

VANESSA DE OLIVEIRA SCHREINER

IDENTIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS GENES ESTRUTURAIS DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, em Ciências-Bioquímica, Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientadora: Prof. Dra. Rose Adele Monteiro

**CURITIBA
2007**

**À minha família, principalmente a
minha MÃE Ana Glaci e ao Ricardo
pelo apoio, incentivo, dedicação,
paciência e carinho SEMPRE.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde para desenvolver este trabalho e por ter cruzado o caminho de pessoas tão queridas e competentes que tornaram meu trabalho muito mais fácil e prazeroso.

Ao meu orientador Emanuel Maltempi de Souza pela paciência, dedicação, compreensão, repreensão, pelas idéias, pelo apoio, direcionamento e pelo tempo enorme dedicado as atividades da minha dissertação. Você é um excelente profissional e porisso um admirável orientador.

A minha co orientadora Rose Adele pelo auxílio na bancada, pela paciência, pelas idéias, pelo incentivo.

A todos os amigos e aos funcionários do laboratório muito obrigada pelo companheirismo, apoio, incentivo, ajuda e atenção.

A todos os professores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio que me aceitaram com muito respeito e atenção.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A BACTÉRIA <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	1
1.2 DOENÇA DA ESTRIA-MOSQUEADA	1
1.3 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III.....	3
1.3.1 Estrutura do Sistema de Secreção do Tipo III.....	4
1.3.2 Translocação de Proteínas.....	7
1.4 ILHAS GENÔMICAS	9
1.4.1 Ilhas de Patogenicidade	9
1.4.1.2 Aquisição da ilha de patogenicidade	12
1.4.1.3 Regulação da expressão de genes da ilha de patogenicidade.....	13
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	15
3.3 MEIOS DE CULTURA	17
3.5 ENZIMAS	19
3.6 ARMAZENAGEM DAS BACTÉRIAS.....	20
3.7 PURIFICAÇÃO DE DNA	20
3.7.1 Purificação de DNA Plasmidial de <i>E. coli</i>	20
3.7.2 Purificação do DNA Genômico de <i>Herbaspirillum spp.</i>	20
3.7.3 Purificação do DNA de gel de agarose.....	21
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	21
3.8.1 Quantificação de DNA por espectrofotometria.....	21
3.9 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA	21
3.9.1 Eletroforese em gel de Agarose ou ágar	21
3.9.2 Digestão de DNA com endonucleases de restrição	22
3.10 HIBRIDIZAÇÃO DNA/DNA.....	22
3.10.1 Transferência do DNA genômico digerido do gel de agarose para membrana de náilon	22
3.10.2 Marcação da sonda com Fluoresceína-11-desóxi-Uridila-Tri- Fosfato (dUTP)	22
3.10.3 Pré-hibridização.....	23
3.10.4 Hibridização	23
3.11 Sequenciamento dos genes <i>hrp</i> , <i>hrc</i> e <i>pil</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i>	24
3.11.1 Inserção do Transposon EZ-Tn5™ <TET-1> <i>in vitro</i>	24
3.11.2 Preparo de células eletrocompetentes	24
3.11.2.1 Eletro-Transformação bacteriana	24
3.11.3 Sequenciamento do DNA plasmidial.....	25

3.12 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA.....	25
3.12.1 Montagem das seqüências consenso.....	25
3.12.2 Análise das Seqüências de DNA nos programas FRAMEPLOT, BLAST e CLUSTALW	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 IDENTIFICAÇÃO DO GENE <i>hrcV</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> POR HIBRIDIZAÇÃO	29
4.2 SEQUENCIAMENTO DOS GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO TRÊS DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	31
4.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DOS SEQUÊNCIA CONSENSO OBTIDOS	33
4.4 ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. seropedicae</i> e <i>H.</i> <i>rubrisubalbicans</i>	36
4.5 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS Hrp, Hrc, e Pil de <i>H. rubrisubalbicans</i>	39
5 CONCLUSÃO.....	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
APÊNDICE	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FATORES DE VIRULÊNCIA ENCONTRADOS EM ILHAS DE PATOGENICIDADE	10
TABELA 2 - ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS	15
TABELA 3 - LISTA DE PLASMÍDEOS UTILIZADOS	16
TABELA 4 - MONTAGEM DOS <i>contigs</i>	33
TABELA 5 - IDENTIDADE E SIMILARIDADE ENTRE PROTEÍNAS Hrp, Hrc e Pil DE <i>H. rubrisubalbicans</i> estirpe M1, <i>H. seropedicae</i> estirpe SMR1, <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Pseudomonas syringae pv syringae</i> e <i>Pseudomonas syringae pv tomato</i>	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	SINTOMAS TÍPICOS DA DOENÇA DA ESTRIA MOSQUEADA	2
FIGURA 2 -	ESTRUTURA DO FLAGELO E DOS INJECTISOMOS	5
FIGURA 3 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA GENERALIZADA DA ILHA DE PATOGENICIDADE	11
FIGURA 4 -	ESTÁGIOS DE EVOLUÇÃO DA ILHA DE PATOGENICIDADE	12
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA DA MONTAGEM DE CONTIGS UTILIZANDO O PACOTE PHRED/PHRAP/CONSED	27
FIGURA 6 -	HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> COM O GENE <i>hrcV</i>	30
FIGURA 7 -	ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE MUTANTES COM TRANSPOSON <i>EZ-Tn5TM <TET-1></i> <i>in vitro</i> E SEQUENCIAMENTO	32
FIGURA 8 -	COMPARAÇÃO DO AGRUPAMENTO <i>pil/hrc/hrp</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> e <i>H. seropedicae</i>	36
FIGURA 9 -	COMPARAÇÃO DO AGRUPAMENTO <i>pil/hrc/hrp</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Erwinia amylovora</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp ^R	=	resistente a ampicilina
atm	=	atmosferas, unidade de pressão
°C	=	graus Celsius
DNA	=	ácido desoxirribonucléico
D.O. ₆₀₀	=	densidade ótica a 600nm
EDTA	=	ácido etilenodiamino-tetra-acético
g	=	grama
h	=	horas
Hrc	=	conservado e resposta hipersensitiva
Hrp	=	patogenicidade e resposta hipersensitiva
Kb	=	kilobase, 1000 pares de base
kDa	=	kilo Daltons, 1000 daltons
L	=	litro
µg	=	micrograma
µL	=	microlitro
M	=	molar
min	=	minutos
mL	=	mililitros
mmol	=	milimol
µm	=	micrômetro
ng	=	nanograma
nm	=	nanômetros
ORF	=	“ open reading frame” fase aberta de leitura
pH	=	- log (concentração de íons H ₃ O ⁺)
p.I	=	ponto isoelétrico
pv.	=	pathovar
RNA	=	ácido ribonucléico
rpm	=	rotações por minuto
Sm ^R	=	resistente a estreptomicina
spp.	=	espécies
SSC	=	tampão-citrato-NaCl
TBE	=	tampão Tris-borato-EDTA
Tc ^R	=	resistente a tetraciclina
T _x E _y	=	tampão Tris-HCl x mM, EDTA ymM (pH 8,0)
Tris	=	tris (hidroximetil-aminometano)
tRNA	=	RNA transportador
U	=	unidade
UV	=	ultravioleta

RESUMO

Herbaspirillum rubrisubalbicans é uma β -Proteobacteria endofítica e diazotrófica. Este organismo é capaz de causar a doença da estria mosqueada na variedade de cana-de-açúcar B-4362 de Barbados. O sintoma típico da doença é o aparecimento de uma estria vermelha com fundo esbranquiçado, desde o ponto de inoculação até o topo das folhas de cana de açúcar. O sequenciamento parcial do genoma desta bactéria revelou a presença dos genes *pilN*, *pilO*, *hrcC*, *hrpE*, *hrcJ*, *hrcU*, *hrpX*, *hrpQ*, *hrcN*, *hrpO* e *hrcV*. Em bactérias fitopatogênicas, como *Pseudomonas syringae*, estes genes estão agrupados em regiões denominadas Ilhas de Patogenicidade e codificam para proteínas do Sistema de Secreção do Tipo Três (TTSS). Este sistema possibilita a translocação de proteínas efetoras da bactéria para o citoplasma da célula vegetal e as proteínas translocadas podem tanto inibir quanto ativar a resposta de defesa do hospedeiro. A identificação de genes *hrp/hrc/pil* no genoma do *Herbaspirillum rubrisubalbicans* sugere que o Sistema de Secreção do Tipo Três está envolvido no mecanismo de patogenicidade.

