 2009; Von Felten *et al.*, 2010; Achilleos e Berthier, 2013). Outra abordagem clássica envolve a metodologia da contagem do número mais provável (NMP) de culturas inoculadas. Tal técnica, apesar de utilizada para a quantificação de *H. seropedicae* (Canellas *et al.*, 2013), apresenta difícil reprodutibilidade, também exigindo tempo para a obtenção de resultados, o que a torna não aplicável quando existe necessidade de rápido monitoramento,

principalmente em experimentos realizados em larga escala (Von Felten *et al.*, 2010). Nesse contexto, almeja-se o emprego de um método alternativo que apresente alta especificidade, sensibilidade e velocidade para realizar a quantificação do microrganismo. A PCR quantitativa surge nesse cenário como uma alternativa rápida e fácil a ser aplicada para tal fim (Von Felten *et al.*, 2010). Com o uso dessa ferramenta, os microrganismos passam a ser estudados por apresentarem ácidos nucleicos (DNA/RNA) característicos ao invés de sua capacidade de crescerem em determinados meios de cultura, como ocorre nos métodos clássicos de quantificação. Além disso, populações menos abundantes podem ser detectadas (Cocolin *et al.*, 2013). Para *H. seropedicae* a PCR quantitativa pode ser empregada, uma vez que foram desenvolvidos iniciadores específicos para a quantificação da espécie quando em associação com plantas (Pereira *et al.*, 2014). Deste modo, a PCR em tempo real consiste numa importante ferramenta para estudos futuros envolvendo a interação entre plantas e microrganismos, incluindo a associação entre *H. seropedicae* e plantas de milho.

2.5 Substâncias Húmicas

Existem meios de potencializar o efeito das BPCV, como por exemplo, através da utilização de substâncias húmicas. Tão antiga quanto a evolução dos ambientes terrestres é a ação direta das substâncias húmicas no crescimento das plantas. Nesse sentido, a pressão de seleção que as plantas enfrentaram quando colonizaram a terra influenciou no aumento de suas áreas de superfície de absorção nos solos, buscando sanar o aumento da atividade de seus órgãos fotossintetizantes, afinal, tornava-se necessário haver um equilíbrio entre a interceptação da luz e fixação de CO₂ com captação de água e nutrientes do solo (Canellas *et al.*, 2015).

Substâncias húmicas são compostos orgânicos naturais que derivam da decomposição e transformação de plantas, animais e resíduos de microrganismos e representam o maior componente da mistura de materiais que formam a matéria orgânica do solo. Considerados bioestimulantes, os ácidos húmicos levam ao maior acúmulo de nutrientes nos tecidos vegetais, além de mudanças metabólicas positivas. Entre suas diferentes funções, influenciam o crescimento vegetal favorecendo a captação de nutrientes pelas plantas, e exercem efeito positivo na atividade e expressão de genes que codificam enzimas do metabolismo primário e secundário de plantas (Canellas e Olivares, 2014; Rose *et al.*, 2014; Nardi *et al.*, 2016).

O termo vermicomposto representa o produto de uma acelerada degradação da matéria orgânica através do uso de alta densidade de populações de minhocas (Zaller, 2007). As substâncias húmicas podem ser isoladas a partir de vermicomposto produzido com variadas fontes de matéria orgânica. Trabalhos recentes têm aplicado substâncias húmicas em diversas plantas, as quais foram extraídas principalmente a partir de duas fontes de matéria orgânica: esterco bovino (Canellas *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2013; Da Silva Lima *et al.*, 2014; Hernandez *et al.*, 2015; Olivares *et al.*, 2015; Aguiar *et al.*, 2016; Jindo *et al.*, 2016), ou torta de filtro e bagaço de cana-de-açúcar (Jindo *et al.*, 2016), seguida por ação de minhocas da espécie *Eisenia foetida*. As substâncias húmicas também podem ser extraídas de variadas fontes, como por exemplo, do carvão mineral (turfa, lignite e hulha), solo, compostos e restos orgânicos crus (Rose *et al.*, 2014).

Substâncias húmicas são formadas por misturas de pequenas moléculas contendo cadeias alifáticas, anéis aromáticos e grupos ionizáveis funcionais que interagem entre si por ligações de pontes de hidrogênio, formando agregados coloidais. As fracas ligações que unem essas moléculas podem ser facilmente quebradas por moléculas orgânicas liberadas no exsudato das plantas, formando moléculas ainda menores que por sua vez podem ter acesso a receptores celulares e influenciar o crescimento das plantas. As substâncias húmicas exibem propriedades micelares quando em solução aquosa, produzindo regiões hidrofóbicas em seu interior, as quais se separam da região aquosa em que estão inseridas por camadas exteriores hidrofílicas. Com base na solubilidade sob condições alcalinas ou ácidas, as substâncias húmicas podem ser fracionadas em: humina (fração insolúvel das substâncias húmicas); ácido húmico (fração solúvel sob condições alcalinas, mas não ácidas, geralmente $\text{pH} < 2$); e ácido fúlvico (fração solúvel sob qualquer condição de pH). Porém, esta separação das substâncias húmicas em três frações é operacional e não indica a existência de distintas moléculas orgânicas (Piccolo, 2001; Sutton e Sposito, 2005; Canellas e Olivares, 2014; Rose *et al.*, 2014).

Estudos apontam para o uso de ácidos húmicos a fim de melhorar os benefícios da inoculação de plantas com microrganismos diazotróficos endofíticos (Da Conceicao *et al.*, 2008; Da Conceicao *et al.*, 2009; Martinez-Balmori *et al.*, 2013; Da Silva Lima *et al.*, 2014; Olivares *et al.*, 2015; Aguiar *et al.*, 2016). Diversos estudos têm sido realizados para elucidar os efeitos da utilização de substâncias húmicas em plantas de milho (associadas ou não a bactérias diazotróficas endofíticas). Foi reportada, por exemplo, mudança no perfil dos

exsudatos de raízes de milho após aplicação de substâncias húmicas, incluindo aumento na secreção de íons inorgânicos (como H^+) (Canellas *et al.*, 2002) e ácidos orgânicos de cadeia curta (Canellas *et al.*, 2008). Utilizando em conjunto bactérias diazotróficas e substâncias húmicas, a co-inoculação de *H. seropedicae* e ácidos húmicos em plantas de milho resultou em crescimento da planta, maior número de bactérias viáveis nas raízes, além 65% de aumento na produção de grãos (Canellas *et al.*, 2013). Assim pode se afirmar que, as mudanças químicas induzidas pela matéria orgânica na rizosfera agem no sentido de aumentar a taxa de colonização de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de milho quando inoculadas em conjunto com substâncias húmicas (Da Silva Lima *et al.*, 2014).

2.6 A Relação Desvantajosa entre *Colletotrichum graminicola* e o Milho e Formas de Defesa das Plantas

Tanto os órgãos vegetais aéreos quanto os subterrâneos estão constantemente expostos ao íntimo contato com uma variedade de microrganismos, incluindo, por exemplo, vírus, bactérias e fungos. O resultado de tais relações nem sempre é benéfico para os organismos foto-autotróficos (como relatado até então), na verdade, a maioria das interações planta-microrganismos permanece macroscopicamente assintomática. Porém, muitas vezes, os encontros são desvantajosos para as plantas, podendo trazer doenças e em casos extremos resultando em colapso total dos tecidos vegetais (Lipka e Panstruga, 2005).

Um exemplo de relação desarmoniosa ocorre entre o fungo filamentosso *C. graminicola* e o milho, resultando na doença chamada antracnose. A doença pode afetar a maioria dos tecidos do milho, porém a podridão do colmo bem como a fase da doença que provoca lesões em folhas são as formas que causam maiores danos econômicos (Sukno *et al.*, 2008). O gênero *Colletotrichum* compreende um grande numero de fungos fitopatogênicos e saprofíticos que podem causar o conjunto de sintomas conhecidos por antracnose em mais de 197 espécies de plantas incluindo plantas de cultivo, ervas daninhas e árvores (Park *et al.*, 2013).

O início dos sintomas da antracnose foliar do milho normalmente ocorre três dias após a infecção da planta, sob a forma de manchas cloróticas de vários formatos, que se transformam em lesões necróticas acinzentadas (sintoma referido como antracnose) (Bergstrom e Nicholson, 1999). Na fase da podridão da folha, as lesões na folha acarretam a diminuição da área fotossintética, levando à senescência, e essa diminuição na produção dos fotoassimilados dificulta o enchimento

de grãos. Na fase de podridão do colmo, o patógeno consome as reservas acumuladas no caule, as quais seriam utilizadas para o enchimento de grãos. Sendo assim, a doença provoca perdas em rendimento na cultura do milho, o que culmina em prejuízos econômicos nas lavouras (Sukno *et al.*, 2008; Cota *et al.*, 2012).

C. graminicola é um organismo bem adaptado para a sobrevivência em agroecossistemas de milho uma vez que é tanto um patógeno agressivo no interior da planta, quanto um saprófita facultativo em resíduos desta cultura (Bergstrom e Nicholson, 1999). A espécie *Glomerella graminicola* consiste no estado sexual de *C. graminicola*, porém, tal qual ocorre na grande maioria das espécies do gênero, formas teleomórficas são raras ou ausentes (Crouch e Beirn, 2009).

O ciclo da antracnose do milho possui 5 fases temporais: produção e disseminação do inóculo primário, inóculo primário provocando doença em plântulas, fase foliar a partir de inóculo secundário, colonização sistêmica e podridão do colmo e sobrevivência saprofítica. O reservatório do inóculo primário são os resíduos da cultura de milho que permanecem no solo e sobrevivem ao inverno. O início da infecção das folhas das plântulas ocorre a partir de esporos produzidos em acérvulos em detritos de milho, que, são levados para as plântulas próximas através de respingos de chuva. Os acérvulos produzidos por *C. graminicola* contêm pelos estéreis altamente melanizados chamados cerdas. Seus conídios (esporos assexuais) possuem formato falciforme. Ciclos repetidos de produção de conídios em folhas infectadas formam o inóculo secundário, que vai causar novas infecções foliares e caulinares. Através de ferimentos, o patógeno penetra no caule e, uma vez que o patógeno é bem adaptado para colonizar os vasos do xilema, ocorre colonização sistêmica. Após, o fungo sobrevive saprofiticamente em resíduos de milho infectados na superfície do solo. Os conídios são produzidos e circundados por uma mucilagem extracelular que os protege da dessecação e outras condições adversas até que plântulas de milho suscetíveis estejam disponíveis. O fungo também produz um segundo tipo de esporo sexual, ovalado e menor que o conidio falciforme, cujo papel no ciclo da doença permanece desconhecido, apesar de ter sido encontrado em lesões no hospedeiro, vasos do xilema, células epidérmicas e pelos radiculares (Münch *et al.*, 2008; Panaccione *et al.*, 1989; Bergstrom e Nicholson, 1999; Sukno *et al.*, 2008; Crouch e Beirn, 2009).

Quanto ao processo de infecção de *C. graminicola* em milho, sendo um fungo hemibiotrófico, utiliza estratégia de infecção caracterizada por um período inicial biotrófico seguido pelo

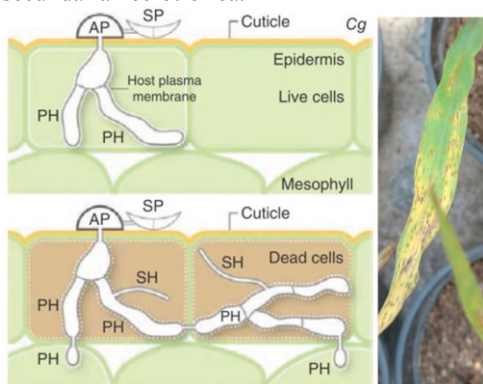
desenvolvimento de hifas necrotróficas secundárias as quais se ramificam pelos tecidos do hospedeiro matando as células conforme seu alastramento (Perfect e Green, 2001; Münch *et al.*, 2008). Com o intuito de invadir a célula epidérmica hospedeira, o conídio de *C. graminicola* germina, forma um tubo de germinação curto e se diferencia numa célula de infecção altamente especializada chamada apressório, imediatamente após o reconhecimento do hospedeiro (Münch *et al.*, 2008; Muencha *et al.*, 2008; Münch *et al.*, 2008). Patógenos hemibiotróficos do gênero *Colletotrichum* possuem apressórios em forma de domo que emitem hifas que perfuram a superfície hospedeira utilizando uma combinação de força mecânica e degradação enzimática. Em seguida, hifas biotróficas envolvidas por uma membrana plasmática intacta do hospedeiro se desenvolvem dentro de células epidérmicas vivas. Nessa fase, que dura entre 36 e 48 horas, o fungo cresce entre a membrana plasmática e a parede celular vegetal. Finalmente, o fungo passa a exibir comportamento necrotrófico, e passa a diferenciar hifas finas de rápido crescimento que destroem o tecido vegetal (O'connell *et al.*, 2012; Vargas, W. A. *et al.*, 2012). O processo infeccioso de *C. graminicola* e a visualização de alguns sintomas em plantas de milho podem ser observados na Figura 1.

Em relação à questão de patógeno colonizar ou não o sistema vascular vegetal, embora alguns trabalhos afirmem não haver evidências de que *C. graminicola* provoque infecção sistêmica em plantas de milho (Venard e Vaillancourt, 2007b; a), outras pesquisas afirmam o contrário. Bergstrom e Nicholson (1999) relatam que, em plantas maduras, uma vez que os vasos do xilema são invadidos, o fungo cresce sistematicamente no colmo, havendo colonização sistêmica, que pode ser assintomática até o começo da doença. Sukno *et al.*, (2008) mostram que após uma colonização bem sucedida da raiz, *C. graminicola* pode entrar no sistema vascular e se espalhar sistematicamente para as partes aéreas da planta sem causar sintomas de doença. Dependendo, em parte, do tecido no qual a infecção começa, o sucesso da infecção é determinado, podendo imediatamente se tornar sintomático ou permanecer assintomático, sendo que a natureza da interação entre a planta e o fungo deve ser resultado do balanço entre as condições ambientais e fisiológicas.

Se por um lado o patógeno desafia a planta, por outro lado, a planta possui meios de se defender desse ataque. Nesse sentido, durante seu ciclo celular, as plantas necessitam reagir a várias ameaças provenientes do ambiente externo. Como as plantas são sésseis, elas desenvolveram uma ampla gama de estratégias, chamadas coletivamente

de “defesas” ou respostas ao “estresse”, a fim de se proteger contra estresses bióticos e abióticos. Infecções por bactérias, fungos e vírus patogênicos estão entre algumas das mais sérias ameaças com as quais as plantas precisam lidar (Wojtaszek, 1997). Não importando o resultado final de uma interação entre planta e microrganismo, ou seja, quer seja uma relação vantajosa, desvantajosa ou neutra, as células vegetais exibem um conjunto de respostas dinâmicas celulares similares durante os três tipos de contato (Lipka e Panstruga, 2005).

Figura 1 Processo infeccioso de *C. graminicola* e sintomas da doença na folha de milho. SP, esporo; AP, apressório; PH, hifa primária biotrófica; SH, hifa secundária necrotrófica.



Fonte: O'connell *et al.* (2012).

As interações entre as plantas e seus patógenos envolvem uma comunicação “de mão dupla”. Não apenas a planta deve ser capaz de reconhecer e se defender de um potencial patógeno que está em sua superfície, mas o patógeno deve também estar apto para manipular a biologia da planta e criar um ambiente favorável para seu crescimento e reprodução. Em vista disso, plantas e patógenos desenvolveram um conjunto de genes que possibilitam essa comunicação (Boyd *et al.*, 2013).

Uma diferença chave entre uma planta suscetível e uma planta resistente é o reconhecimento do patógeno invasor e a rápida e efetiva ativação de mecanismos de defesa. Uma planta resistente é capaz de rapidamente estabelecer uma ampla variedade de respostas de defesa que previnem sua colonização pelo patógeno. Em contraste, uma planta suscetível apresenta respostas de defesa mais fracas e lentas que falham em restringir o crescimento e a colonização do patógeno. Como

resultado, uma planta suscetível é geralmente severamente danificada ou mesmo morta em função da invasão do patógeno (Yang *et al.*, 1997).

Os patógenos possuem uma gama limitada de plantas nas quais eles causam doença. Apenas algumas plantas de gêneros em particular são hospedeiras para um patógeno particular. Assim, todas as outras plantas são, por definição, plantas não hospedeiras e os micróbios que estão atacando são ditos patógenos heterólogos. Neste caso, a interação poderia ser chamada de heteróloga ou incompatibilidade básica. A resistência não hospedeira é altamente efetiva e durável (Gabriel e Rolfe, 1990; Thordal-Christensen, 2003; Nurnberger e Lipka, 2005).

Na natureza, então, as plantas são geralmente resistentes à maioria dos patógenos, pois a habilidade de um patógeno causar doença num hospedeiro é usualmente exceção e não regra, nesse sentido, plantas possuem uma habilidade inata de reconhecer potenciais patógenos invasores e se defender eficientemente (Staskawicz, 2001). Uma importante forma de defesa, a resposta hipersensitiva (RH), consiste na rápida e programada morte celular das células vegetais após contato com o patógeno. Essa resposta ocorre quando o patógeno entra em contato com uma planta não hospedeira e por consequência o crescimento do patógeno é interrompido (Collmer, 1998).

Por outro lado, patógenos bem sucedidos causam doença uma vez que estão aptos a escapar do reconhecimento e/ou suprimir os mecanismos de defesa do hospedeiro (Staskawicz, 2001). Quando a resistência de uma planta a uma doença é específica àquele cultivar ou acesso ela é referida como resistência hospedeira (Mysore e Ryu, 2004). A patogênese em plantas hospedeiras envolve multiplicação do microrganismo, seu espalhamento pelos tecidos vegetais e eventual produção de sintomas macroscópicos característicos da doença (Collmer, 1998).