Palavras-chave: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, Ilha de Patogenicidade, Sistema de Secreção do Tipo Três.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A BACTÉRIA *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

Herbaspirillum rubrisubalbicans pertence ao gênero *Herbaspirillum* que faz parte da subclasse β das Proteobactérias. O nome da espécie deriva de *ruber*, vermelho, e *subalbicans*, esbranquiçado, ou seja, vermelho-esbranquiçado referindo-se aos sintomas da doença estria mosqueada provocada por este organismo em algumas variedades de cana-de-açúcar. O organismo aparece como bacilo curvo e móvel devido aos múltiplos flagelos em um dos pólos. A temperatura ótima de crescimento é 30°C, mas pode ser cultivado até 40°C, podendo crescer em meio semi-sólido livre de nitrogênio formando uma película em forma de véu, assim como o *Herbaspirillum seropedicae*. A atividade de nitrogenase e a capacidade de crescer diazotroficamente são similares as do *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI, *et al.*, 1996).

O diâmetro celular do *Herbaspirillum rubrisubalbicans* varia entre 0,6 e 0,7 μm e o comprimento celular médio entre 1,5 e 5 μm . Este organismo apresenta metabolismo microaeróbico típico e não fermenta açúcares. Ácidos orgânicos são as principais fontes de carbono para crescimento (BALDANI, *et al.*, 1996).

O *H. rubrisubalbicans* é considerado fitopatogênico, pois causa a doença da estria-mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar, desenvolvida para regiões onde são aplicados fertilizantes com altas concentrações de nitrogênio (BALDANI, *et al.*, 1996).

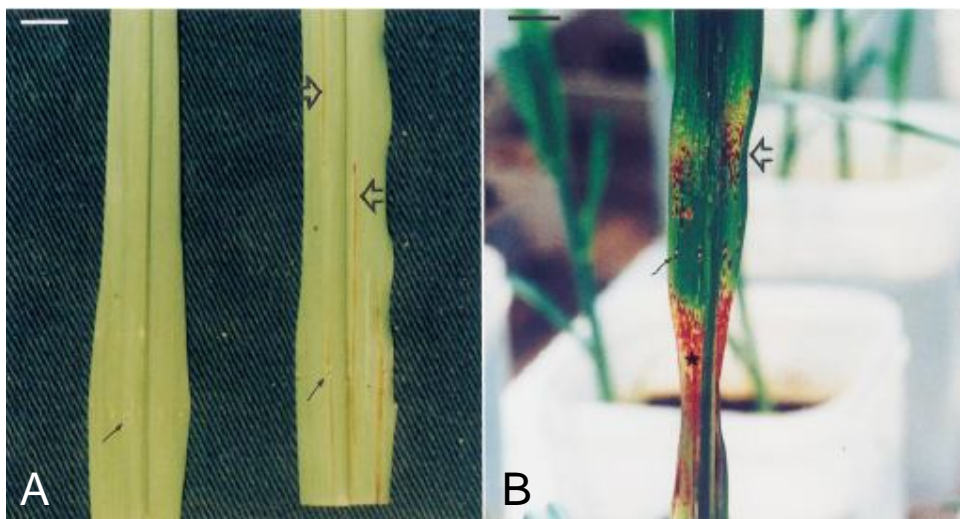
1.2 DOENÇA DA ESTRIA-MOSQUEADA

A doença da estria mosqueada, causada pelo *H. rubrisubalbicans*, foi descrita primeiramente no estado da Louisiana (EUA) em 1932 e é caracterizada pelo desenvolvimento de estrias vermelhas com manchas brancas nas folhas de cana-de-açúcar. É uma doença de pouca importância econômica e afeta somente algumas variedades de cana-de-açúcar (CHRISTOPHER & EDGERTON, 1932).

A variedade de cana-de-açúcar B-4362, de Barbados, é susceptível a esta doença (OLIVARES, *et al.*, 1997). A inoculação do *H. rubrisubalbicans* nesta variedade provoca sintomas típicos da doença. O ponto de inoculação torna-se vermelho e

necrótico (Figura 1a) e ao sétimo dia ocorre a formação de estrias vermelhas ao longo dos vasos perto do ponto de inoculação nas folhas, acompanhado de clorose (Figura 1a). Neste estágio a bactéria é encontrada preenchendo completamente o protoxilema e parcialmente o xilema da região com estrias vermelhas. No vigésimo dia a doença da estria mosqueada alcança o seu pico com a bactéria bloqueando os vasos do meta e protoxilema, e extensa necrose ao redor do ponto de inoculação (Figura 1b). A estria mosqueada aumenta desde o ponto de inoculação em direção ao topo da folha, à medida que a bactéria avança no interior dos vasos da folha (OLIVARES, *et al.*, 1997).

FIGURA 1 - SINTOMAS TÍPICOS DA DOENÇA DA ESTRIA MOSQUEADA



A) Ponto de inoculação necrótico após 1 dia de inoculação e estrias vermelhas após 7 dias de inoculação.

B) Necrose Tecidual após 21 dias de inoculação.

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

A extensa colonização bacteriana resulta na expansão dos espaços intercelulares e subsequente compressão das células do hospedeiro (OLIVARES, *et al.*, 1997). A planta hospedeira responde com produção de compostos fenólicos intercelulares e de goma, os quais restringem o crescimento bacteriano dentro dos vasos e confinam as bactérias em determinados locais do vaso, formando grandes colônias. Além disso, ocorre morte localizada de células da folha do hospedeiro, um processo denominado de Resposta Hipersensitiva (RH) (OLIVARES, *et al.*, 1997).

As células bacterianas multiplicam-se, preenchem os vasos e eventualmente escapam para dentro do mesófilo circundante. As bactérias também podem ser

encontradas no exterior dos estômatos, sugerindo que podem entrar nas folhas ou emergir do mesófilo via estômato para colonizar a superfície da folha. Esta doença não mata as plantas da variedade B-4362, mas reduz o tempo de vida das folhas em aproximadamente 75 dias (OLIVARES, *et al.*, 1997)

1.3 SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III

Várias espécies de bactérias gram-negativas que interagem patogenicamente ou simbioticamente com células eucarióticas, possuem um sistema de exportação de proteínas para o citoplasma da célula hospedeira. Este aparelho é chamado de Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) ou *injectisome*. (CORNELIS, *et al.*, 2006). Este sistema é responsável pela translocação de proteínas através de três membranas biológicas: a membrana bacteriana interna, a membrana bacteriana externa e a membrana plasmática do hospedeiro, inclusive a parede celular de células vegetais, sem processo proteolítico (GHOSH, 2004; BLOCKER, *et al.*, 2003). Através deste sistema é possível manipular as células hospedeiras durante a infecção pela translocação de proteínas bacterianas para o citoplasma das células hospedeiras (BLOCKER, *et al.*, 2003).

O SST3 foi identificado em muitos patógenos de animais, tais como *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* entero-hemorrágica e enteropatogênica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordatella* spp. e *Chlamydia* spp. Em algumas bactérias foram observados mais de um conjunto de genes codificando para SST3, por exemplo, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Yersinia pestis* e *Y. enterocolitica*. Em fitopatógenos do gênero *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* e *Pantoea* também foi identificado o SST3 (GHOSH, 2004).