Para ser patogênica, a maioria dos microrganismos deve acessar o interior vegetal, seja penetrando a superfície da folha ou da raiz diretamente ou entrando por ferimentos ou aberturas naturais da folha utilizadas para trocas gasosas, como estômatos ou poros (Chisholm *et al.*, 2006). Além da defesa vegetal exercida por barreiras físicas e químicas pré-formadas, as quais têm por função evitar a entrada do patógeno (Yang *et al.*, 1997; Bent e Mackey, 2007), como camadas de cera e rígidas paredes celulares, enzimas antimicrobianas ou metabólitos secundários, as plantas possuem dois principais tipos de resistência, a defesa basal e a defesa mediada pelo gene R. A defesa basal, que pode ser constituinte tanto da defesa hospedeira quanto da não hospedeira, provê a primeira linha de defesa à infecção causada por uma ampla

gama de agentes patogênicos. Os elicitores da defesa basal podem ser componentes derivados da parede celular vegetal liberados pela atividade hidrolítica de enzimas secretadas por patógenos invasores, ou também características comuns dos patógenos, referidas como padrões moleculares associados aos patógenos ou micróbios (MAMPS ou PAMPS, do inglês *microbial/pathogen-associated molecular patterns*), tais como lipopolissacarídeos, polissacarídeos beta-glucanos, quitinas e flagelinas (Nurnberger *et al.*, 2004; Zipfel, 2008; Gururani *et al.*, 2012).

Estruturas que são características marcantes dos fungos, como proteínas glicosiladas específicas e os componentes da parede celular quitina e beta-glucanos, agem como MAMPs em plantas (Zipfel e Felix, 2005). No vegetal, os receptores de padrão de reconhecimento (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) realizarão o reconhecimento dos MAMPs (Jones e Dangl, 2006). Uma vez que o microrganismo tenha conseguido penetrar a parede celular, a membrana plasmática vegetal é exposta ao invasor, onde se localizam os receptores extracelulares de superfície, PRRs (Chisholm *et al.*, 2006).

Respostas de defesas induzidas por MAMPs incluem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), também chamado de *burst* oxidativo, produção de espécies reativas de nitrogênio (NOS), como óxido nítrico (NO), alterações na parede celular vegetal, indução de compostos antimicrobianos e a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR, *pathogenesis-related*). ROS e NOS podem agir na sinalização e possuem efeitos antimicrobianos diretos. As ROS também podem conduzir ligações cruzadas oxidativas na parede celular vegetal para fortalecê-la da degradação, o que deve restringir o espalhamento do patógeno. As proteínas PR compreendem uma família que incluem enzimas, como a B-(1-3) glucanase e a quitinase, as quais podem atacar diretamente as estruturas do patógeno, peptídeos antimicrobianos e pequenas proteínas (Newman *et al.*, 2013).

No entanto, certos microrganismos se tornam patógenos adaptados a certas espécies de plantas desenvolvendo proteínas efetoras que ativamente suprimem parte da resposta de defesa nesses hospedeiros (Bent e Mackey, 2007; Gururani *et al.*, 2012). Os efetores produzidos pelos fitopatógenos, codificados por genes de avirulência (Avr), são liberados diretamente dentro da célula vegetal durante o estágio inicial de infecção. Tais efetores podem tanto mudar o estado fisiológico da planta hospedeira no intuito de beneficiar a colonização do patógeno, quanto serem usados para interromper a ativação das defesas vegetais (Gururani *et al.*, 2012).

Em resposta ao desenvolvimento dos efetores pelo patógeno, ocorre, na planta, a evolução de uma imunidade baseada na percepção de tais efetores microbianos. Essa imunidade utiliza-se dos produtos dos genes R específicos, os quais detectam os efetores do patógeno e ativam a segunda forma de defesa hospedeira, a resposta mediada pelo gene R, que confere eficiente defesa ao vegetal (Gururani *et al.*, 2012).

O modelo gene-a-gene propõe que para a resistência ocorrer, pares complementares de genes dominantes, um no hospedeiro e um no patógeno, são requeridos. Nesse tipo de interação, a expressão de resistência ou suscetibilidade do hospedeiro a um patógeno particular é condicional ao genótipo do patógeno e o grau de virulência do patógeno é dependente do genótipo hospedeiro. Assim, pares de genes especificamente complementares determinam o resultado de uma interação particular genótipo-genótipo. Compatibilidade (desenvolvimento e reprodução extensivos do patógeno na ausência de uma resposta hospedeira efetiva) é o resultado de uma combinação patógeno-hospedeiro, a não ser que um alelo para resistência num *locus* particular do hospedeiro seja especificamente complementar a um alelo de virulência de um *locus* particular do patógeno. Ou seja, a perda ou alteração do gene R de resistência da planta ou do gene de avirulência (*avr*) do patógeno, leva à doença, representada pela compatibilidade. Por outro lado, a incompatibilidade é representada pelo desenvolvimento e reprodução reduzidos do patógeno e está associada com resposta de defesa efetiva do hospedeiro (Crute e Pink, 1996; Hammond-Kosack e Parker, 2003). Uma representação esquemática de uma relação gene-a-gene incompatível pode ser visualizada na Figura 2.

A resistência mediada pelo gene R geralmente está associada à resposta hipersensitiva (RH), assim, a RH está condicionada pela presença do gene *avr* no patógeno, cujo produto será reconhecido direta ou indiretamente pelo gene R correspondente do vegetal (Morel e Dangl, 1997). A rápida ativação de respostas de defesas localizadas no local de infecção do patógeno, as quais estão normalmente ligadas à RH, consistem no mais efetivo e prevalente mecanismo utilizado por plantas a fim de minimizar o ataque do patógeno (Gururani *et al.*, 2012).

A RH é geralmente reconhecida pela presença de células mortas de coloração marrom no local de infecção e, dependendo do patógeno, o número dessas células pode variar de uma a várias. A RH pode ser restrita às células fisicamente invadidas e possuir contato direto com o patógeno. Uma lesão de cor marrom deve se tornar visível se um número suficiente de células morrerem. Esse tipo de resposta possui alto índice de complexidade. Para patógeno necrotróficos e hemibiotróficos,

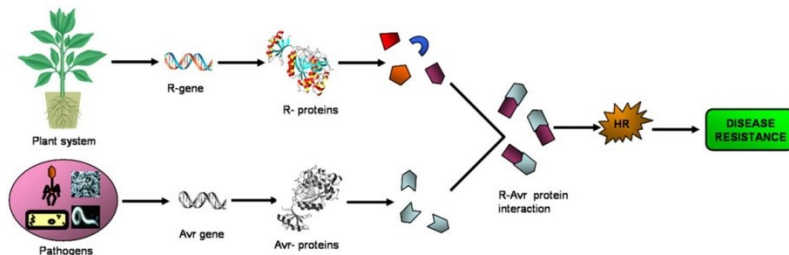
para os quais não têm importância o fato de as células hospedeiras estarem vivas ou não, a morte celular por si só não pode restringir o crescimento do patógeno. Esse papel é atribuído às muitas respostas de defesas induzidas que tipicamente ocorrem nas células mortas e nas células adjacentes que permanecem vivas. Portanto, a RH engloba tanto morte celular quanto expressão de “genes de defesa”. Além disso, é importante notar que resistência à doença e todas as respostas de defesa induzidas associadas à RH, podem ocorrer em plantas na ausência de morte celular. Ainda, patógenos podem também causar morte celular e desencadear respostas de defesa enquanto crescem de forma bem sucedida em tecidos suscetíveis. A RH é o resultado de múltiplas rotas de sinalização, ocorrendo, por exemplo, fluxos de íons e geração de ROS, porém o papel dessas últimas na indução da RH difere nas várias combinações planta-patógeno. A morte celular que acontece na RH age mais como um sinal ao resto da planta do que como um mecanismo de defesa direto (Heath, 2000).

O *burst* oxidativo, uma rápida e transitória produção apoplástica de ROS, via consumo de oxigênio, consiste em uma das primeiras respostas celulares vegetais após um reconhecimento bem sucedido de um patógeno. Duas são as fases dessa produção. A primeira, inespecífica e transitória, geralmente ocorre minutos após a interação com o patógeno. A segunda etapa ocorre horas após o ataque do patógeno e está geralmente associada com o estabelecimento de defesas e RH. Embora o ânion superóxido seja o primeiro produto formado, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie mais estável, geralmente é detectado em muitos estudos. Entretanto, outras ROS, como oxigênio singlete e radical hidroxil podem ser produzidos. A produção de ROS é detectada invariavelmente durante a defesa vegetal efetuada por MAMPS ou por efetores. Embora a formação de ROS em resposta ao ataque de patógenos ocorra no apoplasto, ROS produzidas em outros compartimentos celulares também devem ter funções na defesa vegetal (Grant e Loake, 2000; Foyer e Noctor, 2005; De Vleeschauwer *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006; Torres, 2010).

Múltiplas são as funções das ROS produzidas em resposta a patógenos (Figura 3). Por exemplo, tais moléculas podem diretamente matar o patógeno, especialmente quando há envolvimento de espécies mais reativas, como o radical hidroxil. As ROS também podem contribuir para o estabelecimento de barreiras físicas, como a formação de grandes papilas no local de infecção. O peróxido de hidrogênio, por exemplo, possui papel na lignificação peroxidase-dependente e na ligação cruzada (*cross-link*) de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina na

parede celular vegetal, processos que acarretam o endurecimento da parede celular, o que contribui para a defesa da planta. Além disso, as ROS possuem papel na sinalização celular realizando a mediação da ativação de genes de defesa, por controle redox de fatores de transcrição ou por interação com outros componentes, como cascatas de fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs, *mitogen-activated protein kinase*). Tais moléculas podem também gerar derivados lipídicos que podem causar danos na membrana celular, realizar a mediação da geração de fitoalexinas e metabólitos secundários que impedem o crescimento do patógeno, além de estarem associadas à RH (Bradley *et al.*, 1992; Chen e Schopfer, 1999; Kovtun *et al.*, 2000; Thoma *et al.*, 2003; Montillet *et al.*, 2005; De Vleeschauwer *et al.*, 2006; Huckelhoven, 2007; Torres, 2010).

Figura 2 Interação planta-patógeno e desenvolvimento de resistência à doença.



Fonte: Gururani *et al.* (2012)

Meios de detoxificação celular de ROS incluem superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona peroxidase (GPX), catalase (CAT), ascorbato, glutatona, tocoferol, flavonoides, alcaloides e carotenoides (Apel e Hirt, 2004). Sistemas de detoxificação de ROS possuem importante papel no manejo das ROS geradas em resposta a patógenos. A compartimentalização da produção de ROS e ativação dos sistemas de detoxificação podem contribuir para ajustes mínimos dos níveis de ROS e suas propriedades de sinalização (Torres *et al.*, 2006).

No que se refere à produção de ROS por organismos não patogênicos, por exemplo, durante simbiose entre plantas de alfafa e a bactéria simbiote *Sinorhizobium meliloti*, ocorre produção de superóxido e H_2O_2 nos nódulos da planta após infecção com a bactéria (Santos *et al.*, 2001). Isso comprova que existem muitas similaridades entre as respostas iniciais à infecção por organismos patogênicos e simbiotes. Essa produção de ROS condiz com a ideia de que bactérias

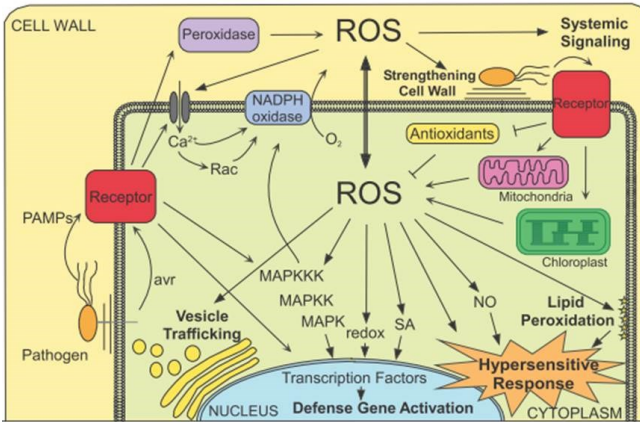
simbiontes são inicialmente percebidas como invasoras pela planta hospedeira e que tais organismos desenvolveram mecanismos para contra-atacar as respostas de defesa vegetais (Torres, 2010).

Tópicos importantes das defesas vegetais já mencionados são apresentados na Figura 4. Na primeira fase, os PAMPs são reconhecidos pelos PRRs, resultando em imunidade desencadeada por PAMPs (PTI, *PAMP-triggered immunity*), que pode impedir a colonização do hospedeiro. Na fase 2, patógenos bem sucedidos passam a utilizar efetores que contribuem para a sua virulência, passando a ocorrer a doença e resultando em suscetibilidade desencadeada pelo efector (ETS, *effector-triggered susceptibility*). Na fase 3, o efector passa a ser especificamente reconhecido por uma proteína R, resultando em imunidade desencadeada pelo efector (ETI, *effector-triggered immunity*). Esse reconhecimento pode ser indireto ou direto através do reconhecimento da proteína R com o efector. Uma resposta ETI é uma PTI amplificada e acelerada, resultando em resistência à doença e geralmente em RH no local de infecção. Na fase 4, a seleção natural determina que patógenos passem a evitar a ETI, por exemplo, adquirindo novos efetores. A seleção natural também resulta em novas especificidades das proteínas R, e como resultado, ETI pode ser desencadeada novamente (Jones e Dangl, 2006). Apesar de os mecanismos de percepção dos patógenos serem distintos, PTI e ETI devem usar mecanismos similares para evitar o crescimento do patógeno (Chisholm *et al.*, 2006).

A evolução da resposta imune vegetal é constante, tanto para as moléculas participantes da resposta desencadeada por MAMPs quanto para as atuantes na defesa desencadeada por efetores (Chisholm *et al.*, 2006). Nesse sentido, por exemplo, os MAMPs estão constantemente sofrendo pressão de seleção em patógenos adaptados na tentativa de evitar seu reconhecimento em plantas hospedeiras, apesar de serem muito conservados devido a sua extrema necessidade para a vida microbiana (Newman *et al.*, 2013). Um caso de um MAMP que não é reconhecido por plantas de diferentes famílias, não desencadeando então resposta imune inata, é o do lipopolissacarídeo (LPS) da bactéria fixadora de nitrogênio *Bradyrhizobium sp.* BTAi1, cuja estrutura é única na natureza. Em pesquisa utilizando a molécula de LPS, foi testada a sua habilidade de ativar o sistema imune (pela elicitação do *burst* oxidativo), em plantas de *Aeschynomene indica*, hospedeiro natural da bactéria, *Lotus japonicus* e *Arabidopsis*. Não houve resposta de defesa em nenhuma das plantas. Os autores defendem a ideia de que a bactéria simbiote desenvolveu seu LPS inédito a fim de evitar o

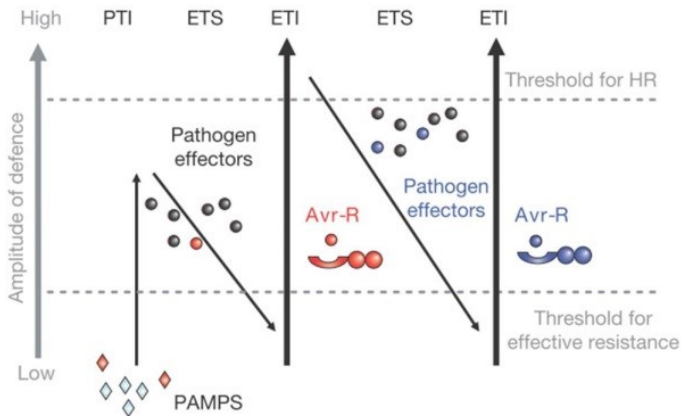
reconhecimento pelo seu hospedeiro simbiote, que seria prejudicial ao microorganismo (Silipo *et al.*, 2011).

Figura 3 Funções das ROS produzidas em resposta a patógenos. O reconhecimento do patógeno leva à produção de ROS, as quais possuem diferentes funções relacionadas às defesas vegetais. Setas finas representam eventos de sinalização que apontam para a produção de ROS, no apoplasto e no interior celular. Setas com duas pontas indicam o *crosstalk* entre as ROS nesses compartimentos. As setas mais espessas apontam para as funções das ROS com relação à ativação das respostas de defesa.



Fonte: Torres (2010)

Figura 4 Modelo representando o sistema imune vegetal.



Fonte: Jones e Dangl (2006)

Questiona-se quando e como as plantas usam diferentes rotas de sinalização para reconhecer e distinguir entre bactérias patogênicas e benéficas e especula-se que durante os contatos iniciais com o vegetal, mecanismos similares a MAMPs são ativados e as bactérias benéficas são reconhecidas primeiramente como potenciais patógenos, ativando rotas de defesas vegetais. Paralelamente alguns receptores vegetais, que reconhecem especificamente sinais de bactérias benéficas, desencadeariam mecanismos que suprimem algumas respostas de defesa e permitiriam a colonização da planta pela bactéria (Carvalho *et al.*, 2016).

2.7 Bactérias que Atuam no Controle de Doenças e seus Benefícios

O crescimento e/ou a atividade de microrganismos patogênicos habitantes do solo, incluindo fungos, podem ser inibidos por microrganismos rizosféricos benéficos. Microrganismos que exercem controle biológico podem afetar adversamente a densidade populacional, dinâmica temporal e espacial, bem como atividades metabólicas de patógenos comuns do solo principalmente via interações por competição e antagonismo. Os vegetais também são capazes de recrutar microrganismos protetores e aumentar sua capacidade de ação a fim de suprimir os patógenos habitantes da rizosfera (Raaijmakers *et al.*, 2009; Berendsen *et al.*, 2012).

Pode-se dizer que um dos efeitos indiretos da promoção de crescimento vegetal exercido pelas BPCV consiste justamente na supressão de patógenos. Algumas formas de controle de doenças exercidas por BPCV baseiam-se no antagonismo, na competição por ferro e na indução de resistência sistêmica. O antagonismo é geralmente mediado pela produção de metabólitos secundários antimicrobianos, enzimas líticas (como quitinases e glucanases), efetores, antibióticos e toxinas, ou ainda por competição por nutrientes, minerais e espaço. A competição por ferro ocorre através da secreção de sideróforos, os quais impedem que os patógenos habitantes da rizosfera se proliferem devido à falta de ferro. Por fim, muitos microrganismos rizosféricos são capazes de induzir respostas sistêmicas na planta, resultando na ativação de mecanismos de defesa vegetal (Glick e Bashan, 1997; Pieterse *et al.*, 2003; Compant *et al.*, 2005; Raaijmakers *et al.*, 2009; Berendsen *et al.*, 2012; Perez-Montano *et al.*, 2014). Cabe ressaltar, porém, que um efetivo agente de controle biológico geralmente utiliza uma combinação de mais de uma forma de ação para controlar um patógeno, e não apenas

adota um único mecanismo de supressão isoladamente (Alabouvette *et al.*, 1993).

Assim, cepas selecionadas de bactérias benéficas habitantes do solo podem proteger as plantas contra estresse abiótico e colocar em ação o sistema imune vegetal contra ampla gama de patógenos por meio da Resistência Sistêmica Induzida (ISR, do inglês *induced systemic resistance*) (Zamioudis *et al.*, 2013), mecanismo de atuação muito comum exercido por BPCV contra os mais diversos patógenos. Resistência induzida é um estado de aumento na capacidade defensiva de uma planta quando apropriadamente estimulada (Van Loon *et al.*, 1998). Enquanto a resistência sistêmica adquirida (SAR, do inglês *Systemic Acquired Resistance*) é a resposta elicitada quando a planta entra em contato com um patógeno necrosante, a ISR ocorre após o contato do vegetal com uma bactéria benéfica (Bakker *et al.*, 2007; Mitter *et al.*, 2013). Muitas vezes, porém, ocorre uma ação aditiva entre os dois sistemas (ISR e SAR) contra um patógeno, o que indica que as rotas ISR (dependente de jasmonato e etileno) e SAR (dependente de ácido salicílico) podem agir em conjunto, o que pode ajudar a proteger uma determinada planta contra patógenos. Essa sobreposição possui um potencial mais amplo de utilização para as práticas agrícolas (Van Wees *et al.*, 2000; Pieterse *et al.*, 2003). Nesse sentido, foi demonstrado que *Bacillus cereus* ativa rotas de sinalização de ácido salicílico, jasmonato e etileno, desencadeando ISR/SAR e protegendo efetivamente plantas de *Arabidopsis thaliana* contra infecção por *Pseudomonas syringae* pv. tomato, (Niu *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2016). Plantas de pimenta também apresentaram características típicas de SAR em resposta a BPCV (nesse caso produção de proteínas PR) em resposta a *Stemphylium lycopersici* (Son *et al.*, 2014). Outro estudo também apontou para o envolvimento do ácido salicílico na indução de defesas provocadas pela BPCV *Bacillus vallismortis* em pimenta desafiada por patógenos (Park *et al.*, 2013). Porém, na maioria das vezes, a indução de resistência sistêmica elicitada por BPCV é apenas dependente das rotas de sinalização jasmonato/etileno e independente da via do ácido salicílico (Niu *et al.*, 2011).

Geralmente a resistência induzida é sistêmica, uma vez que, a capacidade defensiva é aumentada não apenas nas partes primariamente infectadas das plantas, mas também em outros tecidos não infectados e espacialmente separados. As bactérias *Pseudomonas* spp. podem agir como antagonistas de patógenos que vivem no solo (Van Loon *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2007). Experimentos com a inoculação de *Pseudomonas* spp. na rizosfera de plantas distintas demonstraram que,

apesar de a bactéria permanecer espacialmente separada do patógeno (inoculado nas partes superiores da planta), ela foi capaz de elicitar as defesas vegetais por ISR contra agentes patogênicos distintos (Gang *et al.*, 1991; Vanpeer *et al.*, 1991; Elbadry *et al.*, 2006). Porém, não apenas as bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de elicitar ISR, mas um grande número de microrganismos não patogênicos e agentes de controle microbianos é capaz de provocar tal fenômeno em plantas (Bakker *et al.*, 2007). Em estudo envolvendo a bactéria fixadora de nitrogênio *Gluconacetobacter diazotrophicus* e a bactéria patogênica *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar, foi sugerido que a bactéria endofítica ativa as respostas de defesa na cana-de-açúcar, resultando em resistência sistêmica contra a bactéria patogênica (Arencibia *et al.*, 2006).

Em avaliação do efeito de diferentes cepas dos endofíticos *Herbaspirillum* e *Burkholderia* no estabelecimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em plântulas de banana, foi demonstrado que tais bactérias possuem potencial de inibir a propagação do fungo, sendo sugerido que esses endofíticos podem ser utilizados como agentes de controle biológico (Weber *et al.*, 2007). Também foi demonstrado que a colonização de plantas de arroz por *Azospirillum* sp. B510 induziu resistência contra doenças causadas pelos microrganismos patogênicos *Magnaporthe oryzae* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, que causam respectivamente brusone e mancha foliar bacteriana em arroz (Yasuda *et al.*, 2009). Tortora *et al.*, (2011; 2012), demonstraram que *Azospirillum brasilense* é capaz de produzir sideróforos que atuam na proteção de plantas de morango desafiadas por *C. acutatum*. Vale lembrar que *H. seropedicae* também produz sideróforos, denominados serobactinas (Rosconi *et al.*, 2013) e que esses compostos são importantes para aumentar o desempenho competitivo dessa BPCV quando em associação com a planta hospedeira (Rosconi *et al.*, 2016), sendo esse tipo de composto importante para a defesa de plantas, seja por competição direta por ferro, seja pela indução de resistência sistêmica (Loaces *et al.*, 2011; Perez-Montano *et al.*, 2014).

Outras evidências apontam para a modulação de resposta de defesa vegetal durante a colonização de plantas por bactérias diazotróficas endofíticas. Por exemplo, no estabelecimento da associação entre *H. seropedicae* e raízes de arroz, a bactéria influenciou na diminuição da expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à defesa e ao estresse nas plantas (Brusamarello-Santos *et al.*, 2012). Da mesma forma, resultados de estudos de análise proteômica apontam para a modulação exercida por *H. seropedicae* na

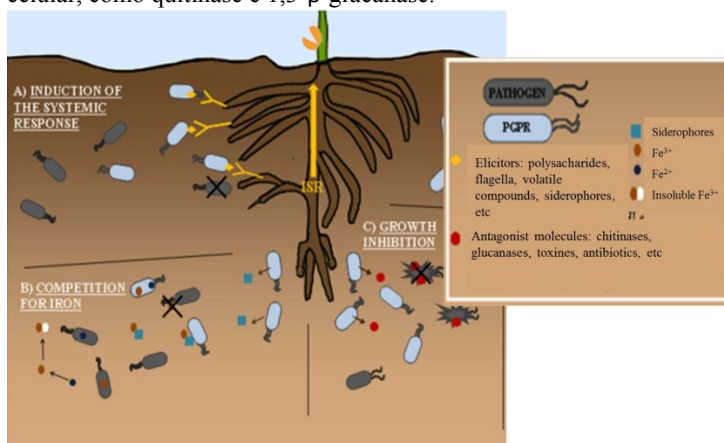
resposta imune vegetal. Nesse caso, foi demonstrado que em presença de extrato de cana-de-açúcar, não foi observada a presença da proteína GlmU (UDP-N acetilglucosamina pirofosforilase), a qual catalisa a síntese do precursor de lipopolissacarídeos e peptidoglicanos. Além disso, na presença do extrato de cana-de-açúcar, a proteína EF-TU (fator de alongação de translocação) foi regulada positivamente, enquanto a FliC (pr We would like to express our gratitude to Emanuel Maltempi de Souza, who kindly provided *H. seropedicae* strain SmR1.oteína flagelina), teve regulação negativa. Tanto os lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, quanto as proteínas EF-TU e FliC, são MAMPs, portanto, atuam como elicitores do sistema imune inato vegetal (Cordeiro *et al.*, 2013). Em outra pesquisa, utilizando como modelo o sistema de interação entre *H. seropedicae* e plantas de milho, foi verificado que, quatro dias após a inoculação, a presença da bactéria foi capaz de modular a expressão de um gene NADPH oxidase (*ZmrbhC*), que está envolvido na resistência sistêmica da planta, consistindo assim, num sinal inicial da resposta de defesa à colonização bacteriana (Amaral *et al.*, 2014).

Até agora foram apresentados efeitos positivos das BPCV apenas para as plantas as quais essas bactérias se associam. Porém, ainda não foram mencionados os benefícios acarretados ao meio ambiente quando se tem a oportunidade de fazer uso de uma BPCV no controle de uma doença, ao invés de se utilizar fertilizantes e pesticidas químicos. Dessa forma, a utilização de BPCV como agentes biocontroladores consiste num eficiente meio de reduzir o uso de fertilizantes químicos e pesticidas, o que contribui para a prática de uma agricultura mais sustentável (Bloemberg e Lugtenberg, 2001; Babalola, 2010; Perez-Montano *et al.*, 2014; Vejan *et al.*, 2016).

A figura 5 apresenta algumas formas de antagonismo a fitopatógenos na rizosfera de uma planta, mostrando a indução de resposta sistêmica, competição por ferro e atividades antagonísticas exercidas por BPCV (Perez-Montano *et al.*, 2014).

Considerando as evidências de que organismos benéficos podem contribuir para o controle de doenças, torna-se relevante a investigação da influência da bactéria benéfica associativa *H. seropedicae* no sistema formado entre o milho e o fungo patogênico *C. graminicola*.

Figura 5 Algumas formas de antagonismo por BPVC contra fitopatógenos. (A) ISR – desencadeada por moléculas elicitoras das BPCV. Esta resposta é dependente da rota de sinalização do etileno e ácido jasmônico na planta e reduz a doença através da modulação de propriedades físicas e químicas nas plantas hospedeiras; (B) Competição por ferro – em ambientes aeróbicos, Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} , formando compostos insolúveis, tornando-o indisponível para os microrganismos. BPCV produzem sideróforos que formam complexos com Fe^{3+} , prevenindo sua insolubilização. Na membrana da BPCV, esse íon é reduzido a Fe^{2+} e liberado para dentro da célula. Assim, faltará Fe^{2+} para os patógenos; (C) Inibição do crescimento – mecanismos responsáveis por atividade antagonística incluem inibição do patógeno por antibióticos, toxinas, biosurfactantes e produção extracelular de enzimas que degradam parede celular, como quitinase e 1,3- β -glucanase.



Fonte: Pérez-Montaño *et al.*, 2014

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a interação entre o milho e a bactéria benéfica associativa *H. seropedicae* SmR1 em duas condições de cultivo, em relação a detecção e quantificação de transcritos da bactéria na planta; e entre o milho, *H. seropedicae* e o fungo patogênico *C. graminicola* na presença ou ausência de substâncias húmicas, em relação à expressão dos sintomas da antracnose na planta.

3.2 Objetivos Específicos

Verificar a presença da bactéria *H. seropedicae* em plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* SmR1 cultivadas *in vitro* e em solo por meio da quantificação do DNA bacteriano por qPCR.

Verificar a atividade da bactéria *H. seropedicae* em plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* SmR1 cultivadas *in vitro* e em solo por meio da quantificação dos transcritos bacterianos *nifH*, *rpoC* e *hrcN* por RT-qPCR.

Avaliar os efeitos da inoculação de *H. seropedicae* na severidade da antracnose do milho causada pelo fungo patogênico *C. graminicola*.

Avaliar os efeitos da inoculação de *H. seropedicae* associada a substâncias húmicas na severidade da antracnose do milho causada pelo fungo patogênico *C. graminicola*.

4 CAPÍTULO I

Tools to evaluate *Herbaspirillum seropedicae* abundance and *nifH*, *rpoC* and *hrcN* expression in inoculated maize seedlings grown *in vitro* and in soil

Pâmela Dall'Asta, Tomás Pellizzaro Pereira, Fernanda Plucani do Amaral, Ana Carolina Maisonnave Arisi*

Abstract

The plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* is an important model to study biological nitrogen fixation and it is proposed as crop inoculants for grasses. Monitoring bacterial presence and its gene expression is important because the success of inoculation depends on the quantity of bacteria by the time of inoculation. In this study we developed new tools to evaluate the abundance of *H. seropedicae* SmR1 and its expression *in planta* and investigated the association of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* with maize grown in sterile and nonsterile conditions. Maize seedlings (P30F53) were inoculated with *H. seropedicae* SmR1 and grown *in vitro* and in soil. Quantitative PCR was used to quantify *H. seropedicae* DNA and to measure *nifH*, *rpoC* and *hrcN* levels of bacterial transcripts. *In vitro* assay inoculated plants presented highest amount of DNA and transcript contents, not detected in control plants. Both *nifH* and *rpoC* gene expression were detected in roots of inoculated maize cultivated in both growth conditions. However, it was not possible to detect *hrcN* gene expression in maize roots cultivated in soil. TaqMan assay is species-specific for *H. seropedicae* DNA, and *nifH* and *rpoC* transcript levels could be used to monitor *H. seropedicae* gene expression *in planta* in sterile and nonsterile growth conditions. We developed specific, reliable, and efficient tools to monitor *H. seropedicae* DNA abundance and *H. seropedicae* *nifH* and *rpoC* expression *in planta*.

Keywords: *Herbaspirillum seropedicae*; plant-bacteria interaction; maize; qPCR, RT-qPCR; diazotroph; plant-growth promoting bacteria.

Introduction

Diazotrophic bacteria are able to fix atmospheric nitrogen by biological nitrogen fixation (BNF) (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Some diazotrophs live in close association with plants and have the capacity to transfer the fixed nitrogen to the host (Chubatsu *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014). Furthermore, they can be used to improve crop yield and quality (Berg, 2009; Chebotar *et al.*, 2015). Future biotechnological applications, such as an alternative for chemical fertilizers (Babalola, 2010), increasing crop production or even conserving biodiversity (Germida *et al.*, 1998; Stets *et al.*, 2013), are processes that can be driven based on the advance of plant-diazotrophic bacteria association's knowledge. Plant response to inoculation depends on the plant genotype and the plant growth bacterial inoculant (Alves *et al.*, 2015; Amaral *et al.*, 2016). During plant-beneficial bacteria interaction, microorganisms modulate plant molecular responses (Berg, 2009; Brusamarello-Santos *et al.*, 2012; Vargas, L. *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 2014), and both partners are altered in response to interaction (Cordeiro *et al.*, 2013; Balsanelli *et al.*, 2015; Tadra-Sfeir *et al.*, 2015).

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic diazotrophic bacterium, which is able to colonize internal tissues of plants (Chubatsu *et al.*, 2012). It belongs to *Betaproteobacteria* class and colonizes mainly roots, stems and leaves of Poacea (Baldani *et al.*, 1986; Olivares *et al.*, 1996; James *et al.*, 1997). Assessing 21 strains of *Herbaspirillum* in two maize varieties, Alves *et al.* (2015) observed that *H. seropedicae* ZAE94 contributed to plant growth in greenhouse assay and its application as field inoculant increased maize yield up to 34% and could provide up to 37% of nitrogen plant demand by BNF. One of the best studied strain, *H. seropedicae* SmR1 (Monteiro *et al.*, 2012) has its complete genome sequenced (Pedrosa *et al.*, 2011).

Recent work using *Setaria viridis* co-inoculated with two nitrogen-fixing bacteria, *H. seropedicae* SmR1 and *Azospirillum brasilense* FP2 revealed that the plant could incorporate the fixed nitrogen by BNF in its proteins. Additionally, the nitrogen fixed by the bacteria directly affects overall plant metabolism (Pankievicz *et al.*, 2015).

BNF process is mediated by nitrogenase enzymatic complex (Rees e Howard, 2000), which is highly regulated at transcriptional and post-translational levels in *H. seropedicae* (Chubatsu *et al.*, 2012). Nitrogenase metalloenzyme is composed by two structural components

and the smaller one, Fe-protein, is encoded by *nifH* gene (Peters *et al.*, 1995; Machado *et al.*, 1996; Rees e Howard, 2000; Dixon e Kahn, 2004). *H. seropedicae nif* expression occur on and inside roots, leaves and stems of maize, rice, wheat and sorghum plants and *nif* gene expression in colonized plants suggests that infected tissues provide a suitable environment for BNF (Roncato-Maccari *et al.*, 2003).

The beginning of interaction of *H. seropedicae* and plant may involve type three secretion system (T3SS) (Monteiro *et al.*, 2012). In bacteria that interact with eukaryotic hosts, the T3SS is the most common structural apparatus used to translocate effector proteins into the host cytoplasm (He *et al.*, 2004). T3SS is one of the pathways by which some secreted proteins are exported across the inner and outer membranes in Gram-negative bacteria and its machinery is termed injectiosome. Therefore, injectiosome function is to deliver effectors across the bacteria and host membranes into the cytosol of host cells, where they may modulate a large variety of host cell functions, including immune and defense responses (Desvaux *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2009). In a previous study, *H. seropedicae* dinitrogenase reductase (*nif*) and T3SS ATP synthase were identified by peptide mass fingerprint among 18 differentially accumulated proteins on proteome of inoculated maize roots 7 days after inoculation (DAI) (Ferrari *et al.*, 2014).

DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (*rpoC*) is a constitutive gene that has been used as a reference gene for normalization in relative gene expression by RT-qPCR in *H. seropedicae* pure culture in the presence of sugarcane extract in the bacterial culture medium (Cordeiro *et al.*, 2013).

A major problem related to inoculants is the survival of inoculated bacteria in the rhizosphere and the effective plant colonization (Stets *et al.*, 2015). Regarding bacterial DNA presence *in planta*, quantitative PCR (qPCR) has been the method of choice to quantify plant growth promoting bacteria because it is fast and specific. PCR and qPCR have been used to identify *Azospirillum* isolates from rhizosphere and soil (Baudoin *et al.*, 2010; Shime-Hattori *et al.*, 2011) and to monitor *Azospirillum* colonization in wheat and maize (Couillerot *et al.*, 2010; Couillerot *et al.*, 2013; Stets *et al.*, 2015). qPCR assay was developed using SYBR Green and HERBAS1 species-specific primers to quantify *H. seropedicae* DNA in inoculated maize roots (Pereira *et al.*, 2014), however a hydrolysis probe assay present higher specificity comparing to a SYBR Green assay.

Herein we developed a hydrolysis probe qPCR tool to quantify *H. seropedicae* DNA *in planta* and RT-qPCR assays to measure *H. seropedicae* transcript levels in plant tissues to evaluate gene expression of a constitutive gene, DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (*rpoC*), and two regulated genes, related to injectiosome apparatus T3SS (*hrcN*) and nitrogen fixation (*nifH*). Our aim was to develop new tools to address the abundance of *H. seropedicae* SmR1 and its expression (*nifH*, *rpoC* and *hrcN*) *in planta* in order to monitor the effective plant colonization by this bacterium in two maize growth conditions.