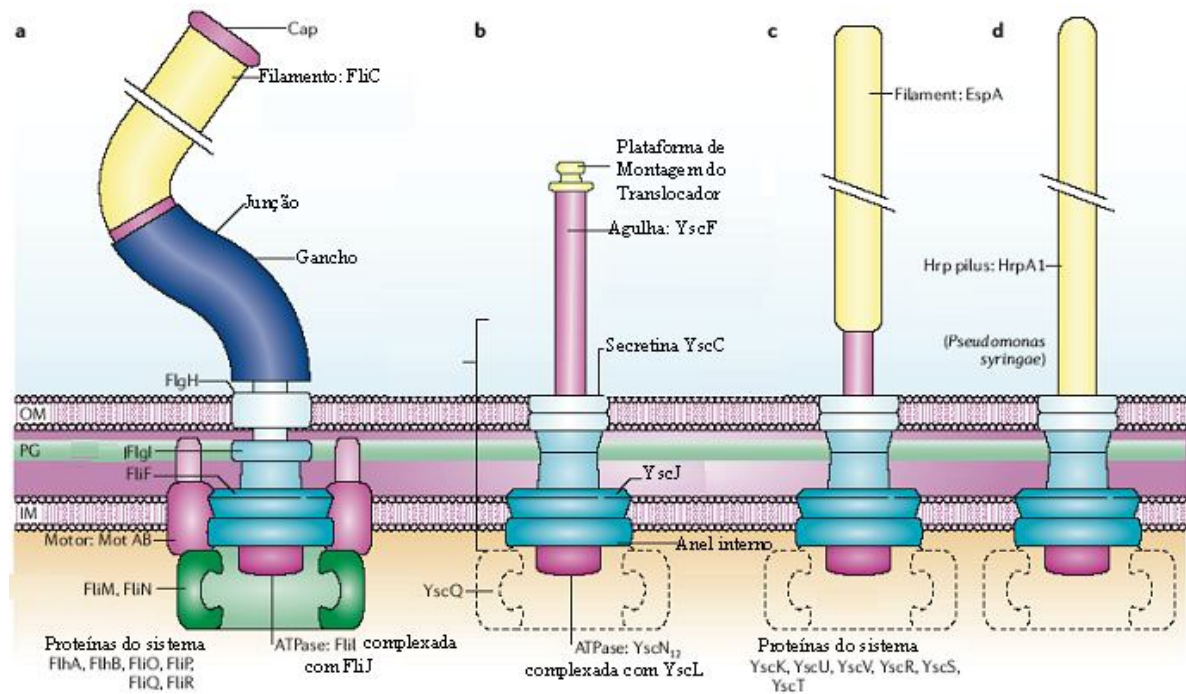
Aproximadamente 25 proteínas são necessárias para construção do sistema de secreção. As proteínas são codificadas pelos genes *hrp* e *hrc* (BOGDANOVE, *et al.*, 1996). As proteínas codificadas por estes genes formam uma via de passagem dos substratos através da parede celular bacteriana e têm seqüência de aminoácidos similares àquelas do corpo basal do aparato flagelar (AIZAWA, 2001). Isto sugere um compartilhamento da história evolucionária destes sistemas e, portanto, o SST3 e o aparato flagelar compartilham um mesmo ancestral (GOPHNA, RON, GRAUR, 2003).

1.3.1 Estrutura do Sistema de Secreção do Tipo III.

Os componentes extracelulares do aparelho de secreção do tipo III são variáveis devido à interação com as diferentes barreiras celulares do hospedeiro. Estes componentes são divididos em: fatores de estrutura superficial e fatores translocadores (formam um poro de entrega do SST3 na membrana plasmática hospedeira) (BUTTNER & BONAS, 2003).

A estrutura superficial do SST3 assemelha-se a uma agulha ou a um filamento nos patógenos de animais e a um *pilus* que se projeta da célula bacteriana em fitopatógenos (CORNELIS, *et al.*, 2006). O SST3 pode ser dividido em três partes: a estrutura basal, a agulha e o complexo de translocação. A estrutura basal e a agulha compõem o complexo da agulha que em uma estrutura cilíndrica com dois pares de anéis concêntricos que se estendem da membrana bacteriana interna à externa e unidos por uma haste protéica (FIGURA 2) (CORNELIS, *et al.*, 2006). Estas estruturas são muito semelhantes ao aparato flagelar (Figura 2a) (AIZAWA, 2001).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DO FLAGELO E DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO 3 DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS



FONTE: CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nature Reviews in Microbiology**. v . 4, p. 811-825, 2006.

A agulha (Figura 2b) é uma estrutura reta, rígida e oca, e muito menor que os flagelos. O comprimento da agulha em *Salmonella* chega 80nm (KUBORI, *et al.*, 1998), 45 nm em *Shigella* (TAMANO, *et al.*, 2000) e 58 nm em *Yersinia* (HOICZYK & BLOBEL, 2001). Em *Escherichia coli* foi observado uma variação da estrutura de agulha: um filamento na sua extremidade (Figura 2c). O filamento pode ter um comprimento de até 700 nm, mas comprimento médio foi de 40 a 140 nm (DANIELL, *et al.*, 2001). A estrutura homóloga dos fitopatógenos, denominada de *pilus* Hrp, é flexível com comprimento de até 2µm (Figura 2d), pois atravessa a espessa parede celular das células vegetais além da membrana citoplasmática (ROINE, *et al.*, 1997).

As proteínas da estrutura basal localizadas na membrana interna pertecem as famílias YscV, YscU e YscRST (proteínas HrcV, HrcU, HrcR, HrcS e HrcT, respectivamente, em fitopatógenos). As proteínas da família YscV e YscU apresentam domínio amino-terminal que hidrofóbico altamente conservado, localizado na membrana interna e um domínio carboxi-terminal localizado na face citoplasmática. Este domínio citoplasmático pode interagir com as proteínas efetoras no citoplasma e

atuar como receptor para reconhecimento do sinal de secreção (GOSH, 2004). Na membrana interna ainda encontra-se associada uma ATPase, a proteína HrcN, que fornece energia para o sistema de secreção através da hidrólise de ATP (POZIDIS, *et al.*, 2003). Outra atividade da ATPase InvC da *Salmonella enterica* é a separação das proteínas exportadas e chaperonas antes da translocação, processo dependente de ATP (AKEDA & GALAN, 2005).

As proteínas da estrutura basal localizadas no espaço periplasmático são membros da família YscJ (HrcJ em fitopatógenos), apresentam domínio C-terminal, que contém um sinal de parada de transferência e ancora este domínio na membrana interna, uma extensão de aproximadamente 200 resíduos periplasmáticos e uma cisteína N-terminal que sofre acilação, formando uma ponte de fixação da proteína à camada lipídica da membrana externa (ALLAOUI, SANSONETTI, PARSOT, 1992)

As proteínas da estrutura basal associadas à membrana bacteriana externa são membros da família das secretinas. Em *Yersinia* estas proteínas são denominadas YscC (BURGHOUT, *et al.*, 2004) e em fitopatógenos HrcC. Secretinas são capazes de formar poros na membrana externa e também são encontradas em outros sistemas de secreção, por exemplo, nos sistemas de secreção do tipo II e do tipo IV (CHAMI, *et al.*, 2005). Uma mutação na secretina HrcC de *P. syringae pv syringae* resulta no acúmulo de uma proteína ativadora da resposta hipersensitiva HrpZ, no periplasma, sugerindo que esta proteína está envolvida no transporte dos efetores através da membrana externa (CHARKOWSKI, HUANG, COLLMER, 1997).