Material and Methods

Bacterial Growth and Experimental Conditions

H. seropedicae strain SmR1, a spontaneous streptomycin resistant mutant of strain Z78 (ATCC 35893) (Baldani *et al.*, 1986), was routinely grown in an orbital shaker (120 rpm) at 30°C in 30 mL NFbHPN medium supplemented with 5 mg/L malic acid (Klassen *et al.*, 1997). The bacterial strains used for qPCR probe specificity assay were grown as previously described (Pereira *et al.*, 2014). The Optical Density (OD) of bacterial cell cultures was measured at 600 nm using Hitachi U2910 Spectrophotometer (Tokyo, Japan).

H. seropedicae SmR1 was inoculated in maize seedlings (Pioneer 30F53) cultivated in two distinct conditions: *in vitro* and in soil. Maize seeds were surface-sterilized in laminar flow by immersion in 70% ethanol for 5 min, followed by submersion in 2% sodium hypochlorite plus 2.5% Tween-20 solution for 30 min. Seeds were then rinsed 3 times with sterile distilled water, germinated on plates containing water-agar 0.8% (*in vitro*) or water moist filter paper (in soil) and stored at 25°C in a dark chamber for 3 days.

Three days old seedlings were inoculated with washed *H. seropedicae* SmR1 culture ($OD_{600} = 1$; 10^8 cells of *H. seropedicae* SmR1 mL^{-1}) after dilution to 10^5 cells mL^{-1} (*in vitro*) or 10^7 cells mL^{-1} (in soil) in sterile NFb malate medium without nitrogen source, for 30 min with constant agitation (80 rpm) (Balsanelli *et al.*, 2010).

For seedlings grown *in vitro*, control seedlings were mock-inoculated under the same conditions as described above. For cultivation, seedlings were washed in autoclaved 0.9 % saline buffer for 1 min and placed in the glass tubes containing plant medium solution. The seedlings were placed side-by-side in a controlled-environmental

chamber with 16h photoperiod, photosynthetic active radiation of $150 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 25°C light / 23°C dark and 40% humidity. The experiment was carried out in complete randomized blocks in three biological replicates. Plants were randomly collected 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI).

For seedling grown in soil, the mock inoculum was prepared in the same conditions as described, but using a bacterial culture boiled at 100°C for 15 min in water bath until complete inactivation of bacteria (Pankiewicz *et al.*, 2015). After inoculation, the seedlings were placed in 2 L pots containing 1.5 kg soil (Cerro Negro, Santa Catarina, Brazil, $27^{\circ} 47' 43''$ S, $50^{\circ} 52' 33''$ W) previously supplemented with 100 mL nutrient solution (Rodriguez-Salazar *et al.*, 2009) with reduced nitrogen (0.5 mM KNO_3). Plants were grown in greenhouse under natural light without temperature control (average temperature about 29°C), watered daily and every two days was added 100 mL of nutrient solution per pot. The experiment was carried out in completed randomized blocks in three biological replicates. Plants were randomly collected 14, 21 and 28 DAI. Plant tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

***H. seropedicae* DNA quantification**

Total DNA was isolated from maize tissue using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Each sample was a pool of three roots or leaves, obtained by manual crushing with mortar and pestle in the presence of liquid nitrogen. DNA extraction from bacterial cultures was performed using Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega™, Madison, WI, USA) with modifications (Pereira *et al.*, 2014). DNA concentration was estimated from measurements at 260 and 280 nm on a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer (Willmington, DE, USA).

H. seropedicae DNA quantification in maize plants grown *in vitro* and in soil was performed by qPCR using HERBAS1 species-specific primers and SYBR Green (Pereira *et al.*, 2014). Additionally, a TaqMan probe (HERBAS1) was designed using Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) (Table 1). The HERBAS1 probe specificity test was performed using bacterial DNA isolated from *H. seropedicae* SmR1, *Herbaspirillum hiltneri*, *Herbaspirillum huttiense*, *Herbaspirillum lusitanum*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum frisingense*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus cereus*,

Bacillus subtilis, *Escherichia coli*, *Rhizobium* sp., *Microbacterium* sp., and *Pseudomonas* sp.

Table 1 HERBAS1 forward (F) and reverse (R) primers and probe sequences used for *H. seropedicae* SmR1 detection and bacterial DNA quantification*.

Oligonucleotide	Sequence 5' - 3'	Reference
HERBAS1 F primer	TTTCGCGGTAGGCGATCA	Pereira <i>et al.</i> , 2014
HERBAS1 R primer	GAGCAATTGACCGCAAGAC	
HERBAS1 probe	VIC-CCAGTAGCCGTTTCGAG-MGB	This study

*Amplicon size is 76 bp.

The amplification reactions contained 12.5 μ L of 2X SYBR Green Master Mix or 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 100 nmol/L of HERBAS1 forward and reverse primers, 100 nmol/L HERBAS1 probe (TaqMan assay), water and 20 ng of template DNA in a final volume of 25 μ L. All control samples reactions were carried out in duplicate and the inoculated samples in triplicate following the cycling conditions: an initial incubation step at 50°C for 2 min, 95°C incubation for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 minute. For SYBR Green reactions, an additional dissociation curve with linear increase from 60 to 95°C was performed immediately after each run. All real-time PCR runs were analyzed using automatic software settings. The reactions were performed in ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

In order to quantify the genomic DNA amount in a pure culture of *H. seropedicae* SmR1, standard curves were prepared by serial dilution. Genomic DNA was 10-fold serially diluted in ultra-pure water to final concentrations ranging from 10^6 to 10^0 DNA copies, equivalent to concentrations of 6.03 ng to 6.03 fg. The number of genome copies was calculated based on *H. seropedicae* SmR1 genome size (5.51 Mbp) (Pedrosa *et al.*, 2011) as described previously (Pereira *et al.*, 2014). A standard curve was designed for each growth condition as well as plant tissue (roots and leaves) for both SYBR Green and TaqMan assays. The qPCR reactions were carried out separately, in triplicate. Amplification efficiency values were calculated from the equation $E = (10^{-1/S} - 1) \times$

100, where E is the efficiency (percent) and s is the slope obtained from the standard curve.

Bacterial Transcript Content Quantification

Total RNA was isolated from approximately 100 mg of a pool of three maize roots using TRI Reagent Protocol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). RNA samples were quantified by Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and treated with DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich) to eliminate DNA contamination. cDNA synthesis was obtained using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), with 2 μg of purified RNA and random primer.

For absolute quantification of bacterial transcripts in roots of maize plants grown *in vitro* and in soil, *H. seropedicae* SmR1 DNA was used as standard and three standard curves were performed using three distinct *H. seropedicae* SmR1 DNA extracts for each bacterial target gene *nifH*, *hrcN* and *rpoC* (Table 2), in triplicate. Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) software was used to design *nifH* and *hrcN* primers. Reactions for *in vitro* and in soil samples were performed in triplicate, with 40 ng of cDNA template. The RT-qPCR reactions were carried out in ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems), following the amplifications conditions as described above using 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) in a final volume of 20 μL .

Table 2 Primer sequences forward (F) and reverse (R) and concentrations used in RT-qPCR assays for absolute quantification of *H. seropedicae* gene expression.

Gene	Primer sequence	Concentration (nmol/L)	Fragment length(bp)	GenBank accession n°.	Reference
<i>Nitrogenase fixation (nifH)</i>	F TGGAGGATCTGGAGCTGGAA	500	61	U97121.1	This study
	R TCGACGCAACGGATGTTCT	500			
<i>Hypersensitive response conserved (hrcN)</i>	F GGCGAGCTGTGCAATCTGTT	300	100	CP002039.1/ 869767- 871149	This study
	R TCAGTGCCGAAAGGATGGA	300			
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta'(rpoC)</i>	F AAGCAAGTCCAGCAAAACGAA	500	75	CP002039.1/ 120045- 124286	Cordeiro <i>et al.</i> , 2013
	R CCACGAGCGGATCTTGTC	500			

In order to verify the interference of the maize DNA presence in amplification efficiency values, standard curves were constructed for each gene using cDNA from an inoculated maize root sample grown *in vitro*. The cDNA was 5-fold serially diluted in ultra-pure water, with concentrations ranging from 80 ng to 0.3125 ng of cDNA template, in duplicate and the amplification efficiencies were determined as mentioned above.

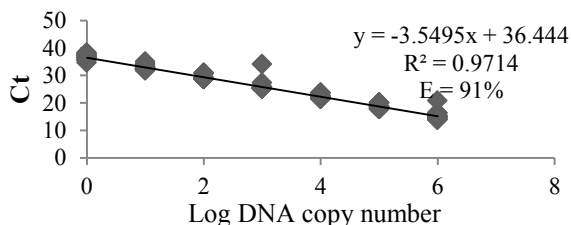
Results

qPCR parameters and probe specificity test

Standard curves were prepared for each experimental condition (*in vitro* and in soil) and plant tissue (maize roots and leaves), using SYBR Green or TaqMan reagents to obtain qPCR parameters such as efficiency, slope and correlation coefficient (R^2). SYBR Green assay (Table 3) showed efficiency values varying from 89 to 100%.

The qPCR parameters obtained through the standard curves using TaqMan probe (Table 4) showed efficiency values ranging from 84 and 99%. Using six *H. seropedicae* SmR1 DNA standard curves constructed for the TaqMan assay (six different runs), the general efficiency value obtained was 91% and slope value -3.55. The limit of detection (LOD) using TaqMan assay was established as 10^1 copies, which corresponds to mean Ct = 32.8 (Figure 6).

Figure 6 TaqMan HERBAS1 assay standard curves performed in six qPCR runs (six different days) using DNA extract from culture of *H. seropedicae* SmR1, in triplicate (n=18).



Probe specificity test was conducted for TaqMan assay, which was able to detect selectively *H. seropedicae* DNA (Table 5). Even though it was detected late Ct value for different bacteria species but

same genera (*H. hiltneri*, *H. huttiense*, *H. lusitanum*, *H. rubrisubalbicans* and *H. frisingense*), *H. seropedicae* presented early Ct value (10.21) related to the others (Ct > 32.30).

Quantification of *H. seropedicae* DNA in maize cultivated *in vitro* and in soil

Total DNA isolated from roots and leaves of maize plants (control and inoculated) grown in two conditions were used as template to qPCR in order to quantify *H. seropedicae* DNA. Considering plants grown *in vitro* (Table 6), inoculated samples presented around 10^9 *H. seropedicae* DNA copy number/g of fresh root tissue (4, 7 and 10 DAI) and ranged from 10^7 (4 DAI) to 10^9 (7 and 10 DAI) in leaf tissues using SYBR Green. *H. seropedicae* DNA contents determined by TaqMan assay were similar to SYBR Green results. As expected, bacterial DNA was not detected in control samples by both qPCR assays, either roots or leaves of seedlings grown *in vitro*.

Table 3 Parameters of SYBR Green qPCR standard curves for *H. seropedicae* quantification using HERBAS1 primers (100 nmol/L) and bacterial DNA serial dilution.

Experimental Condition		Efficiency (%)	Slope	R ²
<i>In vitro</i> ^a	Root	95	-3.44	0.998
	Leaf	92	-3.53	0.989
Soil ^a	Root	89	-3.61	0.999
	Leaf	100	-3.32	0.993

^aEach standard curve was used for the respective experimental condition.

Table 4 Parameters of TaqMan qPCR standard curves for *H. seropedicae* quantification using HERBAS1 primers (100 nmol/L), HERBAS1 probe (100 nmol/L) and bacterial DNA serial dilution.

Experimental Condition		Efficiency (%)	Slope	R ²
<i>In vitro</i> ^a	Root	84	-3.77	0.999
	Leaf	84	-3.79	0.999
Soil ^a	Root	99	-3.34	0.999
	Leaf	99	-3.35	0.989

^aEach standard curve was used for the respective experimental condition.

Considering plants grown in soil (Table 7), *H. seropedicae* DNA was detected using SYBR Green in 9 out of 9 inoculated root samples 14 DAI, 6 out of 9 samples 21 DAI and 3 out of 9 samples 28 DAI. On the other hand, *H. seropedicae* DNA was detected in only 2 out of 6 control root samples (14 and 21 DAI). *H. seropedicae* DNA was not detected in leaf samples. Similarly, few control root samples showed *H. seropedicae* DNA presence comparing to inoculated in TaqMan assay. *H. seropedicae* DNA was not detected in control leaf samples, while two inoculated leaf samples (14 DAI) showed positive values for DNA presence.

Table 5 Positive amplifications and Ct values generated by TaqMan qPCR specificity assay using primers HERBAS1, HERBAS1 Probe and template DNA extracted from *H. seropedicae* or other bacteria. All samples were analyzed at a final concentration of 6 ng DNA per reaction (n = 3).

Template DNA	Positive/total	Mean Ct
<i>H. seropedicae</i>	3/3	10.21
<i>H. hiltneri</i>	1/3	36.97
<i>H. huttiense</i>	3/3	35.64
<i>H. lusitanum</i>	1/3	36.49
<i>H. rubrisubalbicans</i>	3/3	32.68
<i>H. frisingense</i>	3/3	32.30
<i>A. brasilense</i>	0/3	-
<i>Burkholderia tropica</i>	0/3	-
<i>Bacillus cereus</i>	0/3	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0/3	-
<i>E.coli</i>	0/3	-
<i>Rhizobium</i> sp.	0/3	-
<i>Microbacterium</i> sp.	0/3	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	0/3	-

Transcript Quantification of *H. seropedicae* in maize cultivated in two conditions

In this study, the cDNA quantity of bacterial transcripts *nifH*, *hrcN* and *rpoC* in maize root samples were determined by RT-qPCR using serial dilutions of DNA from *H. seropedicae* SmR1 pure culture

as standard. Therefore, the standard curves were constructed by plotting $Ct \times \log$ DNA copy number to obtain efficiency and slope values (Figure 7).

The bacterial gene expression (*nifH*, *rpoC* and *hcrN*) was quantified in maize root samples grown *in vitro* (Figure 8) and in soil (Figure 9) by RT-qPCR. *In vitro*, gene expression for *nifH*, *rpoC* and *hcrN* was not observed on control roots, whereas on inoculated roots, these genes were expressed 4, 7 and 10 DAI, in different patterns (Figure 8). The *nifH* gene expression decreased from 4 to 10 DAI in inoculated samples. *rpoC* gene expression in inoculated samples slightly decreased from 4 to 10 DAI.

Concerning plants grown in soil (Figure 9), the cDNA bacterial quantification showed highest *nifH* bacterial gene expression in inoculated samples comparing to control. *rpoC* gene expression decreased in inoculated samples from 14 to 28 DAI. It was not possible to quantify *hcrN* gene in control or inoculated samples even 14, 21 or 28 DAI.

Table 6 Bacterial DNA copy number/g root or leaf (fresh weight) of P30F53 *Zea mays* cultivated *in vitro*, inoculated and control samples after inoculation with *H. seropedicae* SmR1.

qPCR assay	Root		Bacterial DNA copy number/g root		Bacterial DNA copy number/g root		Bacterial DNA copy number/g leaf		Bacterial DNA copy number/g leaf	
	DAI	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n
	Root				Leaf					
	Control		Inoculated		Control		Inoculated			
SYBR Green	4	0/6	-	9/9	$1.29 \pm 0.86 \times 10^9$	0/6	-	9/9	$1.27 \pm 1.07 \times 10^7$	
	7	0/6	-	9/9	$2.03 \pm 0.36 \times 10^9$	0/6	-	9/9	$1.03 \pm 0.84 \times 10^9$	
	10	0/6	-	9/9	$3.52 \pm 0.15 \times 10^9$	0/6	-	9/9	$1.69 \pm 2.37 \times 10^9$	
TaqMan	4	0/6	-	9/9	$5.62 \pm 2.55 \times 10^8$	0/6	-	8/9	$9.37 \pm 8.86 \times 10^6$	
	7	0/6	-	9/9	$1.23 \pm 0.22 \times 10^9$	0/6	-	9/9	$6.76 \pm 5.71 \times 10^8$	
	10	0/6	-	9/9	$1.94 \pm 0.85 \times 10^9$	0/6	-	9/9	$0.99 \pm 1.35 \times 10^9$	

The SYBR Green qPCR assays were realized with 100 nmol/L HERBAS1 primers and 20 ng of sample DNA. The TaqMan qPCR assays were realized with 100 nmol/L HERBAS1 probe. Values presented as means \pm standard deviation. Means represents only the values detected over the limit of detection (> LOD) of 10 copies (n = 6 for control, n = 9 for inoculated samples).

Table 7 Bacterial DNA copy number/g root or leaf (fresh weight) of P30F53 Zea mays cultivated in soil, inoculated and control samples after inoculation with *H. seropedicae* SmR1.

qPCR assay	DAI	Bacterial DNA copy number/g root		Bacterial DNA copy number/g root		Bacterial DNA copy number/g leaf		Bacterial DNA copy number/g leaf	
		> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n	> LOD/n
		Root				Leaf			
		Control		Inoculated		Control		Inoculated	
SYBR Green	14	2/6	$2.57 \pm 0.06 \times 10^5$	9/9	$1.32 \pm 0.92 \times 10^5$	0/6	-	0/9	-
	21	2/6	$5.13 \pm 0.99 \times 10^4$	6/9	$3.09 \pm 0.48 \times 10^5$	0/6	-	0/9	-
	28	0/6	-	3/9	$7.43 \pm 1.97 \times 10^4$	0/6	-	0/9	-
TaqMan	14	2/6	$4.24 \pm 0.02 \times 10^5$	9/9	$3.02 \pm 2.22 \times 10^5$	0/6	-	2/9	$16.1 \pm 0.07 \times 10^3$
	21	2/6	$8.21 \pm 2.20 \times 10^4$	7/9	$6.06 \pm 3.12 \times 10^5$	0/6	-	0/9	-
	28	0/6	-	3/9	$2.07 \pm 0.09 \times 10^5$	0/6	-	0/9	-

The SYBR Green qPCR assays were realized with 100 nmol/L HERBAS1 primers and 20 ng of sample DNA. The TaqMan qPCR assays were realized with 100 nmol/L HERBAS1 probe. Values presented as means \pm standard deviation. Means represents only the values detected over the limit of detection (> LOD) of 10 copies (n = 6 for control, n = 9 for inoculated samples).

Standard curves were also constructed for each gene using cDNA from inoculated root as template, which generate curve equations determining qPCR parameters such as efficiency and R^2 (Table 8).

Table 8 Amplification efficiencies and correlation coefficients (R^2) for RT-qPCR validation assay. The values were obtained using standard curves of serial dilution of an *in vitro* inoculated root cDNA sample.