O complexo de translocação está localizado na extremidade da agulha e é montado ao contato com a membrana da célula do hospedeiro, formando um poro na membrana plasmática eucariótica. Em geral, a formação deste complexo requer a interação de 3 proteínas (em *Yersinia* YopB, YopD e LcrV), YopB e YopD proteínas com domínio hidrofílicos e são secretadas pelo SST3; após sua secreção, são inseridas na camada bilipídica da membrana da célula hospedeira. A proteína LcrV apresenta domínio hidrofílico e está localizada no topo da agulha do sistema de secreção de *Yersinia* (SARKER, *et al.*, 1998). Após a formação do poro é possível a translocação das proteínas.

1.3.2 Translocação de Proteínas

Os substratos do SST3 são chamados de efetores devido às suas diversas funções, tais como reguladores da secreção, facilitadores da injeção de outros substratos e modificadores da estrutura e das funções de proteínas do hospedeiro (GREENBERG & VINATZER, 2003). Os efetores que atravessam a membrana via SST3 são chamados de Hop em *Pseudomonas* (ALFANO & COLLMER, 1997), Xop em *Xanthomonas* (NOEL, *et al.*, 2001) ou Pop em *Ralstonia* (ARLAT, *et al.*, 1994).

As proteínas efetoras contêm um sinal de secreção localizado aproximadamente nos primeiros 100 resíduos de aminoácidos (SCHECHTER, *et al.*, 2004; MUDGETT, *et al.*, 2000). Entretanto, este sinal de secreção não apresenta um padrão de seqüência facilmente reconhecido.

A translocação de efetores também pode depender da atividade de chaperonas específicas. Estas proteínas apresentam baixa similaridade entre si, mas possuem algumas características gerais comuns, tais como: são pequenas e acídicas ($pI < 6,0$), a região C-terminal é anfipática e os genes codificadores da chaperona e do efector alvo geralmente estão próximos (WATTIAU, WOESTYN, CORNELIS, 1996). Estas proteínas atuam no citoplasma para estabilizar ou prevenir a associação de efetores antes da translocação (PAGE & PARSOT, 2002), manter os efetores no estado não globular (STEBBINS & GALAN, 2001) ou, em alguns casos, para regular a secreção pelo SST3 (FRANCIS, WOLF-WATZ, FORSBERG, 2002). As chaperonas interagem com um domínio das proteínas efetoras alvo que constitui um segundo sinal de secreção (CHENG, ANDERSON, SCHNEEWIND, 1997), independente do sinal de secreção N-terminal (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997).

As chaperonas podem promover a translocação de um ou mais efetores. Por exemplo, em *Yersinia* a chaperona SycE promove a translocação de YopE, mas não de outros efetores (WATTIAU, *et al.*, 1994), enquanto que SycT é necessária para a translocação de YopT (IRIARTE & CORNELIS, 1998). Por outro lado, SycH promove o transporte de YopH (SMITH, *et al.*, 2001; WATTIAU, *et al.*, 1994) e de LcrQ (CAMBRONNE, CHENG, SCHNEEWIND, 2000).

Atualmente mais de 100 proteínas efetoras foram descobertas. Bactérias patogênicas animais pode secretar de 6 a mais de 20 diferentes proteínas efetoras. A interação dos efetores com proteínas da célula alvo pode levar a invasão de células não

fagocíticas, inibição da fagocitose, regulação negativa da resposta inflamatória, indução da apoptose ou modulação do tráfico intracelular (CORNELIS, *et al.*, 2006).

Em células de plantas, a ação das proteínas efetoras compreende desde a supressão da defesa do hospedeiro e até ativação de respostas de defesa do hospedeiro contra o fitopatógeno (ALFANO & COLLMER, 2004). Os efetores promovem o crescimento bacteriano no apoplasto (espaço intercelular) eliminando os mecanismos de defesa do hospedeiro e de liberação de nutrientes das células vegetais, e garantindo ao fitopatógeno capacidade de se defender dos mecanismos de defesa basal e da resposta hipersensitiva do hospedeiro. A resposta basal é disparada do lado de fora da célula da planta contra qualquer organismo, patogênico ou não, e moléculas microbianas associadas com patogenicidade (PAMPs) (NURNBERGER & BRUNNER, 2002), tais como lipopolissacarídeos (DOW, NEWMAN, VON ROEPENACK, 2000), flagelinas (GOMEZ-GOMEZ & BOLLER, 2002) e proteínas do choque térmico (FELIX & BOLLER, 2003). Este tipo de reação do vegetal leva a formação de um depósito de beta-1,3-glucana, chamado de calose na parede celular das células em contato com a bactéria, produção de espécies reativas de oxigênio e de compostos fenólicos e expressão de outros genes de defesa (JONES & TAKEMOTO, 2004).

Em fitopatógenos, as primeiras proteínas que tiveram a translocação pelo SST3 demonstrada foram as chamadas *hairpin proteins*, tais como a HrpN de *Erwinia* spp., HrpW de *Erwinia amylovora* (KIM & BEER, 1998) e *P. syringae* (CHARKOWSKI, 1998), HrpZ de *P. syringae* (STROBEL, *et al.*, 1996) e PopA de *Rasltonia solanacearum* (ARLAT, *et al.*, 1994). Estas proteínas são ricas em glicina, termoestáveis, ácidas e não contém cisteínas. Quando infiltradas nas folhas das plantas promovem uma resposta hipersensitiva (CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000)

As proteínas de avirulência representam outra classe das proteínas secretadas pelo SST3. São responsáveis pela especificidade patógeno-hospedeiro. As proteínas Avr podem interagir com proteínas de resistência do hospedeiro e ativar o mecanismo de defesa da planta. A resposta do vegetal hospedeiro resulta de uma interação “gene-gene” envolvendo a interação dos genes de avirulência (*avr*) da bactéria e de resistência (R) da planta (KEEN, 1990). O gene de resistência reconhece o gene secretado pelo fitopatógeno iniciando uma cascata de eventos que levam a ativação de uma via de transdução de sinal de defesa que limita o crescimento bacteriano, morte de células vegetais localizada, ou seja, uma resposta hipersensitiva (MARTIN, BOGDANOVE, SESSA, 2003).

Em *P. syringae pv tomato* DC300 o efetor AvrPtoB é capaz de suprimir a morte celular programada em plantas que não possuem o gene Pto de resistência. A proteína AvrPtoB possui um domínio N-terminal que promove a resposta hipersensitiva (RH) em plantas susceptíveis e um domínio C-terminal que suprime a RH disparada pelo domínio N-terminal. Este e outros efetores atuam como agentes duplos e as atividades de supressão ou ativação dependendo da complementação com as proteínas R do hospedeiro (ABRAMOVITCH, *et al.*, 2003).

Os genes *hrp/hrc* que codificam as proteínas do SST3 de bactérias estão agrupados em plasmídios (*Yersinia* spp., *Shigella flexneri* e *Ralstonia solanacearum*) ou localizados no genoma (*Salmonella tiphimurium*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia maylovora* e *Xanthomonas campestris*) em regiões com características diferenciadas do restante do genoma, chamadas de ilhas genômicas (HUECK, 1998).

1.4 ILHAS GENÔMICAS

A análise bioinformática mostra que os genomas bacterianos consistem de uma seqüência principal com conteúdo de G+C uniforme e freqüência homogênea de uso de códons. Esta região possui genes cujos produtos estão envolvidos em funções essenciais para o microrganismo. (HACKER & KAPER, 2000).

Além destas seqüências essenciais, existem regiões que diferem do restante do genoma tanto no conteúdo G+C quanto na freqüência de uso de códons, fato que sugere uma transferência gênica horizontal. Essas regiões que codificam funções acessórias fornecem vantagens ao microrganismo, tais como resistência a antibióticos e propriedades envolvendo simbiose ou patogenicidade (HACKER & KAPER, 2000). Estas regiões são denominadas de ilhas gênicas e são classificadas de acordo com as funções dos genes que possuem em Ilhas de Simbiose, Ilhas Metabólicas, Ilhas de Resistência ou Ilhas de Patogenicidade (GAL-MOR, & FINLAY, 2006; HACKER & KAPER, 2000).