<i>Herbaspirillum seropedicae</i> gene	Efficiency (%)	R^2
<i>Nitrogenase protein (nifH)</i>	105	0.999
<i>Hypersensitive response conserved (hrcN)</i>	166	0.937
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta' (rpoC)</i>	104	0.998

Figure 7 qPCR standard curves for *H. seropedicae* transcript quantification generated using 3 DNA extractions from *H. seropedicae* strain SmR1 as template and (a) *nifH*, (b) *rpoC* and (c) *hrcN* primers (n = 9).

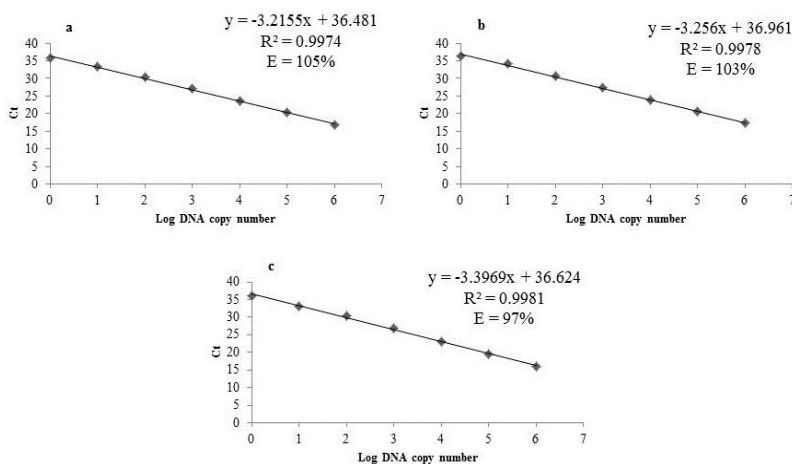


Figure 8 Quantification of bacterial cDNA copy number per 40 ng of total cDNA, maize (P30F53 variety) grown *in vitro* after inoculation with *H. seropedicae* strain SmR1. (a) *nifH* transcripts abundance (b) *rpoC* transcripts abundance (c) *hrcN* transcripts abundance. Data are presented as mean \pm SD (n=9).

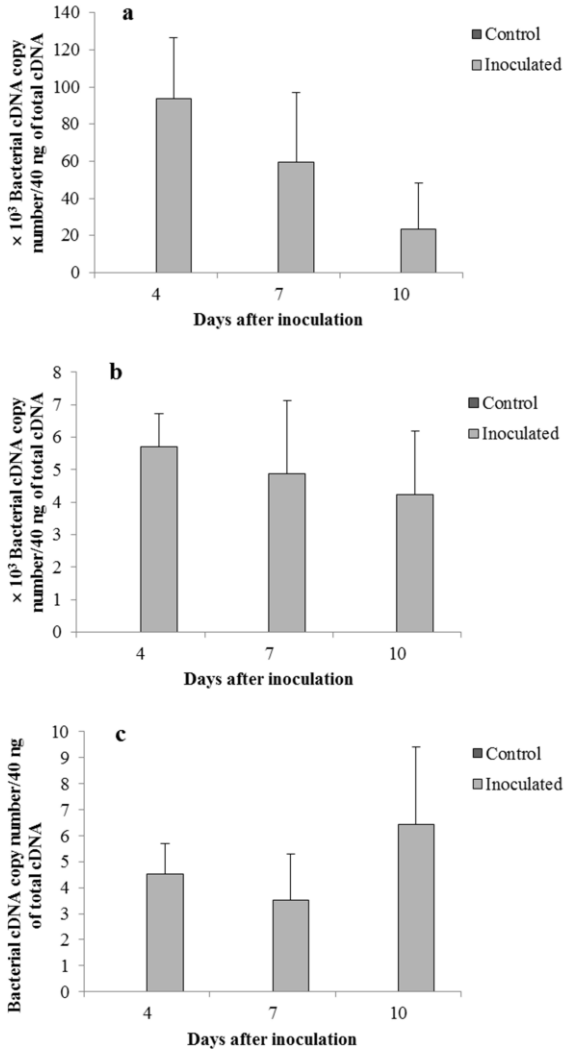
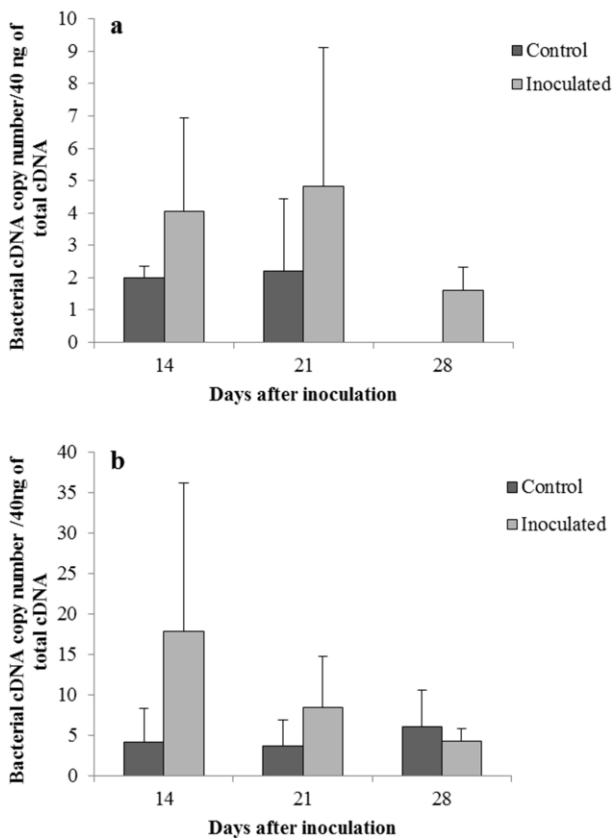


Figure 9 Quantification of bacterial cDNA copy number per 40 ng of total cDNA, maize (P30F53 variety) grown in soil after inoculation with *H. seropedicae* strain SmR1. (a) *nifH* transcripts abundance and (b) *rpoC* transcripts abundance. Data are presented as mean \pm SD (n=9).



Discussion

Considering that there are few studies involving *H. seropedicae* response inside the plant, and assuming that different experimental settings would be required for a better comprehension about the plant-endophyte interaction (Hardoim *et al.*, 2015), we developed qPCR assays to evaluate *Zea mays* colonization by *H. seropedicae* SmR1 in two growth conditions, *in vitro* and in soil.

Herein we quantified *H. seropedicae* DNA in maize roots and leaves using HERBAS1 species-specific primer set previously designed for SYBR Green qPCR assay (Pereira *et al.*, 2014). Besides, we aimed to validate a more specific tool for *H. seropedicae* DNA quantification, designing TaqMan HERBAS1 probe. TaqMan assay is the choice for qPCR targeting specific phytopathogens (Oliveira *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2013). The labeled fluorogenic hybridization probe (TaqMan) is cleaved by 5' nuclease activity of *Taq* DNA polymerase during the extension phase of PCR, yielding a real time measurable fluorescence emission directly proportional to the concentration of the target sequence (Heid *et al.*, 1996). TaqMan probe with conjugated minor-groove-binding (MGB) groups form extremely stable duplexes with single-stranded DNA targets, allowing the design of shorter probes with high specificity of the hybridization (Kutyavin *et al.*, 2000).

In order to establish a reliable DNA quantification, qPCR parameters for SYBR Green and TaqMan assays were defined using standard curves, once the use of a substantial standard curve based on a known DNA concentration makes it theoretically possible to quantify DNA from any source (Timmusk *et al.*, 2009). Considering that a consistent standard curve should have a R^2 value of more than 0.95 and a slope between -3.0 and -3.9 (corresponding to PCR efficiencies of 80 and 115%) (Zhang e Fang, 2006), all curves presented reliable qPCR parameters (Tables 3 and 4). Using a specific standard curve for each plate run, *H. seropedicae* DNA quantity on roots and leaves of maize grown *in vitro* and in soil could be properly estimated using SYBR Green and TaqMan probe assay. Aiming to verify if the TaqMan probe assay could differentiate *H. seropedicae* from other bacteria (even other bacteria from the same genera), we used DNA samples isolated from pure cultures of *H. seropedicae* and other bacteria species. Our results confirm the specificity of the HERBAS1 probe (Table 5) based on the Ct values presented by *H. seropedicae* (Ct = 10.21). In contrast, other species belonging to *Herbaspirillum* genera presented positive signals, but with late Ct values (> 32.30). Furthermore, other bacteria species did

not shown amplification signals. The difference of Ct values between the target and other bacteria species (at least 22.9) is more than enough to validate the use of this experimental condition, since the nonspecific amplification will not influence the analysis (Martin-Sanchez *et al.*, 2013). In a previous work using SYBR Green chemistry to detect and quantify *H. seropedicae* DNA in maize plants (Pereira *et al.*, 2014), HERBAS1 primers were tested for *H. seropedicae* specificity, proving that this pair of primers is very specific for *H. seropedicae* DNA detection and quantification *in planta*. Comparing the nonspecific Ct values using SYBR Green (25.59 for *H. rubrisubalbicans* and 29.62 for *H. frisingense*) with the nonspecific Ct values using TaqMan probe (32.68 for *H. rubrisubalbicans* and 32.3 for *H. frisingense*), the nonspecific amplification was reduced using TaqMan assay as expected. Taken together, these results showed that *H. seropedicae* DNA can be properly detected and quantified by SYBR Green assay or alternatively using more specific TaqMan assay.

The sensitivity of qPCR quantification experiments is given by the LOD, which is defined as the lowest DNA concentration in a sample that can be reliably detected. In qPCR assays, it is accepted that the LOD is the DNA amount at which 95% of the positive samples are detected (or no more than 5% failed reactions should occur) (Bustin *et al.*, 2009). For the SYBR Green and TaqMan assays, the amplifications below the LOD were discarded, while those above the LOD were accounted and Ct values were used to calculate the mean value of the bacterial DNA copy number/g fresh tissue (Tables 7 and 8). For *H. seropedicae* DNA quantification in maize roots and leaves using SYBR Green assay, the LOD was previously established as 10^1 genome copies, corresponding to a mean Ct value of 32.15 (Pereira *et al.*, 2014). Using TaqMan probe assay, LOD also corresponded to 10^1 genome copies (Ct 32.8), permitting a reliable DNA quantification from 10^6 to 10^1 genome copies, similar to SYBR Green assay.

Despite the difficulties in comparing LOD values between studies due to the differences in experimental designs, such as number of replicates, differences in master mix constituents, or conditions of DNA quantification (Price *et al.*, 2012), the LOD found in the present study (10^1 genome copy number, corresponding to 60.3 fg) is in accordance with other studies using TaqMan PCR assays to detect and quantify microbial genomic DNA. For example, the genomic DNA of the pathogenic fungus *Magnaporthe oryzae* in rice, could be detected as low as 1 pg (Su'udi *et al.*, 2013), as well as to detect *Paenibacillus polymyxa* DNA in wild barley (Timmusk *et al.*, 2009). Also, for *Bacillus subtilis*

and *Pseudomonas fluorescens* detection in soil, it was set a LOD of 10 pg (Kim *et al.*, 2010).

Using the established set of primers HERBAS1 and HERBAS1 probe, the present study quantified *H. seropedicae* presence on roots and leaves of maize (P30F53 variety) cultivated *in vitro* and in soil employing SYBR Green and TaqMan chemicals in qPCR assays. There is a single copy of the HERBAS1 target sequence in *H. seropedicae* genome (Pedrosa *et al.*, 2011), which allows us to estimate the bacterial cell number in maize tissues (Pereira *et al.*, 2014).

H. seropedicae DNA quantification in plants cultivated *in vitro*, using both SYBR Green and TaqMan qPCR assays (Table 6), indicates an increase or at least maintenance of the genome copy number per gram of root in inoculated maize roots and leaves along the time course (4, 7 and 10 DAI). Our results are consistent with those found previously in maize root plants (DKB240 variety) grown in the same conditions from 1 to 10 DAI (Pereira *et al.*, 2014).

Under laboratory conditions, *H. seropedicae* invade and colonize very quickly maize tissues, and 24 hours after inoculation, roots (including xylem vessels) are completely colonized by the bacteria. The plant vascular system colonization allows the bacteria distribution throughout the host, reaching shoots (Monteiro *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2012). Our results strengthen these findings, since *H. seropedicae* DNA was detected in both belowground and aboveground tissues. Likewise qPCR assays were performed to quantify *A. brasilense* FP2 on roots of maize (Faleiro *et al.*, 2013) and wheat (Stets *et al.*, 2015). For both maize P30F53 and DKB240 varieties, *A. brasilense* DNA copy number per gram of root increased from 10^6 to 10^9 (Faleiro *et al.*, 2013), confirming the possibility to detect and quantify diazotrophic bacteria in maize tissue and the rapid colonization of the plant tissue by plant growth promoting bacteria.

Regarding *H. seropedicae* DNA quantification of plants grown in soil (Table 7), inoculated plants usually presented higher rates of *H. seropedicae* presence, comparing to control plants. Inoculated root samples showed bacteria presence about 10^5 DNA copy number per gram of fresh root for SYBR Green and TaqMan assays at 14, 21 and 28 DAI. Otherwise, *H. seropedicae* DNA was detected in 2 out of 27 leaf samples of inoculated plants. Even if it is not possible to directly compare different analyzed times after inoculation among the different substrates, it is important to note that under axenic conditions there is absence of competing bacteria and the introduction of competition may substantially change plant colonization patterns. Regarding that bacteria

(even beneficial or pathogenic) penetrate the plant tissue by the same attachment points, competing bacteria may secrete anti-bacterial substances and the plant may elaborate a defense against the mixed bacterial population (Monteiro *et al.*, 2008). *H. seropedicae* attach and colonize maize root surface progressively from 3 to 15 days after inoculation (Roncato-Maccari *et al.*, 2003). In contrast, a longer time study, which examined the population dynamics of *H. seropedicae* strain HRC 54 associated with maize roots, showed a continuous decrease in number of bacterial cells per gram of root (fresh weight) from 7 to 14, 21 and 30 DAI (Da Silva Lima *et al.*, 2014). Similar to our soil experiment, in which *H. seropedicae* DNA presence was lower 28 DAI (3 positive/9 total) comparing to 14 and 21 DAI. The same study also detected *H. seropedicae* HRC 54 presence in control plants, but fewer than in inoculated, as our results from plants grown in soil.

H. seropedicae DNA quantification stands in the higher bacteria genome copy number found on roots comparing to leaves in maize plants in both growth conditions. This may be a common behavior in diazotrophic bacteria, once other studies also found a greater bacteria presence in rhizosphere of grasses comparing to shoots (Pariona-Llanos *et al.*, 2010; Rodriguez-Blanco *et al.*, 2015). In most plants, the endophytes number in roots is higher comparing to aboveground tissues (Rosenblueth e Martinez-Romero, 2006). Higher *Herbaspirillum* spp. amounts were also observed on roots than stems in sugarcane field experiment (Dos Reis *et al.*, 2000). Additionally, *Bacillus megaterium*, a Gram-positive nitrogen-fixing bacteria which has similar colonization pattern to some Gram-negative endophytic diazotrophs, such as *A. brasilense*, migrates slowly from roots to leaves (Liu *et al.*, 2006). This might explain the lower amount of bacteria found in shoots in these studies comparing to roots.

Bacterial gene expression (*nifH*, *rpoC* and *hrcN*) was analyzed on maize roots by RT-qPCR absolute quantification using standard curves performed with serial dilutions of *H. seropedicae* SmR1 DNA. Similar approach has already been employed in study of environmental diazotrophic diversity using *nifH* gene expression as a molecular marker (Martensson *et al.*, 2009).

The accuracy of the bacterial transcript quantification assay on roots of maize inoculated with *H. seropedicae* SmR1 in the present study was verified by qPCR standard curves parameters using bacterial DNA as template. According to Zhang and Fang (2006) the efficiencies between 80 and 115% are consistent with reliable standard curves. In this way, the efficiency values found in this study for *nifH* (105%), *rpoC*

(103%) and *hrcN* (97%) bacterial genes (Figure 7) are in accordance with the established parameters and hence the bacterial absolute transcript quantification could be properly measured.

In this study, *H. seropedicae nifH*, *rpoC* and *hrcN* transcripts were quantified in maize roots grown in two growth conditions. We were able to detect *nifH* gene expression on inoculated maize roots, cultivated in two growth conditions. The highest amounts of *nifH* transcripts was found in inoculated samples grown *in vitro*, remaining about 10^5 bacterial cDNA copy number at 4, 7 and 10 DAI, although lower amounts were observed in soil plants. Our results are in accordance with previous studies showing that genera *Herbaspirillum* were able to express *nif* genes and presented nitrogenase activity when associated with other Poaceae, such as sorghum, rice and sugarcane (James *et al.*, 1997; Olivares *et al.*, 1997; Elbeltagy *et al.*, 2001; Gyaneshwar *et al.*, 2002; James *et al.*, 2002).

Inoculated maize samples cultivated in axenic conditions (*in vitro*) had a relatively constant *rpoC* gene expression, between 5.7 and 4.2×10^3 cDNA copy number per 40 ng of total cDNA. Our results suggest that *rpoC* transcript level is a possible tool to monitor *H. seropedicae* activity *in planta*. *rpoC* gene expression was tested as a reference gene for *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources, however it was highly variable (Galisa *et al.*, 2012). In contrast, *rpoC* presented constant expression for *H. seropedicae* culture in the presence of sugarcane extract, and it has been used as a reference gene for normalization of relative gene expression by RT-qPCR (Cordeiro *et al.*, 2013). Our report is the first that successfully measure *rpoC* transcript levels *in planta*.

Herein, transcripts of *hrcN* gene, coding for T3SS ATP synthase, was also measured. *In vitro* inoculated roots presented higher rates of *hrcN* transcripts at 10 DAI, comparing to 4 and 7 DAI. In contrast, *hrcN* transcript was not detected on roots in soil experiment at 14, 21 or 28 DAI. It was previously suggested that specific physiological conditions might be required for expression and activity of T3SS and synthesis of effector proteins in *H. seropedicae* (Pedrosa *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2012). It is possible that the necessary conditions were achieved under *in vitro* plant growth condition 4, 7 and 10 DAI, but not in soil 14, 21 and 28 DAI. Despite transcriptomic analysis of *in vitro* *H. seropedicae* and maize interaction did not reveal T3SS gene expression (Balsanelli *et al.*, 2015), T3SS was identified by mass spectrometry when investigating the root proteome of *H. seropedicae* and maize interaction 7 DAI (Ferrari *et al.*, 2014).