1.4.1 Ilhas de Patogenicidade

As Ilhas de Patogenicidade ou PAI podem ser encontradas em microrganismos gram-negativos (*Helicobacter pylori*, diferentes estirpes de *E. coli*, *Salmonellas* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Citrobacter rodentium*, *Legionella pneumophila*, *P.*

aeruginosa, *P. syringae*, *Vibrio cholerae*, *Erwinia amylovora*, *Bacteroides fragilis* e *Porphyromonas gingivalis*), ou gram-positivos (*Listeria spp*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium difficile*), que podem ser patógenos humanos, animais ou vegetais (GAL-MOR, & FINLAY, 2006)

As ilhas de Patogenicidade possuem genes de virulência e ocupam regiões entre 10 a 100 Kb do DNA. Algumas estirpes possuem pequenos segmentos (1-10 Kb) de DNA na vizinhança da PAI chamadas de “ilhas de patogenicidade” (GAL-MOR, & FINLAY, 2006).

Os genes de virulência localizados próximos ou dentro das ilhas de patogenicidade podem ser divididos em grupos e os mais comuns estão listados na Tabela 1.

TABELA 1 - FATORES DE VIRULÊNCIA ENCONTRADOS EM ILHAS DE PATOGENICIDADE

Genes de Virulência	Microrganismos
Fatores de aderência	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas <i>E. coli</i> uropatogênicas <i>Vibrio cholerae</i> <i>Listeria spp.</i>
Toxinas	<i>E. coli</i> uropatogênica <i>Staphylococcus aureus</i>
Sistemas de captação de ferro	<i>E. coli</i> uropatogênica <i>Shigella flexneri</i> <i>Yersinia spp.</i>
Invasão, modulinas, efetores	<i>E. coli</i> enteropatogênicas <i>Salmonella spp.</i> <i>Shigella spp.</i> <i>Listeria spp.</i>
Sistema de secreção do tipo III	<i>E. coli</i> enteropatogênicas <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Erwinia spp.</i> <i>Yersinia spp.</i> <i>Salmonella spp.</i> <i>Shigella spp.</i>
Sistema de secreção do tipo IV	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

FONTE: HACKER, J.; KAPER, J. Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. **Annual Review in Microbiology**. v.54, p. 641-679, 2000.

Além de possuírem conteúdo de G+C e freqüência do uso de códons diferentes do resto do genoma, as Ilhas de Patogenicidade são flanqueadas em um dos lados por genes de tRNA para asparagina e por seqüências repetidas diretas (DR) e elementos de

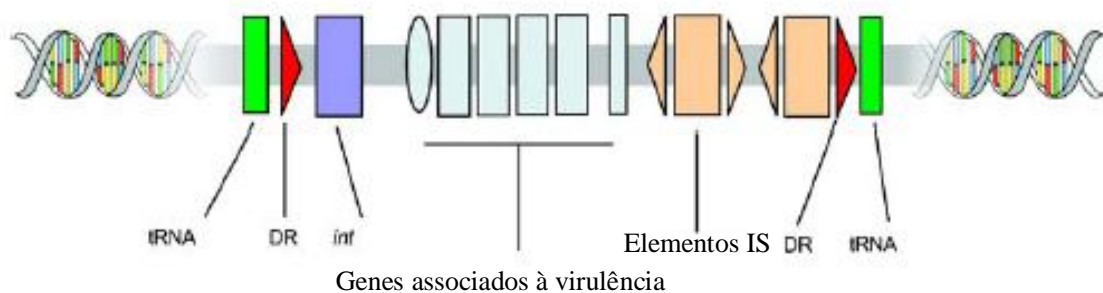
inserção (IS) (GAL-MOR & FINLAY, 2006). Presumivelmente, os genes de tRNA's para asparagina são os pontos de inserção de DNA externo, pois os nucleotídeos finais 3' do tRNA são idênticos aos nucleotídeos do sítio de inserção de DNA de bacteriófagos, permitindo portanto a integração de DNA plasmidial e viral (REITER, *et al.*, 1989). No caso do gênero *Yersinia* a ilha pode estar integrada em qualquer uma das três cópias do gene de tRNA para asparagina (CARNIEL, *et al.*, 1996).

As seqüências repetitivas diretas (DR) flanqueiam as ilhas de patogenicidade e são seqüências entre 16 a 20 pares de base homólogas aos sítios de inserção de bacteriófagos, portanto atuam como sítios de reconhecimento para enzimas envolvidas na excisão dos elementos genéticos móveis e contribuem para instabilidade genômica da ilha. Estas seqüências são geradas durante a integração do DNA externo no genoma do hospedeiro via recombinação sítio específica, resultando na duplicação da seqüência (HACKER, *et al.*, 1997).

Os elementos de inserção (IS) são pequenos elementos genéticos móveis capazes de transposição inter e intra genomas, fornecem seqüências invertidas repetidas, onde pode ocorrer recombinação homóloga e, portanto pode mediar a incorporação de elementos genéticos móveis dentro do genoma e contribuir para a instabilidade ou excisão da ilha de patogenicidade (HACKER, *et al.*, 1997).

Genes que codificam fatores envolvidos na mobilidade genética, tal como integrases (*int*), transposases, genes de fagos e origens de replicação podem estar presentes em uma Ilha de Patogenicidade (GAL-MOR. & BRETT, 2006). Os componentes de uma ilha de patogenicidade estão representados na figura 3.

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA GENERALIZADA DA ILHA DE PATOGENICIDADE

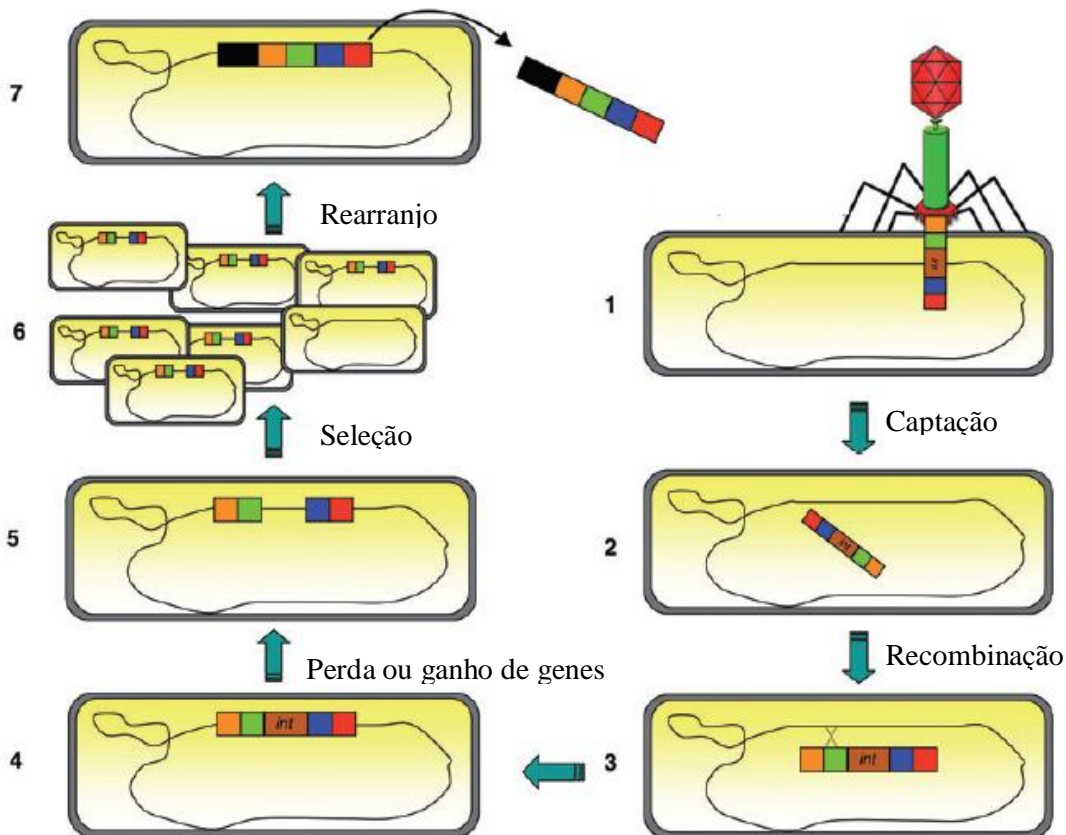


FONTE: BINNEWIES, T. T. *et al.* Ten years of bacterial genome sequencing: comparative- genomics-based discoveries. **Functional and Integrative Genomics**. v.6, p.165–185, 2006.

1.4.1.2 Aquisição da ilha de patogenicidade

A aquisição da PAI envolve cinco passos (HACKER & CARNIEL, 2001), os quais estão representados na figura 4: 1) aquisição dos genes de virulência por transferência horizontal; 2) integração do DNA externo no genoma (ou plasmídeo) hospedeiro por recombinação sítio específica mediada por uma integrase ou recombinase ou outros mecanismos. Este evento pode ocorrer múltiplas vezes, envolvendo genes de diferentes organismos e resultando em uma ilha com estrutura de mosaico; 3) o elemento genético móvel pode promover rearranjos genéticos tais como perda ou aquisição de genes; 4) expressão dos genes adquiridos e contribuição para o desempenho bacteriano (por exemplo, patogenicidade), o que favorece a seleção positiva destas variantes; 5) recombinações consecutivas e eventos de excisão e inserção resultando em perda ou ganho de informações genéticas.

FIGURA 4 - ESTÁGIOS DE EVOLUÇÃO DA ILHA DE PATOGENICIDADE



FONTE: GAL-MOR, O., BRETT F. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**. v. 8,. n.11, p.1707–1719, 2006.

1.4.1.3 Regulação da expressão de genes da ilha de patogenicidade

Os genes que codificam reguladores de genes de virulência estão localizados dentro ou fora da ilha. Os reguladores em organismos patogênicos podem controlar a expressão de fatores de virulência e de outras proteínas reguladoras. As duas principais classes de reguladores são as proteínas da família AraC e reguladores do sistemas de dois componentes. Outras classes de reguladores incluem fatores sigmas alternativos e proteínas semelhantes a histonas (HACKER & KAPER, 2000). Sinais ambientais como pH, osmolaridade, oxigênio, concentração de Mg^{++} (GALAN & COLLMER, 1999; COTTER & MILLER, 1998), temperatura (CORNELIS & WOLF-WATZ, 1997) e sensoriamento populacional em estirpes de *E. coli* (SPERANDIO, *et al.*, 1999) controlam a atividade dos reguladores dos genes das PAI.

Em *P. syringae* um fator sigma alternativo está envolvido na regulação do grupo de genes *hrp/hrc* (XIAO, *et al.*, 1994). Este grupo de genes está localizado numa PAI e codifica o sistema de secreção do tipo III que é regulado por quatro proteínas codificadas por genes da própria ilha. A proteína HrpL é um fator sigma alternativo que é essencial para a transcrição de todos os genes do regulon exceto *hrpR*, *hrpS* e *hrpL* (XIAO, *et al.*, 1994). O fator sigma HrpL é similar ao σ^{28} , que controla o expressão dos genes envolvidos na biossíntese flagelar. A transcrição de *hrpL* é dependente do fator sigma σ^{54} e é positivamente regulado pelas proteínas HrpR e HrpS. Estas proteínas constituem um sistema de dois componentes (HACKER & KAPER, 2000).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo a identificação e seqüenciamento dos genes de *H. rubrisubalbicans* estirpe M1 relacionados com o sistema de secreção do tipo 3. Parte destes genes provavelmente faz parte de uma ilha de patogenicidade e sua caracterização estrutural é o primeiro passo para compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da relação patogênica desta bactéria com plantas hospedeiras.

Este trabalho faz parte do projeto de Seqüenciamento Genômico do *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Projeto CNPq 50.6421/2004-0).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados estão listados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

TABELA 2 - ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS

<i>H. seropedicae</i>		
Estirpes	Genótipo/Fenótipo	Referência/Fonte
SmR1	Derivada da estirpe Z78, estirpe selvagem Sm ^R Nif ⁺	SOUZA, <i>et al.</i> , 1995
ZM152	Estirpe selvagem	BALDANI, <i>et al.</i> , 1986
ZA95	Estirpe selvagem	BALDANI, <i>et al.</i> , 1986
HRC54	Estirpe selvagem	EMBRAPA
<i>H. rubrisubalbicans</i>		
Estirpes	Genótipo/Fenótipo	Referência/Fonte
M1	Estirpe selvagem	EMBRAPA
HCC103	Estirpe selvagem	EMBRAPA
<i>Escherichia coli</i>		
Estirpes	Genótipo/Fenótipo	Referência/Fonte
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	INVITROGEN

TABELA 3 - LISTA DE PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Referência/Fonte
pUC18/19	Amp ^R lacZα ⁺	INVITROGEN
HR03-FP-00-000-003-A06.TET HR03-FP-00-000-008-H07. TET HR03-FP-00-000-010-H02.TET	Amp ^R , Tc ^R . pUC19 .Clones da montagem 19/08/2006 que contem seqüência parcial do gene <i>pilN</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i>	Este trabalho
HR03-MF-00-000-052-H10.TET	Amp ^R , Tc ^R . pUC19 .Clone da montagem 19/08/2006 que contém seqüência parcial do gene <i>hrcC</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> .	Este trabalho
HR02-FP-00-000-009-C05.TET HR02-MF-00-000-057-H09.TET	Amp ^R , Tc ^R . pUC19 .Clones da montagem 19/08/2006 que contém a seqüência parcial do gene <i>hrcJ</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> .	Este trabalho
HR03-MF-00-000-049-A08.TET	Amp ^R , Tc ^R . pUC19 .Clone da montagem 19/08/2006 que contém a seqüência parcial dos genes <i>hrcT</i> , <i>hrcX</i> e <i>hrcU</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> .	Este trabalho
HR02-MF-00-000-052-H11.TET HR02-MF-00-000-052-A02.TET	Amp ^R , Tc ^R . pUC19 .Clones da montagem 19/08/2006 que contém seqüência parcial do gene <i>hrcU</i> .	Este trabalho
HR03-FP-00-000-013-B07.TET HR02-MF-00-000-053-F11.TET	Amp ^R , Tc ^R . pUC19 .Clones da montagem 19/08/2006 que contém seqüência parcial do gene <i>hrpQ</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> .	Este trabalho
HS09-MH-00-000-059-E07	Amp ^R , pUC18 contendo gene <i>hrcV</i> de <i>H. seropedicae</i>	nfn.genopar.org

Os plasmídeos selecionados do Programa GENOPAR foram nomeados baseados na nomenclatura do plasmídeo de origem acrescida das letras TET, pois foram obtidos pós reação de transposição com transposon *EZ-Tn5*TM <*TET-1*> conforme descrito no item 3.11.2. O plasmídeo HS09-MH-00-000-059-E07 foi utilizado como sonda para hibridização DNA-DNA conforme descrito no item 3.10.