In conclusion, we quantified *H. seropedicae* DNA presence on roots and leaves of maize plants (P30F53 variety) inoculated with diazotrophic bacteria *H. seropedicae*, and also measured the transcripts levels of bacterial genes on maize roots of plants grown in sterile and nonsterile conditions. We developed a specific, reliable and efficient TaqMan probe for qPCR assay, to quantify *H. seropedicae* DNA in plant tissues. *H. seropedicae nifH* and *rpoC* gene expression were detected on roots of inoculated maize grown in both growth conditions, however it was not possible to verify *hrcN* gene expression in plants grown in soil. Our results suggest that it is possible to use *nifH* and *rpoC* transcript levels to monitor *H. seropedicae* presence and activity inside plant tissue.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Institute of Science and Technology-Biological Nitrogen Fixation (INCT-FBN), National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil. Pâmela Dall Asta, Tomás Pellizzaro Pereira and Fernanda Plucani Amaral were recipients of PhD fellowships from Coordination of Personnel Improvement of Higher Education (CAPES), Ministry of Education, Brazil. Ana Carolina Maisonnave Arisi is recipient of research fellowship (PQ2) from CNPq. We would like to express our gratitude to Emanuel Maltempi de Souza, who kindly provided *H. seropedicae* strain SmR1.

5 CAPÍTULO II

***Herbaspirillum seropedicae* colonize and promote plant growth but do not control anthracnose in maize leaves**

Dall'Asta, Pâmela; Velho, Aline Cristina; Pereira, Tomás Pellizzaro; Stadnik, Marciel João; Arisi, Ana Carolina Maisonnave

Abstract

Hemibiotrophic fungus *Colletotrichum graminicola* causes anthracnose, an aggressive and important maize disease with worldwide distribution. On the other hand, *Herbaspirillum seropedicae* is a diazotrophic plant growth promoting bacteria (PGPB) able to colonize maize tissues and exert beneficial effects in plants. In this sense, since *C. graminicola* is highly destructive and causes severe economic and yield losses in maize fields and *H. seropedicae* SmR1 is a well-studied PGPB, we tested if *H. seropedicae* SmR1 would be able to control leaf anthracnose in maize plants (P30F53), alone or in consortium with humic substances. The first assay consisted of maize plants pre-treated with *H. seropedicae* SmR1 followed by *C. graminicola* inoculation at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT). The second assay was performed with maize pre-treatment with *H. seropedicae* SmR1 associated to humic substances followed by inoculation with *C. graminicola* at 3 and 7 DAT. The anthracnose severity was assessed by measurement of necrotic and chlorotic leaf area. We also quantified bacterial presence in leaves by qPCR. It was not possible to detect any response of *H. seropedicae* (associated or not to humic substances) in controlling disease severity in maize leaves. However it was shown that this PGPB effectively colonized the leaves. Therefore, using P30F53 maize cultivar and *C. graminicola* inoculation, *H. seropedicae* could not act as biocontrol agent. However, once the response is dependent of the plant genotype and the phytopathogen, it is still possible that further studies, when combining other phytopathogen, maize genotype or even other plant species, found *H. seropedicae* as an effective biocontrol agent.

Keywords: *C. graminicola*; anthracnose; *H. seropedicae*; PGPB; Biocontrol agent.

Introduction

The hemibiotrophic fungus *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson causes anthracnose in maize. As all species belonging to *Colletotrichum* genera, it combines a transient biotrophic phase, during which the host cells remains alive, with a highly destructive necrotrophic development that kills the cells while spreads itself through the host tissue (Perfect e Green, 2001; Münch *et al.*, 2008). Anthracnose is one of the most important diseases that affects maize fields around the world (Bergstrom e Nicholson, 1999; Sukno *et al.*, 2008; Palaversic *et al.*, 2009; Jirak-Peterson e Esker, 2011; Nicoli *et al.*, 2016), including Brazil (Cota *et al.*, 2012). Every part of the maize plant is affected by the disease, but it is more frequently observed in the form of anthracnose leaf blight and anthracnose stalk rot (Bergstrom e Nicholson, 1999), which represent the most economically damaging forms of the disease, resulting in severe yield losses in crops, especially under tropical conditions. The incidence of anthracnose in Brazil has increased in recent years as result of the successive plantings, adoption of no-tillage without crop rotation and the use of susceptible genotypes. This is explained by the high ability of pathogens to survive in crop residues, leading to accumulation of inoculum in planting areas (Sukno *et al.*, 2008; Cota *et al.*, 2012).

There has been increasing interest in the development and use of new, accurate and environmentally safer alternatives for plant nutrition and protection against phytopathogens (Guerrero-Molina *et al.*, 2015). Plant growth promoting bacteria (PGPB) effectively colonize plant tissues exerting beneficial effects on plant development being also used as a tool for disease control. These biocontrol agents act improving soil fertility and crop yield, while reducing negative impacts of chemical fertilizers on the environment (Whipps, 2001; Babalola, 2010; Perez-Montano *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2016; Vejan *et al.*, 2016). PGPB can decrease or prevent damage caused by bacteria, viruses or fungi in plants, mainly through mechanisms such as: (i) antagonism; (ii) competition for iron; and (iii) induction of systemic resistant against pathogens (Glick e Bashan, 1997; Dobbelaere *et al.*, 2003; Perez-Montano *et al.*, 2014). However, a PGPB usually uses more than one approach to exert effective biocontrol activity against a pathogen (Alabouvette *et al.*, 1993).

Regarding to the beneficial effects of PGPB as biocontrol agents, a series of studies can be found using species of *Pseudomonas* against the most diverse pathogens (Liu *et al.*, 1995; Nandakumar *et al.*, 2001;

Elbadry *et al.*, 2006; Cabanas *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2016; Yasmin *et al.*, 2016), including those belonging to *Colletotrichum* genera (Gang *et al.*, 1991; Viswanathan e Samiyappan, 1999; Bigirimana e Hofte, 2002; Viswanathan e Samiyappan, 2002; Planchamp *et al.*, 2015), and even *C. graminicola* species in maize (Planchamp *et al.*, 2015). *Bacillus* bacteria were effective against *C. acutatum* (Park *et al.*, 2013) and other pathogens (Niu *et al.*, 2011; Raj *et al.*, 2012). *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Arencibia *et al.*, 2006), *Brevibacterium iodinum* (Son *et al.*, 2014), *Azospirillum* sp. (Yasuda *et al.*, 2009) and *Azospirillum brasilense* (Bashan e De-Bashan, 2002) were able to exert control in plants challenged by different phytopathogens. PGPB *Azospirillum brasilense* also controlled anthracnose disease (caused by *C. acutatum*) in strawberry plants (Tortora *et al.*, 2011; 2012). Some efficient approaches also used mixture of different PGPB strains to increase the biocontrol efficacy (Latha *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016). All those studies consisted in well succeeded alternatives for potentially using PGPB as biocontrol agents for different diseases in most diverse plants.

Herbaspirillum seropedicae is a PGPB able to colonize internal tissues of plants (endophytic bacteria) also belonging to the diazotrophic bacteria group (Chubatsu *et al.*, 2012). In this sense, *H. seropedicae* is capable to convert atmospheric nitrogen into ammonia, which can be used by the plant (Dobbelaere *et al.*, 2003). Also, *H. seropedicae* associates mainly with Poacea (Baldani *et al.*, 1986; Olivares *et al.*, 1996; James e Olivares, 1998) and the extensively studied SmR1 strain (Monteiro *et al.*, 2012), has its complete genome sequenced and published (Pedrosa *et al.*, 2011). *Herbaspirillum* sp. was already suggested as a potential biocontrol agent by Weber *et al.* (2007), once the bacteria presence on plantlets of banana ‘Maça’ decreased the severity of the disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *H. seropedicae* has at least 27 genes involved in iron transport and metabolism (Pedrosa *et al.*, 2011). In fact, production of siderophores called serobactins was observed in *H. seropedicae* Z67 (Rosconi *et al.*, 2013), and these compounds contribute for the competitive performance of *H. seropedicae* inside the host plant (Rosconi *et al.*, 2016). Besides that, *H. seropedicae* seems to be able to modulate plant defense responses (Brusamarello-Santos *et al.*, 2012; Cordeiro *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014).

Vermicompost, a renewable organic product containing humic substances with high biological activity (Martinez-Balmori *et al.*, 2014), has been demonstrated to exert a synergistic interaction with PGPB. In this sense, vermicompost enhances the beneficial effects of PGPB

agents, such as soil nutrients availability, microbial biomass and crop yield and quality. Despite this, promotion depends on the dose of vermicompost and crop types, this integrative practice has been suggested to substitute regular chemical fertilization practices (Song *et al.*, 2015). It was already shown that maize inoculation with *H. seropedicae* in presence of humic substances improved bacterial colonization in roots (Canellas *et al.*, 2013). For instance, combining the benefits of vermicompost plus *H. seropedicae* and humate, it was observed benefits in tomato seedlings growth and development, providing an opportunity for effectively increasing biological inputs to sustainable food, fiber and energy production (Olivares *et al.*, 2015).

Taking in account *H. seropedicae* potential to become a biological agent and anthracnose importance as well as a chance to find a sustainable way to control this disease, we tested *H. seropedicae* SmR1 potential (associated or not to humic substances) to control anthracnose in maize plants and verified the bacterial colonization *in planta*.

Material and Methods

Microorganisms growth conditions

H. seropedicae was routinely grown in an orbital shaker (120 rpm) at 30°C in 30 mL NFbHPN medium supplemented with 5 mg/L malic acid (Klassen *et al.*, 1997). The Optical Density (OD) of bacterial cell cultures was measured at 600 nm using Hitachi U2910 Spectrophotometer (Tokyo, Japan).

C. graminicola isolate MANE53 is deposited in the mycological collection (MANE) of the Laboratory of Plant Pathology, Federal University of Santa Catarina, Brazil. For fungal cultivation, pure cultures of the isolate were grown on potato dextrose agar medium (PDA) and incubated for 21 days under fluorescent light with 12 hours photoperiod at $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

Association between *H. seropedicae* and *C. graminicola*

This assay involved maize (genotype Pioneer 30F53) pre-treated with *H. seropedicae* SmR1, followed by inoculation with pathogenic fungus *C. graminicola*. Seeds were surface-sterilized by immersion in 70% ethanol for 5 min, followed by submersion in 2% sodium hypochlorite plus 2.5% Tween-20 solution for 30 min. Seeds were then rinsed 3 times with sterile distilled water, germinated in water moist filter paper and stored at $\pm 25^{\circ}\text{C}$ in a dark chamber for 3 days. The

seedlings were pre-treated with washed *H. seropedicae* SmR1 culture ($OD_{600} \cong 0.8$; 10^8 cells of *H. seropedicae* SmR1 mL^{-1}) after dilution to 10^7 cells mL^{-1} in sterile NFb malate medium without nitrogen source, for 30 min under constant agitation (80 rpm) (Balsanelli *et al.*, 2010). Control seedlings were treated equally but with no bacterial culture addition. After inoculation, seedlings were placed in 2L pots containing soil from Cerro Negro, Santa Catarina, Brazil, $27^{\circ} 47' 43''$ S, $50^{\circ} 52' 33''$ W previously supplemented with 100 mL nutrient solution (Rodríguez-Salazar *et al.*, 2009) with reduced nitrogen (0.5 mM KNO_3). Plants were grown in greenhouse under natural light without temperature control (average temperature about $28^{\circ}C$), watered daily and weekly were added 100 mL of nutrient solution per pot.

C. graminicola inoculation was performed at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT) with *H. seropedicae* (vegetative stage V4, V5 and V6, respectively). First, the conidia suspension was filtered through sterile double layer cheesecloth and washed twice by centrifugation at $25^{\circ}C$ and $1098 \times g$ for 8 min. Whole plants were sprayed with a suspension of 5×10^5 conidia mL^{-1} plus Tween 20 (1 μL per 10 mL inoculum) using an atomizer connected to an air compressor (58 psi), delivering about 5 mL $plant^{-1}$. Plants were placed in a moist chamber for 24 h (100% humidity), in the dark. Then, they were transferred to the greenhouse again. Five days after the pathogen inoculation, two leaves per plant per time of treatment were sampled and digitally scanned to determine percentages of necrotic and chlorotic leaf area using the software Quant®. Using the same software it was also measured the total leaf area (v.1.02, Federal University of Viçosa, 2003).

The experiment was performed in completely randomized blocks, with 4 biological replicates. T-test was used to compare control and treated groups. Wilcoxon-Mann-Whitney was used to compare leaf area assessments. Analyses were performed using Assisat software (v. 7.7 beta, Federal University of Campina Grande, Brazil, 2016) under 95% of significance.

Association between *H. seropedicae*, Humic Substances and *C. graminicola*

This experiment consisted of maize pre-treated with *H. seropedicae* SmR1 associated to humic substances, followed by inoculation with pathogenic fungus *C. graminicola*. *H. seropedicae* cultivation, seeds germination and plantlets treatment with *H. seropedicae* were realized as described above. Control and treated

plantlets were transferred to 2L pots containing soil from the experimental area of Federal University of Santa Catarina, Brazil (Fazenda da Ressacada, Florianópolis, Brazil, 27° 40' 51.1" S 48° 32' 22.2" W). By the time the maize plantlets were sown, soil was treated with humic substances (or water). Humic substances were added (50 mg CL⁻¹) in a proportion of 10% v/m (or water). Humic substances were isolated from vermicompost prepared using sugarcane filter cake (Jindo *et al.*, 2016). Plants were grown in greenhouse under natural light without temperature control (average temperature about 26.5°C) and watered daily.

C. graminicola inoculation was performed after 3 and 7 DAT with *H. seropedicae* (vegetative stage V3 and V4, respectively), as described above, however a suspension of 1×10^5 conidia mL⁻¹ was used. Plants were placed in a moist chamber for 24 h in the dark. Then, they were transferred to the greenhouse again. Five days after pathogen inoculation, two leaves per plant per time of treatment were detached. The oldest one was digitally scanned to determine the percentage of necrotic and chlorotic leaf area and to access the leaf area using the software Quant® (v.1.02, Federal University of Viçosa, 2003), while the youngest was immediately frozen in liquid nitrogen and stored -80°C for further analysis.

The experiment was performed in completely randomized blocks, with 4 biological replicates. Statistical analysis consisted of Kruskal-Wallis test to compare the groups in mensuration of chlorotic and necrotic maize leaf area; and to perform *H. seropedicae* DNA quantification. Tests were conducted under 95% of significance using Assistat (v. 7.7 beta, Federal University of Campina Grande, Brazil, 2016).

***H. seropedicae* quantification**

H. seropedicae SmR1 (expressed as DNA copy number and CFU) was quantified by qPCR using already designed pair of primers (Pereira *et al.*, 2014) and TaqMan probe. We estimated *H. seropedicae* DNA copy number/g leaf and *H. seropedicae* CFU/g leaf. Therefore, total DNA was isolated from maize tissue using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer, and each extract was pooled of three leaves. DNA isolation from *H. seropedicae* pure culture was performed using Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega™, Madison, WI, USA) with modifications (Pereira *et al.*, 2014). DNA concentrations were assessed (OD = 260 and 280 nm) on a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer (Willmington, DE, USA).

H. seropedicae DNA copy number/g leaf was established as already described, using a standard curve constructed from DNA isolated from *H. seropedicae* pure culture by plotting Ct value versus log *H. seropedicae* DNA copy number (Pereira *et al.*, 2014). Furthermore, *H. seropedicae* CFU/g leaf was estimated using a standard curve constructed from DNA isolated from serial dilution of *H. seropedicae* culture mixed with crushed plant-leaf tissues as described by Stets *et al.* (2015), with modifications. Maize seeds (P30F53) were surface-sterilized as described above and plants were grown under axenic conditions as *in vitro* experiment described previously (Pereira *et al.*, 2014). On the 11th day, leaves were detached and crushed in liquid nitrogen using a mortar and pestle. *H. seropedicae* culture ($OD_{600} = 0.8$; 10^8 cells of *H. seropedicae* SmR1 mL⁻¹), was serially diluted in autoclaved 0.9 % saline buffer ranging from 10^8 to 10^2 . A volume of 100 μ L of each culture dilution was added to 100 mg of crushed leaves, and this mixture was incubated for 1 h in room temperature and stored in ultra-freezer until DNA isolation. DNA was isolated from this whole mixture using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions and DNA concentrations were assessed by measurement of the optical density at 260 and 280 nm on a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer (Willmington, DE, USA). A standard curve was generated by plotting Ct versus number of *H. seropedicae* CFU added to each reaction tube. For both standard curves generated, amplification efficiencies were determined through the equation $E = 10^{(-1/s)} - 1$, where E is the efficiency and s is the slope obtained from the curve equation.

qPCR reactions contained 12.5 μ L of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 100 nmol/L of HERBAS1 forward and reverse primers, 100 nmol/L HERBAS1 probe, water and 20 ng of template DNA in a final volume of 25 μ L. All control samples reactions were carried out in duplicate following the cycling conditions: an initial incubation step at 50°C for 2 min, 95°C incubation for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Real-time PCR run was analyzed using automatic software settings. The reaction was performed in ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Results

Association *H. seropedicae* and *C. graminicola*

Regarding the first experiment, which consisted of the *C. graminicola* inoculation 7, 14 and 21 days after *H. seropedicae* (or control) treatment, the results of chlorotic and necrotic area of maize leaves are shown in Table 9. It was assessed two leaves per plant at each analyzed period of time and no relevant differences were observed even at 7, 14 or 21 DAT. An isolated difference was observed at 14 DAT in the second analyzed leaf (leaf 4) in chlorotic area. Furthermore, the experiment was repeated with *C. graminicola* inoculation at 14 DAT and no differences were observed between control and treated plants (data not shown), showing that *H. seropedicae* pre-treatment was not able to exert any effect in anthracnose disease control in leaves of maize plants.

Also concerning the first experiment, it was verified the total leaf area (cm²) and compared control and treated plants. While no differences were observed at 7 and 14 DAT, leaf area of the *H. seropedicae* treated plants at 21 DAT was greater than area of untreated plants for both assessed leaves (Table 10).