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* foram cultivadas em meio NFbHP-malato (KLASSEN, *et al.*, 1997). No momento do uso, o meio foi suplementado com 20 mmol/L cloreto de amônio e 50 mL/L da mistura de fosfatos (K_2HPO_4 17,8 g/L e KH_2PO_4 159,5 g/L), fornecendo pH final de 6,0. O meio NFbHP contendo íons amônio foi denominado NFbHPN. As culturas foram crescidas sob agitação (120 rpm) a 30°C por 18 a 24h.

A estirpe TOP10 de *E. coli* foi cultivada em meios líquidos *Terrific Broth* (TARTOF & HOBBS, 1987), Luria-Bertani Broth (LB), SOC ou SOB (SAMBROOK, *et al.*, 1989). O meio sólido foi utilizado o meio Luria-Bertani Agar (LA) (SAMBROOK, *et al.*, 1989).

3.3 MEIOS DE CULTURA

Composição do meio NFbHP-malato (KLASSEN, *et al.*, 1997) é a seguinte:

	Gramas/litro
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	2,0 X 10 ⁻²
Ácido nitrilo triacético	5,6 X 10 ⁻²
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 X 10 ⁻²
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴
Ácido málico	5,0
Solução de Oligoelementos	10 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Solução de Oligoelementos	Gramas/litro
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	1
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175
H ₃ BO ₃	1,4
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,12

Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 min a 1 atm. Para o preparo de NFbHP sólido acrescentou-se ao meio 15 g/L de ágar.

Composição do meio *Terrific Broth* (TARTOF & HOBBS, 1987) é a seguinte:

	Gramas/litro
Bacto triptona	12
Extrato de levedura	24
K ₂ HPO ₄	12,54
KH ₂ PO ₄	2,32
Glicerol	4 mL
Água q.s.p.	1000 mL

Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 min a 1 atmosfera.

Composição do meio LB (SAMBROOK, *et al.*, 1989) é a seguinte:

	Gramas/litro
Extrato de levedura	5
Triptona	10
NaCl	10
Água q.s.p.	1000 mL

O meio LA tem a mesma composição do meio LB, mas é acrescido de 15g/L de ágar.

Composição do meio SOB (SAMBROOK, *et al.*, 1989)

	Gramas/litro
Triptona	20
Extrato de levedura	5
NaCl	0,5
KCl	0,186
Água q.s.p	1000mL

Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 min a 1 atm.

Composição do meio SOC, conforme manual do eletroporador Cell-porator 1600 (Gibco BRL), é a seguinte:

	Gramas/litro
Triptona	20
Extrato de levedura	5
NaCl	0,5
KCl	0,186
MgCl ₂	0,95
MgSO ₄	1,2
Glucose	3,6
Água q.s.p	1000mL

Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 min a 1 atm.

3.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados e as respectivas concentrações para seleção de transformantes da estirpe TOP10 de *E. coli* foram: ampicilina (Amp), 200µg/mL e tetraciclina (Tc), 10µg/mL. Para seleção das estirpes do *Herbaspirillum seropedicae* foi utilizado estreptomomicina 80 µg/mL.

Ampicilina e a estreptomomicina foram preparadas com água ultra-pura grau reagente Tipo I, esterilizadas por filtração (filtro Millipore 0,22 µm) e estocadas a -20°C. A tetraciclina foi preparada em etanol 96% e também estocada a -20° C.

3.5 ENZIMAS

A enzima pronase foi preparada com água ultrapura numa concentração de 20mg/ml, incubada por 1h a 37°C, alíquotada e armazenado a -20°C.

A RNase foi preparada numa concentração de 10mg/mL em acetato de sódio 0,01 mol/L (pH5,2). A solução foi aquecida a 100°C por 15 minutos e em seguida resfriada a temperatura ambiente. O pH foi ajustado com a adição de 0,1 volume de Tris-HCl (pH 7,5) (SAMBROOK, *et al.*, 1989).

3.6 ARMAZENAGEM DAS BACTÉRIAS

Para armazenagem das estirpes de *E. coli*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* 1,5 mL de cultura em meio líquido em tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foi centrifugado e o sedimento de células foi ressuspensão em 1 mL de glicerol 50%. A suspensão de células foi então armazenada a -20°C.

3.7 PURIFICAÇÃO DE DNA

3.7.1 Purificação de DNA Plasmidial de *E. coli*

A purificação dos plasmídeos citados na Tabela 3 foi realizada utilizando o método de lise alcalina modificado daquele descrito por SAMBROOK (1989).

As colônias transformantes da estirpe TOP10 de *E. coli* foram cultivadas a 37°C sob agitação durante a noite em meio LB ou *Terrific-Broth* contendo os antibióticos necessários. As células foram coletadas por centrifugação de 13.000 rpm por 1 minuto, ressuspensas em 150 µL da solução GET (Tris-HCl 25 mmol/L pH 8,0; glucose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L) e lisadas com 150 µL da solução contendo NaOH 0,2 mmol/L e SDS 1% (p/v). Após homogeneização foi adicionado 150 µL da solução Kacf (acetato de potássio 3 mol/L e ácido fórmico 1,8 mol/L, pH 4,8) e o sistema foi mantido no gelo por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionada RNase 10µg/mL e a amostra foi incubada em estufa a 37°C Em seguida foi adicionado 50µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação por 30 min a 13.000 rpm, a fase aquosa foi removida e o DNA precipitado com 2 volumes de etanol absoluto por centrifugação por 10 min a 13.000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em água ultra pura grau reagente Tipo I.

3.7.2 Purificação do DNA Genômico de *Herbaspirillum* spp.

A extração do DNA genômico de *Herbaspirillum* foi realizada por procedimento modificado daquele descrito por SOUZA (1990).

O DNA genômico das estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* foi purificado a partir de uma cultura (D.O.₆₀₀ \cong 2,0) crescida em meio NFbHPN contendo os antibióticos necessários. Uma alíquota de 1,5mL da cultura foi centrifugada por 1 min a 13.000 rpm. As células foram ressuspensas em 500 µL de tampão GET (Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glucose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L) contendo 1% de SDS e incubadas a 30 °C. Pronase foi

adicionada (200 µg/mL concentração final) e a mistura incubada a 37°C por 24 horas. As proteínas restantes foram removidas por extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) seguida de extração com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O DNA foi então precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 80%, seco a vácuo e solubilizado em água ultra pura grau reagente Tipo I.

3.7.3 Purificação do DNA de gel de agarose

Após eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), lavado em água destilada e as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV (312nm) e as imagens registradas com um sistema de fotodocumentação Biochemi (UVP). A banda de interesse foi retirada do gel e colocada em um tubo plástico de 1,5 mL. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit QUIAQuick Gel Extration Kit (QUIAGEN).

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.8.1 Quantificação de DNA por espectrofotometria

A concentração de ácido nucléico foi determinada espectrofotometricamente empregando a seguinte relação: uma solução contendo de 50 µg/mL de DNA dupla fita possui absorvância a 260nm igual a 1 (SAMBROOK, *et al.*, 1989). As preparações de DNA foram consideradas puras quando a razão da absorvância a 260nm pela absorvância 280 nm foi igual a 1,8-2,0.

3.9 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA

3.9.1 Eletroforese em gel de Agarose ou ágar

Os géis foram feitos com ágar (1%) ou agarose (0,7-1%) em tampão TBE 1X (Tris-base 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8,0) em sistema horizontal Hoeffler. O tampão de aplicação FSUDS (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, Ficoll® 20% em T₁₀E₁) foi adicionado às amostras de DNA na proporção de 1:5 (FSUDS: amostra) antes

da aplicação no gel. As corridas eletroforéticas foram realizada com voltagem e tempo variáveis.

O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e lavado em água destilada. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV (312 nm) acoplado a um sistema de fotodocumentação Biochemi (UVP). O marcador de tamanho molecular utilizado foi 1Kb.

3.9.2 Digestão de DNA com endonucleases de restrição

A digestão de DNA com endonucleases foi realizada conforme as condições especificadas pelo fabricante.