Association *H. seropedicae*, Humic Substances and *C. graminicola*

Disease severity assessment evaluation showed no difference in chlorotic or necrotic leaf area between the groups at 3 or 7 DAT with *H. seropedicae* (Table 11).

In order to confirm *H. seropedicae* colonization in leaves, *H. seropedicae* DNA and CFU were quantified by qPCR using standard curves. The standard curve constructed by plotting Ct x Log *H. seropedicae* DNA copy number (Figure 10A) presented $R^2 = 0.99$ and $s = -3.4$, which correspond to an amplification E of 96%. The standard curve corresponding to standard curve Ct x Log CFU *H. seropedicae* (Figure 10 B), showed $R^2 = 0.99$, $s = -3.2$ and $E = 107\%$.

H. seropedicae DNA and CFU quantification presented similar patterns either for 3 or 7 DAT (Figure 11A and 11B). When comparing DNA and CFU quantification at 3 DAT in two *H. seropedicae* treated groups (+H-HS and +H+HS), the association of humic substances and *H. seropedicae* (+H+HS) showed a positive effect in bacteria presence, once this associated group presented slightly higher amount of bacteria. Despite that, bacterial presence was statistically higher in *H. seropedicae* treated groups (+H-HS and +H+HS) in comparison with *H. seropedicae* untreated groups (-H-HS and -H+HS) at 3 DAT. Regarding bacterial quantification at 7 DAT, *H. seropedicae* DNA and CFU found in *H. seropedicae* untreated groups (-H-HS and -H+HS) were

statistically lower than in group with *H. seropedicae* and humic substances association (+H+HS), suggesting that this consortium favors bacteria colonization.

Table 9 Chlorotic and necrotic area of maize leaves pre-treated with *H. seropedicae* and inoculated with *C. graminicola* at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT).

C. <i>graminicola</i> inoculation DAT	Leaf*	Chlorotic (% area)		Necrotic (% area)	
		-H	+H	-H	+H
7	2	5.0 ± 5.8	9.3 ± 7.7	91.9 ± 5.9	85.8 ± 11.2
	3	0.4 ± 0.6	0.9 ± 1.4	33.5 ± 8.6	30.1 ± 3.2
14	3	8.0 ± 5.1	12.7 ± 6.7	70.2 ± 12.1	62.9 ± 12.2
	4	8.2** ± 1.5	5.1 ± 1.4	13.7 ± 8.3	6.5 ± 4.4
21	4	2.4 ± 1.7	0.8 ± 1.0	84.8 ± 7.3	89.4 ± 10.0
	5	1.7 ± 1.2	1.5 ± 1.2	47.4 ± 14.2	64.3 ± 12.9

Mean values correspond to the average of 4 replicates, each one being comprised of three leaves (n = 12). Data are presented as mean ± SD. The groups represent: -H (non treated with *H. seropedicae*) and +H (treated with *H. seropedicae*).

*Leaves were assessed at 5 days after inoculation with *C. graminicola*.

**Significant difference comparing *H. seropedicae* treated and untreated leaves using Student's t-test with 95% significance level.

Discussion

The capacity of *H. seropedicae* SmR1 associated or not to humic substances to control leaf anthracnose caused by *C. graminicola* was tested and colonization of *H. seropedicae* in maize leaves was assessed. Although no differences were detected in anthracnose severity in treated plants, *H. seropedicae* presence was confirmed, showing that the absence of response is not due to the failure of *H. seropedicae* plant colonization.

Table 10 Area of maize leaves (cm²) pre-treated with *H. seropedicae* and inoculated with *C. graminicola* at 7, 14 and 21 days after treatment (DAT). Mean values correspond to the average of 4 replicates, each one being comprised of three leaves (n = 12). Data are presented as mean ± SD. The groups represent: -H (non-treated) and +H (treated).

<i>C. graminicola</i> inoculation DAT	Leaf*	Leaf area (cm ²)	
		-H	+H
7	2	28.4 ± 3.2	25.8 ± 6.5
	3	80 ± 10.2	81.1 ± 6.6
14	3	67 ± 22.3	67.9 ± 20.3
	4	204.3 ± 26.6	187.7 ± 26
21	4	38.1 ± 27.9	**118.3 ± 38.4
	5	58 ± 9.1	**176.6 ± 37.4

*Leaves were assessed at 5 days after inoculation with *C. graminicola*.

**Significant difference using Wilcoxon-Mann-Whitney with 95% significance level.

Table 11 Chlorotic and necrotic area of maize leaves pre-treated with *H. seropedicae* with or without humic substances and inoculated with *C. graminicola* at 3 and 7 days after treatment (DAT).

<i>C. graminicola</i> inoculation DAT	Chlorotic (% area)				Necrotic (% area)			
	-H	-H	+H	+H	-H	-H	+H	+H
	-HS	+HS	-HS	+HS	-HS	+HS	-HS	+HS
3*	1.9 ±	1.3	3.9	1.4	18.8	15.5	14.2	15.4 ±
	3.7	± 2.7	± 2.9	± 2.8	± 6.9	± 3.5	± 7.8	2.3
7	7.6	11.5	7.0	7.8	56.9	50.5 ± 1	54.3	63.9
	± 2.8	± 1.3	± 3.8	± 3.0	± 11.1	3.9	± 11.6	± 10.2

Mean values correspond to the average of 4 replicates, each one being comprised of three leaves (n = 12). Data are presented as mean ± SD. The groups represent: -H-HS (non-treated, without humic substances), -H+HS (non-treated, with humic substances), +H-HS (treated, without humic substances) and +H+HS (treated, with humic substances). No significant differences were obtained using Kruskal-Wallis tests ($\alpha = 0.05$).

*Assessments were realized at 5 days after inoculation with *C. graminicola*.

H. seropedicae colonization in leaves was assessed through *H. seropedicae* DNA and CFU quantification based on standard curves.

The reliability of these standard curves was analyzed according to previously established patterns. According to that, reliable standard curves should have R^2 values highest than 0.95 and *slope* between -3.0 and -3.9, corresponding to PCR efficiencies of 80 – 115% (Zhang e Fang, 2006). All qPCR parameters found in this study (Figure 10) are in accordance to the parameters established by Zhang and Fang (2006). Moreover, the present study's values represents reliable standard curves even if using the more restricted parameters established by European Network of GMO Laboratories (Engl, 2008), which settles minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing ($R^2 \geq 0.98$, *slope* between -3.1 and -3.6, and E values from 90 to 110%).

Regarding maize leaf colonization (Figure 11), results showed a tendency of increment in values of *H. seropedicae* DNA copy number and CFU when *H. seropedicae* was associated with humic substances, if comparing to *H. seropedicae* treatment isolated at 3 DAT, despite not statistically significant. At 7 DAT, it was shown that bacteria associated with humic (+H+HS) substances presented highest bacteria presence in comparison to *H. seropedicae* non-treated groups (-H-HS and -H+HS). It was already shown that humic substances helped the maintenance of *H. seropedicae* population in maize roots (Canellas *et al.*, 2013), mainly using vermicompost extracted from sugarcane cake residue (Martinez-Balmori *et al.*, 2013). Despite that, our colonization results were effective, showing the accuracy of HERBAS1 pair of primers in detecting *H. seropedicae in planta* (Pereira *et al.*, 2014), even in maize leaves inoculated with a phytopathogen and in variable experimental conditions.

At 21 DAT, *H. seropedicae* treated leaves presented an increment in its area in comparison with untreated ones, what can indicate that *H. seropedicae* promoted leaf growth (Table 10). *H. seropedicae* inoculation has already shown to improve maize yield up to 34%, depending on the plant genotype (Alves *et al.*, 2015) as well as promote increments in maize dry weight and shoot and root lengths (Ribauda *et al.*, 2006). Increment in dry weight of rice inoculated with *H. seropedicae* was also observed at 28 (James *et al.*, 2002) and at 30 days after inoculation in some rice varieties (Gyaneshwar *et al.*, 2002), as well as improvement in rice fresh weight (Baldani *et al.*, 2000). In fact, in view of *H. seropedicae* SmR1 genome, some genes related to plant growth promoting characteristics were identified, such as nitrogen fixation, siderophores production (and their receptors) and auxin synthesis genes, as well as a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase gene (Pedrosa *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2012).

Maize plants were effectively colonized by bacteria *H. seropedicae* in this study, and the increased leaf area in treated plants observed can serve as an indicative of plant growth promotion by *H. seropedicae*. However, concerning the assessment of *H. seropedicae* control of anthracnose disease in maize plants, after *H. seropedicae* plants treatment do not exert biocontrol activity against anthracnose in maize, it was tested the association between this PGPB and humic substances, once the use of integrated disease management strategies to effectively manage diseases has been suggested as an alternative, because most of times, only a biocontrol agent may not be able to play this role by itself (Sahni *et al.*, 2008). However, not even this integrated management was able to control the disease caused by *C. graminicola* in maize P30F53 plants. Once *C. graminicola* is considered a highly aggressive phytopathogen (Bergstrom e Nicholson, 1999) and the genotype of maize contributes to the severity of symptoms resulting from infection with *C. graminicola* (Weihmann *et al.*, 2016), perhaps another maize genotype could be tested in further studies to investigate if this negative response is conclusive.

In conclusion, despite *H. seropedicae* and humic substances not be able to control anthracnose in maize P30F53, the possibility of *H. seropedicae* to become a successful biocontrol agent in other plant species or maize genotype or even against other disease caused by another phytopathogen could not be excluded, once this response is highly dependent on the plant and pathogen genotypes. Despite that, this study results point to plant growth promotion induced by *H. seropedicae* and the ability of humic substances to improve *H. seropedicae* colonization in maize plants.

Figure 10 qPCR standard curves for *H. seropedicae* quantification. Average Ct (n = 2): A) Curve generated using DNA isolated from pure culture of *H. seropedicae* SmR1 as template. Ct versus log DNA copy number. B) Curve generated using DNA isolated from 100 μ L of each serial dilution of *H. seropedicae* culture mixed with 100 mg of crushed *in vitro* plant-leaf tissues as template. Ct versus log CFU.

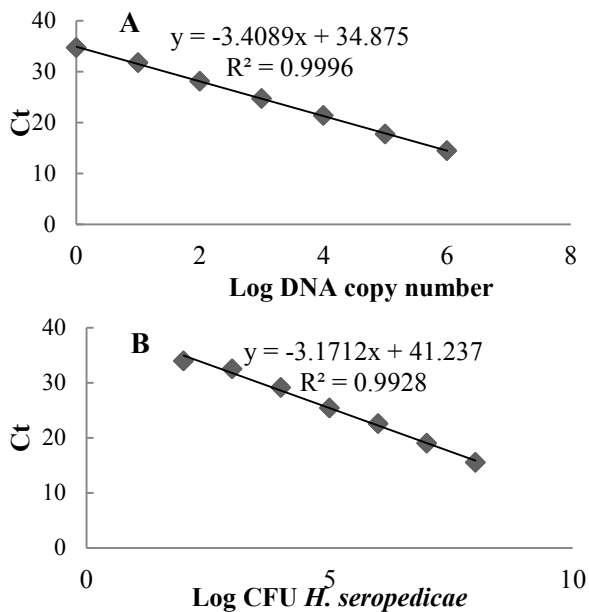
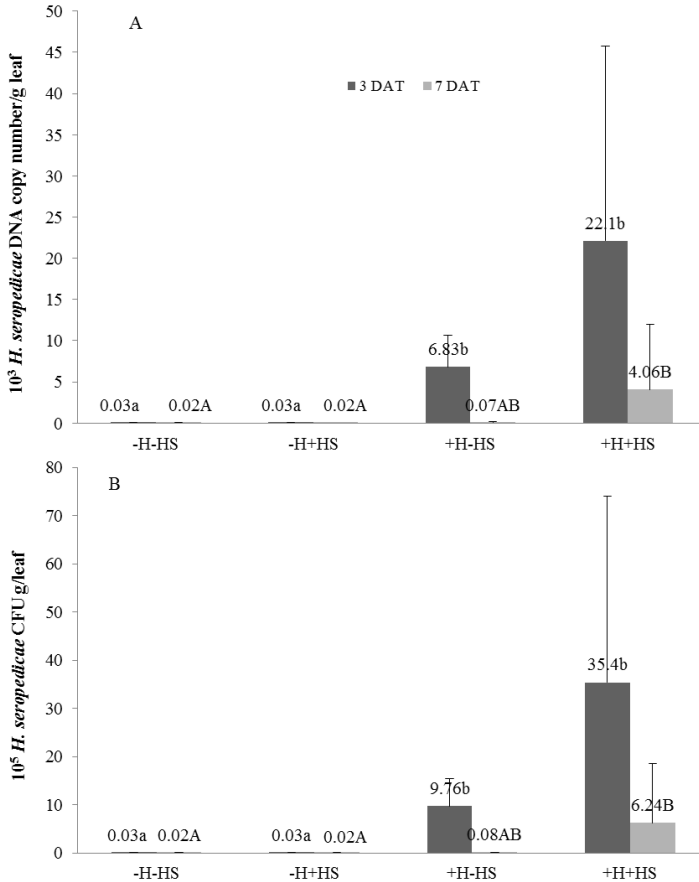


Figure 11 *H. seropedicae* DNA quantification in leaves of P30F53 *Zea mays*, after inoculation with *C. graminicola* 3 and 7 days after treatment with *H. seropedicae* with or without humic substances.



Values presented as 4 repeats means \pm standard deviation in duplicate ($n = 8$). The groups represent: -H-HS (non treated, without humic substances), -H+HS (non treated, with humic substances), +H-HS (treated, without humic substances) and +H+HS (treated, with humic substances): A) *H. seropedicae* DNA copy number/g leaf (fresh weight) using standard curve generated with DNA isolated from *H. seropedicae* pure culture. B) *H. seropedicae* CFU/g leaf (fresh weight) using standard curve generated with DNA isolated from serial dilution of *H. seropedicae* culture mixed with crushed plant-leaf tissues. Lowercase and capital letters indicate statistical difference using Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0.05$) at 3 and 7 DAH, respectively.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Institute of Science and Technology-Biological Nitrogen Fixation (INCT-FBN), National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil. The authors would like to thank professor Fábio Lopes Olivares, from University of North Fluminense, Brazil, who kindly provided the humic substances and to Emanuel Maltempi de Souza, who kindly provided *H. seropedicae* strain SmR1.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresenta novas informações acerca do estudo que vem sendo realizado acerca das BPCV em todo o Brasil e também fora dele, como parte da rede dos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, INCT de Fixação Biológica de Nitrogênio, com sede em Curitiba, Paraná. Assim, pesquisadores e grupos de pesquisa do mundo todo das áreas da biologia molecular, genômica, proteômica, bioinformática e transcriptômica vêm desenvolvendo trabalhos acerca das interações das mais diversas bactérias diazotróficas com as mais diversas plantas, buscando entender melhor, por exemplo, os mecanismos moleculares de associação e os efeitos e as modificações causadas pelas BPCV nas plantas. A união de esforços busca melhorar a atividade agrícola através do uso de bactérias fixadoras de nitrogênio e selecionar cepas que ajudem na promoção do crescimento das culturas agrícolas, bem como o uso de novos inoculantes como biofertilizantes para reduzir custos de produção agrícola e os impactos ambientais adversos causados pelo uso de fertilizantes nitrogenados.

Além do potencial de se tornarem inoculantes as bactérias diazotróficas promotoras do crescimento vegetal também têm sido estudadas com vistas ao seu potencial como efetivos agentes de controle biológico, e podem ser utilizadas como alternativa ao uso de pesticidas e fungicidas. Tanto o uso como inoculantes quanto o uso como agente de controle biológico apontam para a necessidade de se desenvolver práticas agrícolas mais sustentáveis. O presente trabalho, como parte desse universo de inúmeros e importantes trabalhos, buscou realizar sua contribuição para que o objetivo final da união de todos os esforços seja atingido, o qual consiste justamente numa maior sustentabilidade das práticas agrícolas.

Dessa forma, o primeiro artigo científico refere-se à quantificação de DNA e RNA de *H. seropedicae* em milho cultivado *in vitro* e em solo. Para tanto, foram utilizados ensaio de qPCR para a quantificação de DNA de *H. seropedicae* em folhas e raízes de milho cultivados sob condições estéreis e não estéreis. Foi possível desenvolver uma alternativa mais específica para a detecção de DNA de *H. seropedicae* em tecidos vegetais utilizando a sonda TaqMan. Também foi proposta uma nova metodologia para quantificação de genes de *H. seropedicae* em tecidos vegetais através de ensaio de RT-qPCR. Nesse sentido, foram quantificados os transcritos bacterianos *nifH* e *rpoC* em raízes de milho cultivado sob condições estéreis e não-estéreis, sendo que e os

níveis desses genes podem ser utilizados como ferramenta para quantificar a atividade de *H. seropedicae* em tecidos vegetais (raízes) sob condições laboratoriais e de campo.

Quanto ao segundo artigo, foi utilizada a BPCV *H. seropedicae* como tentativa de controlar a doença causada pelo agressivo fungo hemibiotrófico *C. graminicola* em milho. Assim, foi testada a capacidade de *H. seropedicae* controlar a antracnose foliar em milho, seja aplicado isoladamente ou em conjunto com substâncias húmicas. Porém, apesar de haver colonizado efetivamente as plantas, *H. seropedicae* não foi eficiente nesse intuito. Mesmo assim, não deve ser descartada, de forma alguma, a capacidade dessa bactéria exercer efeito no controle de outros patógenos, em outras plantas ou mesmo em diferentes genótipos de milho. E vale dizer que mesmo que *H. seropedicae* não tenha conseguido controlar essa doença nesse genótipo testado e nessas condições experimentais, ela permanece sendo uma importante espécie de BPCV que deve continuar a ser estudada em larga escala, pois possui potencial para ser utilizada como inoculante e como agente biológico de controle de doenças, sempre buscando dar mais um passo nessa longa caminhada que consiste a busca por práticas agrícolas mais sustentáveis.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A DARST, S. Bacterial RNA polymerase. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 2, p. 155-162, 2001.

ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 286-295, 2013.

AGUIAR, N. O. et al. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Annals of Applied Biology**, v. 168, n. 2, p. 203-213, 2016.

ALABOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P.; STEINBERG, C. Recent advances in the biological-control of Fusarium wilts. **Pesticide Science**, v. 37, n. 4, p. 365-373, 1993.

ALVES, G. C. et al. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1-2, p. 307-321, 2015.

AMARAL, F. et al. Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Symbiosis**, p. 1-10, 2014.

AMARAL, F. P. et al. Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 689-697, 2016.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 373-99, 2004.

ARENCEBIA, A. D. et al. *Gluconoacetobacter diazotrophicus* Elicite a Sugarcane Defense Response Against a Pathogenic Bacteria *Xanthomonas albilineans*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 1, n. 5, p. 265-273, 2006.

ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, n. 0, p. 15-22, 2013.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 11, p. 1559-1570, 2010.

BAKKER, P.; PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 97, n. 2, p. 239-243, 2007.

BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen-nov, sp-nov, a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 485-491, 2000.

BALIGAR, V. C.; BENNETT, O. NPK-Fertilizer efficiency – A situation analysis for the tropics. **Fertilizer Research**, v. 10, n. 2, p. 147-164, 1986.

BALSANELLI, E. et al. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2233-2244, 2010.

_____. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, p. n/a-n/a, 2015.

BARON, C.; ZAMBRYSKI, P. C. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? **Annual Review of Genetics**, v. 29, p. 107-129, 1995.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the

plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2637-2643, 2002.

BAUDOIN, E. et al. Applicability of the 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phytostimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 25-38, 2010.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012.

BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. In: (Ed.). **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.45, 2007.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11-18, 2009.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose - Knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, v. 83, n. 7, p. 596-608, 1999.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 199-209, 2008.

BIGIRIMANA, J.; HOFTE, M. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. **Phytoparasitica**, v. 30, n. 2, p. 159-168, 2002.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, n. 4, p. 343-350, 2001.

BOYD, L. A. et al. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 233-240, 2013.

BRADLEY, D. J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C. J. Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant-cell wall protein – A novel, rapid defense response. **Cell**, v. 70, n. 1, p. 21-30, 1992.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 113-125, 2012.

BUSTIN, S. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CABANAS, C. G. L. et al. The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 14, 2014.

CANELLAS, L. P. et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p. 119-132, 2013.

_____. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. **Annals of Applied Biology**, v. 153, n. 2, p. 157-166, 2008.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 3, 2014.

CANELLAS, L. P. et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 15-27, 2015.

_____. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 1951-1957, 2002.

CARVALHO, T. L. G. et al. Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 561-574, 2016.

_____. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5631-5642, 2014.

CHEBOTAR, V. K. et al. Endophytic Bacteria in Microbial Preparations that Improve Plant Development (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 271-277, 2015.

CHEN, S. X.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions - A novel function of peroxidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 3, p. 726-735, 1999.

CHISHOLM, S. T. et al. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803-814, 2006.

CHUBATSU, L. S. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 197-207, Jul 2012.

COCOLIN, L. et al. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 29-43, 2013.

COLLMER, A. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, n. 4, p. 329-335, 1998.

COMPANT, S. et al. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and

Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

CORDEIRO, F. A. et al. Proteomic Analysis of *Herbaspirillum seropedicae* Cultivated in the Presence of Sugar Cane Extract. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 3, p. 1142-1150, 2013.

COTA, L. V. et al. Quantification of Yield Losses Due to Anthracnose Stalk Rot on Corn in Brazilian Conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 11-12, p. 680-684, 2012.

COUILLEROT, O. et al. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, 2010.

_____. Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4639-4649, 2013.

CROUCH, J. A.; BEIRN, L. A. Anthracnose of cereals and grasses. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 19-44, 2009.

CRUTE, I. R.; PINK, D. A. C. Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1747-1755, 1996.

DA CONCEICAO, P. M. et al. Corn seed coating with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 545-548, 2008.

_____. Effect of the humic acids in endophytic diazotrophic bacteria inoculation in corn seeds. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 6, p. 1880-1883, 2009.

DA SILVA LIMA, L. et al. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture C7 - 23**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2014.

DE VLEESSCHAUWER, D.; CORNELLIS, P.; HOFTE, M. Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 12, p. 1406-1419, 2006.

DESVAUX, M. et al. The general secretory pathway: a general misnomer? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 306-309, 2004.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, 2004.

DO AMARAL, F. P. et al. Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Symbiosis**, v. 62, n. 1, p. 41-50, 2014.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOS REIS, F. B., JR. et al. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v. 219, n. 1-2, p. 153-159, 2000.

DUVAL, S. et al. Electron transfer precedes ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 41, p. 16414-16419, 2013.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 3013-3030, 1996.

ELBADRY, M. et al. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 113, n. 6, p. 247-251, 2006.

ELBELTAGY, A. et al. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285-5293, 2001.

ENGL. **Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing**, 2008.

FALEIRO, A. C. et al. Real time PCR detection targeting *nifA* gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125-133, 2013.

FERRARI, C. S. et al. Expressed Proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in Maize (DKB240) Roots-Bacteria Interaction Revealed Using Proteomics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2267-2277, 2014.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.

GABRIEL, D. W.; ROLFE, B. G. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 365-391, 1990.

GALISA, P. S. et al. Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 1, p. 1-7, 2012.

GANG, W.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 81, n. 12, p. 1508-1512, 1991.

GERMIDA, J. J. et al. Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **Fems Microbiology Ecology**, v. 26, n. 1, p. 43-50, 1998.

GLICK, B. R. The enhancement of plant-growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 2, p. 353-378, 1997.

GOOD, A. G.; BEATTY, P. H. Fertilizing Nature: A Tragedy of Excess in the Commons. **Plos Biology**, v. 9, n. 8, p. 9, 2011.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, v. 124, n. 1, p. 21-29, 2000.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.

GUERRERO-MOLINA, M. F. et al. Physiological, structural and molecular traits activated in strawberry plants after inoculation with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3. **Plant Biology**, v. 17, n. 3, p. 766-773, 2015.

GURURANI, M. A. et al. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51-65, 2012.

GYANESHWAR, P. et al. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 177-193, 2003.

HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HE, S. Y.; NOMURA, K.; WHITTAM, T. S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. **Biochimica Et**

Biophysica Acta-Molecular Cell Research, v. 1694, n. 1-3, p. 181-206, 2004.

HEATH, M. C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 3, p. 321-334, 2000.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HERNANDEZ, O. L. et al. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 1, p. 225-232, 2015.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Nitrogenase – A nucleotide-dependent molecular switch. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 235-264, 1994.

HUCKELHOVEN, R. Cell wall - Associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. In: (Ed.). **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.45, p.101-127, 2007.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 197-209, 2000.

JAMES, E. K. et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1998.

JAMES, E. K. et al. Herbaspirillum, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 308, p. 785-797, Mar 1997.

JINDO, K. et al. Phosphorus speciation and high-affinity transporters are influenced by humic substances. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 179, n. 2, p. 206-214, 2016.

- JIRAK-PETERSON, J. C.; ESKER, P. D. Tillage, Crop Rotation, and Hybrid Effects on Residue and Corn Anthracnose Occurrence in Wisconsin. **Plant Disease**, v. 95, n. 5, p. 601-610, 2011.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.
- KIM, S. E. et al. Qualitative and Quantitative Detection of Agricultural Microorganisms Expressing Iturin and Mop Cyclase in Soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12657-12663, 2010.
- KLASSEN, G. et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 887-891, 1997.
- KOVTUN, Y. et al. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 6, p. 2940-2945, 2000.
- KUTYAVIN, I. V. et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 2, p. 655-661, 2000.
- LATHA, P. et al. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 85-93, 2009.
- LAWRENCE, C. J. et al. MaizeGDB: The Maize Model Organism Database for Basic, Translational, and Applied Research. **International Journal of Plant Genomics**, 2008.
- LI, W. et al. Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 92, n. 1, p. 79-89, 2013.

LIPKA, V.; PANSTRUGA, R. Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 6, p. 625-631, 2005.

LIU, K. et al. Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 99, p. 8-13, 2016.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v. 85, n. 6, p. 695-698, 1995.

LIU, X. M.; ZHAO, H. X.; CHEN, S. F. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. **Current Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 186-190, 2006.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3, p. 606-618, 2011.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. In: (Ed.). **Annual Review of Microbiology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.63, p.541-556, 2009.

MACHADO, I. M. P. et al. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, p. 1599-1602, 1996.

MALHI, S. S. et al. Nitrogen fertilization management for no-till cereal production in the Canadian Great Plains: a review. **Soil & Tillage Research**, v. 60, n. 3-4, p. 101-122, 2001.

MARTENSSON, L. et al. Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. **Plant and Soil**, v. 325, n. 1-2, p. 207-218, 2009.

MARTIN-SANCHEZ, P. M. et al. Real-time PCR detection of *Ochroconis lascauxensis* involved in the formation of black stains in the

Lascaux Cave, France. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 478-484, 2013.

MARTINEZ-BALMORI, D. et al. Molecular characteristics of vermicompost and their relationship to preservation of inoculated nitrogen-fixing bacteria. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, p. 540-550, 2013.

_____. Molecular Characteristics of Humic Acids Isolated from Vermicomposts and Their Relationship to Bioactivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 47, p. 11412-11419, 2014.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **Fems Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MITTER, B. et al. Advances in Elucidating Beneficial Interactions Between Plants, Soil, and Bacteria. In: SPARKS, D. L. (Ed.). **Advances in Agronomy, Vol 121**. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v.121, p.381-445, 2013.

MONTEIRO, R. A. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.

_____. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 932-937, 2008.

MONTILLET, J. L. et al. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1516-1526, 2005.

MOREL, J. B.; DANGL, J. L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. **Cell Death and Differentiation**, v. 4, n. 8, p. 671-683, 1997.

MUENCHA, S. et al. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.

MURAKAMI, K. S.; DARST, S. A. Bacterial RNA polymerases: the whole story. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 1, p. 31-39, 2003.

MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 2, p. 97-104, 2004.

MÜNCH, S. et al. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.

NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, n. 4-5, p. 603-612, 2001.

NARDI, S. et al. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 1, p. 18-23, 2016.

NEWMAN, M. A. et al. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 14, 2013.

NICOLI, A. et al. *Colletotrichum graminicola* from leaves or stalks are similarly aggressive in cross-tissue inoculation of five maize hybrids. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 57-61, 2016.

NIU, D. D. et al. The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Simultaneously Activating Salicylate- and Jasmonate/Ethylene-Dependent Signaling Pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 5, p. 533-542, 2011.

_____. *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1- and SA-dependent signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 1, p. 120-125, 2016.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. **Fems Microbiology Letters**, v. 291, n. 2, p. 137-142, 2009.

NURNBERGER, T. et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 249-266, 2004.

NURNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 3, p. 335-345, 2005.

O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060-+, 2012.

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

_____. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

_____. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135, n. 4, p. 723-737, 1997.

OLIVEIRA, A. C. et al. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, v. 92, n. 10, p. 1048-1054, 2002.

PALAVERSIC, B. et al. Breeding maize for resistance to stalk anthracnose. **Maydica**, v. 54, n. 2-3, p. 229-232, 2009.

PANACCIONE, D. G.; VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**, v. 81, n. 6, p. 876-883, 1989.

PANKIEVICZ, V. C. S. et al. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907-919, 2015.

PARIONA-LLANOS, R. et al. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 6, p. 387-393, 2010.

PARK, J. W. et al. Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 246-257, 2013.

PATIL, S. V.; JAYAMOHAN, N. S.; KUMUDINI, B. S. Strategic assessment of multiple plant growth promotion traits for shortlisting of fluorescent *Pseudomonas* spp. and seed priming against ragi blast disease. **Plant Growth Regulation**, v. 80, n. 1, p. 47-58, 2016.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **Plos Genetics**, v. 7, n. 5, p. 10, 2011.

PENROSE, D. M.; GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 118, n. 1, p. 10-15, 2003.

PEREIRA, T. et al. Real-Time PCR Quantification of the Plant Growth Promoting Bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1 in Maize Roots. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 7, p. 660-670, 2014.

PEREZ-MONTANO, F. et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5-6, p. 325-336, 2014.

PERFECT, S. E.; GREEN, J. R. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 2, p. 101-108, 2001.

PETERS, J. W.; FISHER, K.; DEAN, D. R. Nitrogenase structure and function – A biochemical-genetic perspective. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 335-366, 1995.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 810-832, 2001.

PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. **Symbiosis**, v. 35, n. 1-3, p. 39-54, 2003.

PLANCHAMP, C.; GLAUSER, G.; MAUCH-MANI, B. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 10, 2015.

PRICE, E. P. et al. Development and Validation of *Burkholderia pseudomallei*-Specific Real-Time PCR Assays for Clinical, Environmental or Forensic Detection Applications. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 9, 2012.

RAAIJMAKERS, J. M. et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 341-361, 2009.

RAJ, S. N. et al. Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. **Biological Control**, v. 60, n. 2, p. 90-102, 2012.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 559-566, 2000.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. D. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 931-+, 2015.

RIBAUDO, C. M. et al. Effect of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation on maize nitrogen metabolism. **Maydica**, v. 51, n. 3-4, p. 481-485, 2006.

ROBERTSON, G. P.; VITOUSEK, P. M. Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 97-125, 2009.

RODRIGUEZ-BLANCO, A.; SICARDI, M.; FRIONI, L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 3, p. 391-402, 2015.

RODRIGUEZ-SALAZAR, J. et al. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. **Fems Microbiology Letters**, v. 296, n. 1, p. 52-59, 2009.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **Fems Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.

ROSCONI, F. et al. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 916-927, 2013.

_____. Serobactins-mediated iron acquisition systems optimize competitive fitness of *Herbaspirillum seropedicae* inside rice plants. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2523-2533, 2016.

ROSE, M. T. et al. A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances: Practical Implications for Agriculture. In: SPARKS, D. L. (Ed.). **Advances in Agronomy, Vol 124**. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v.124, p.37-89, 2014.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

SAHNI, S. et al. Vermicompost enhances performance of plant growth-promoting rhizobacteria in *Cicer arietinum* rhizosphere against *Sclerotium rolfsii*. **Crop Protection**, v. 27, n. 3-5, p. 369-376, 2008.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SANTOS, R. et al. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 1, p. 86-89, 2001.

SHAHZAD, S. M. et al. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 57, p. 27-34, Jul-Aug 2013.

SHIME-HATTORI, A. et al. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 915-924, 2011.

SILIPO, A. et al. A Unique Bicyclic Monosaccharide from the *Bradyrhizobium* Lipopolysaccharide and Its Role in the Molecular Interaction with Plants. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 50, n. 52, p. 12610-12612, 2011.

SIMPSON, F. B.; BURRIS, R. H. A nitrogen pressure of 50 Atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, n. 4653, p. 1095-1097, 1984.

SON, J. S. et al. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 1-8, 2014.

SONG, X. C. et al. Interaction matters: Synergy between vermicompost and PGPR agents improves soil quality, crop quality and crop yield in the field. **Applied Soil Ecology**, v. 89, p. 25-34, 2015.

STASKAWICZ, B. J. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 73-76, 2001.

STETS, M. I. et al. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 in wheat roots by strain-specific qPCR. **Appl Environ Microbiol**, 2015.

_____. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 167-174, 2013.

SU'UDI, M. et al. Quantification of Rice Blast Disease Progressions Through Taqman Real-Time PCR. **Molecular Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 43-48, 2013.

SUKNO, S. A. et al. Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 823-832, 2008.

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: The new view. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 23, p. 9009-9015, 2005.

TADRA-SFEIR, M. Z. et al. Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenin. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 8, 2015.

THOMA, I. et al. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. **Plant Journal**, v. 34, n. 3, p. 363-375, 2003.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 351-357, 2003.

TIMMUSK, S. et al. Detection and quantification of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wild barley (*Hordeum spontaneum*) with real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 736-745, 2009.

TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiol Plant**, v. 138, n. 4, p. 414-29, 2010.

TORRES, M. A.; JONES, J. D.; DANGL, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 373-8, 2006.

TORTORA, M. L.; DIAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275-286, 2011.

_____. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 279-290, 2012.

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, p. 9, 2009.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. 10, 2013.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN WEES, S. C. M. et al. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 15, p. 8711-8716, 2000.

VANPEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of Fusarium Wilt of Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. **Phytopathology**, v. 81, n. 7, p. 728-734, 1991.

VARGAS, L. et al. Drought Tolerance Conferred to Sugarcane by Association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: A Transcriptomic View of Hormone Pathways. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 37, 2014.

_____. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012.

VARGAS, W. A. et al. Plant Defense Mechanisms Are Activated during Biotrophic and Necrotrophic Development of *Colletotrichum graminicola* in Maize. **Plant Physiology**, v. 158, n. 3, p. 1342-1358, 2012.

VEJAN, P. et al. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 17, 2016.

VENARD, C.; VAILLANCOURT, L. Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. **Phytopathology**, v. 97, n. 4, p. 438-447, 2007a.

_____. Penetration and colonization of unwounded maize tissues by the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola* and the related nonpathogen *C. sublineolum*. **Mycologia**, v. 99, n. 3, p. 368-377, 2007b.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against red rot disease in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 1, n. 3, p. 67, 1999.

_____. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2002.

VON FELTEN, A.; DEFAGO, G.; MAURHOFER, M. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 108-115, 2010.

WEBER, O. B. et al. Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense on plantlets of banana 'Maca'. **Plant and Soil**, v. 298, n. 1-2, p. 47-56, 2007.

WEIHMANN, F. et al. Correspondence between symptom development of *Colletotrichum graminicola* and fungal biomass, quantified by a newly developed qPCR assay, depends on the maize variety. **Bmc Microbiology**, v. 16, p. 14, 2016.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. suppl 1, p. 487-511, 2001.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v. 322, p. 681-692, 1997.

YANG, Y. O.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in defense responses. **Genes & Development**, v. 11, n. 13, p. 1621-1639, 1997.

YASMIN, S. et al. Plant Growth Promotion and Suppression of Bacterial Leaf Blight in Rice by Inoculated Bacteria. **Plos One**, v. 11, n. 8, p. 19, 2016.

YASUDA, M. et al. Effects of Colonization of a Bacterial Endophyte, *Azospirillum* sp B510, on Disease Resistance in Rice. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2595-2599, 2009.

ZALLER, J. G. Vermicompost in seedling potting media can affect germination, biomass allocation, yields and fruit quality of three tomato varieties. **European Journal of Soil Biology**, v. 43, p. S332-S336, 2007.

ZAMIOUDIS, C. et al. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 304-318, 2013.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 281-289, 2006.

ZIPFEL, C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 1, p. 10-16, 2008.

ZIPFEL, C.; FELIX, G. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 353-360, 2005.