3.10 HIBRIDIZAÇÃO DNA/DNA

3.10.1 Transferência do DNA genômico digerido do gel de agarose para membrana de náilon

O DNA genômico das estirpes SMR1, ZM152, ZA95 e HRC54 de *H. seropedicae* e M1 e HCC103 de *H. rubrisubalbicans* foi digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI*, *BglII* e *PstI*. Os fragmentos de DNA resultantes da digestão enzimática foram separados por eletroforese em gel de agarose. O DNA do gel de agarose foi transferido por vácuo para membrana de náilon HybondTMN⁺ (GE Health Care) utilizando o sistema Vacuum Blot (GE Health Care). Inicialmente o gel foi tratado com solução de depurinização (HCL 0,25 mmol/L) por 5 minutos, seguido pela solução de desnaturação (NaCl 1,5 mmol/L, NaOH 0,5 mol/L) e em seguida o gel foi tratado com solução de neutralização (Tris-HCl pH 7,5, NaCl 1,5mol/L) por 10 minutos. Por fim aplicou-se a solução de transferência (NaCl 3 mol/L, citrato trissódico 0,3mol/L pH 7,0 por 1 hora.

A membrana foi seca a temperatura ambiente e o DNA foi fixado através da exposição à luz ultravioleta (312nm) durante 4 minutos.

3.10.2 Marcação da sonda com Fluoresceína-11-desóxi-Uridila-Tri-Fosfato (dUTP)

O plasmídeo contendo os genes *hrcV* de *H. seropedicae* estirpe SMR1 (<http://nfn.genopar.org>) foi digerido com a enzimas de restrição *PstI* para liberação do inserto.

O fragmento de DNA foi extraído e purificado do gel de agarose, após eletroforese, conforme item 3.7.3. Em seguida foi determinada a concentração do DNA purificado por densitometria utilizando o transiluminador UVP.

O fragmento de DNA foi marcado utilizando o *Kit Gene ImagesTM Random Prime* (GE Health Care). Cerca de 50 ng de DNA foi desnaturado em banho-maria fervente (5 minutos) em um volume final de 20µL. O DNA foi colocado em banho de gelo e foram adicionados 5µL da mistura de nucleotídeos, 2,5µL de oligonucleotídeos com seqüências aleatórias, 1µL de enzima Klenow (5U/µL) e água para um volume final de 50µL. A mistura foi homogeneizada, centrifugada rapidamente e incubada a 37°C por 1h.

3.10.3 Pré-hibridização

A membrana de náilon contendo o DNA genômico foi incubada em tampão de pré hibridização (SSC 5x, líquido de bloqueio diluído 20x e SDS 0,1%) 60°C por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 20 ng de DNA de timo e incubou-se por mais 30 minutos.

3.10.4 Hibridização

A sonda de DNA preparada conforme item 3.10.2 foi adicionada ao tampão de pré-hibridização e o sistema foi incubado sob agitação a 60°C durante 24 horas.

Para detecção de hibridização foi utilizando o kit de detecção Gene-Images CDP-Star (GE Health Care). Após hibridização a membrana foi incubada com uma solução de bloqueio (líquido de bloqueio diluído 10x em tampão A (100 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl (pH 9,5)) à temperatura ambiente por 1h. Posteriormente, a membrana foi incubada com tampão A (100 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl pH 9,5) contendo 0,5% de albumina bovina e anticorpo anti-fluoresceína-conjugado com fosfatase alcalina (diluído 500 vezes), e incubada sob agitação a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida a membrana foi lavada 3 vezes com tampão A contendo TweenTM 20 0,3% por 10 minutos sob agitação a temperatura ambiente. O excesso de tampão de lavagem foi removido, o reativo de revelação de fosfatase alcalina foi adicionado e as bandas de hibridização DNA/DNA foram visualizadas com o sistema de fotodocumentação Biochemi (UVP).

3.11 Sequenciamento dos genes *hrp*, *hrc* e *pil* de *H. rubrisubalbicans*

Os plasmídeos selecionados do projeto de sequenciamento genômico de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (<http://aramis.genopar.org/bacteria/HR>) foram mutagenizados por inserção aleatória *in vitro* do transposon *EZ-Tn5*TM <*TET-1*> utilizando-se um kit de inserção EPICENTRE. Os produtos de inserção podem ser sequenciados utilizando oligonucleotídeos iniciadores que hibridizam com as extremidades do transposon.

3.11.1 Inserção do Transposon *EZ-Tn5*TM <*TET-1*> *in vitro*

A reação de inserção foi realizada como descrito pelo fabricante do Kit de Inserção *EZ-Tn5*TM <*TET-1*> (EPICENTRE). O produto de reação foi eletro-transformado em *E. coli* estirpe TOP10.

3.11.2 Preparo de células eletrocompetentes

A estirpe TOP10 de *E. coli* foi cultivada em 200 mL de meio SOB até D.O₆₀₀ de 0,6-0,8. Em seguida a suspensão de células foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C em centrífuga *Eppendorf 5804R*, rotor A-4-44 (*Eppendorf*). O precipitado de células foi lavado 3 vezes com glicerol 10% gelado e, ao final, ressuspensão em 100µL da mesma solução.

3.11.2.1 Eletro-Transformação bacteriana

Alíquotas de 40µL de células eletrocompetentes foram misturadas com 1 µL do sistema de transposição. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação *BioRad* de 0,2 cm previamente resfriada. As amostras foram submetidas a um choque elétrico de 2,5kV utilizando-se o aparelho *Gene Pulser II (BioRad)*. As células de *Escherichia coli* foram recuperadas em 1mL de meio SOC por 30 minutos sob agitação a 37°C. Após este período as culturas foram plaqueadas em meio sólido LA contendo os antibióticos ampicilina 250 µg/mL e tetraciclina 10 µg/mL. Em seguida, as placas foram incubadas na estufa a 37°C por 16 horas.

3.11.3 Seqüenciamento do DNA plasmidial

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando 100-400 ng de DNA fita dupla purificado, 3,25 pmol de oligonucleotídeo iniciador, 3 µL de reativo *ET terminator mix* (GE HealthCare) e água ultra pura grau reagente tipo I suficiente para 7,5 µL. A reação de seqüenciamento foi conduzida em termociclador *Eppendorf Master Cycler Gradient 5331* com as seguintes condições: aquecimento a 95°C por 1 minuto, seguido por 34 ciclos de 94°C por 20 segundos e 62°C por 2 minutos.

O produto de reação foi purificado adicionando a cada amostra 12,5µL de água ultra pura grau reagente tipo I, 2 µL de acetato de amônio 7,5M e 2 volumes de etanol 96%, seguido de centrifugação por 30 minutos. O precipitado foi lavado com 150µL e etanol 70%, centrifugado por mais 15 minutos e seco a vácuo. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático ABI377 (*Applied Biosystem*).

3.12 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA

3.12.1 Montagem das seqüências consenso

Os eletroforetogramas obtidos das reações de seqüenciamento com os oligonucleotídeos iniciadores das extremidades do transposon *EZ-Tn5TM <TET-1>* foram processados pelo programa Phred (EWING, *et al.*, 1998^a; EWING, *et al.*, 1998b). Este programa faz a identificação das bases nucleotídicas levando em conta a intensidade do sinal, espaçamento entre picos e o espectro de emissão de cada fluoróforo. Também atribui qualidade a cada base da seqüência. Em seguida, o programa Cross_Match (desenvolvido por Phil Green) realiza o alinhamento das seqüências no formato FASTA com a seqüências do arquivo do vetor vector.seq que mascara as seqüências do vetor, trocando o nucleotídeo pela letra X. As seqüência filtradas pelo programa Cross_Match são utilizadas no programa CAP3 para montagem das seqüências consenso.

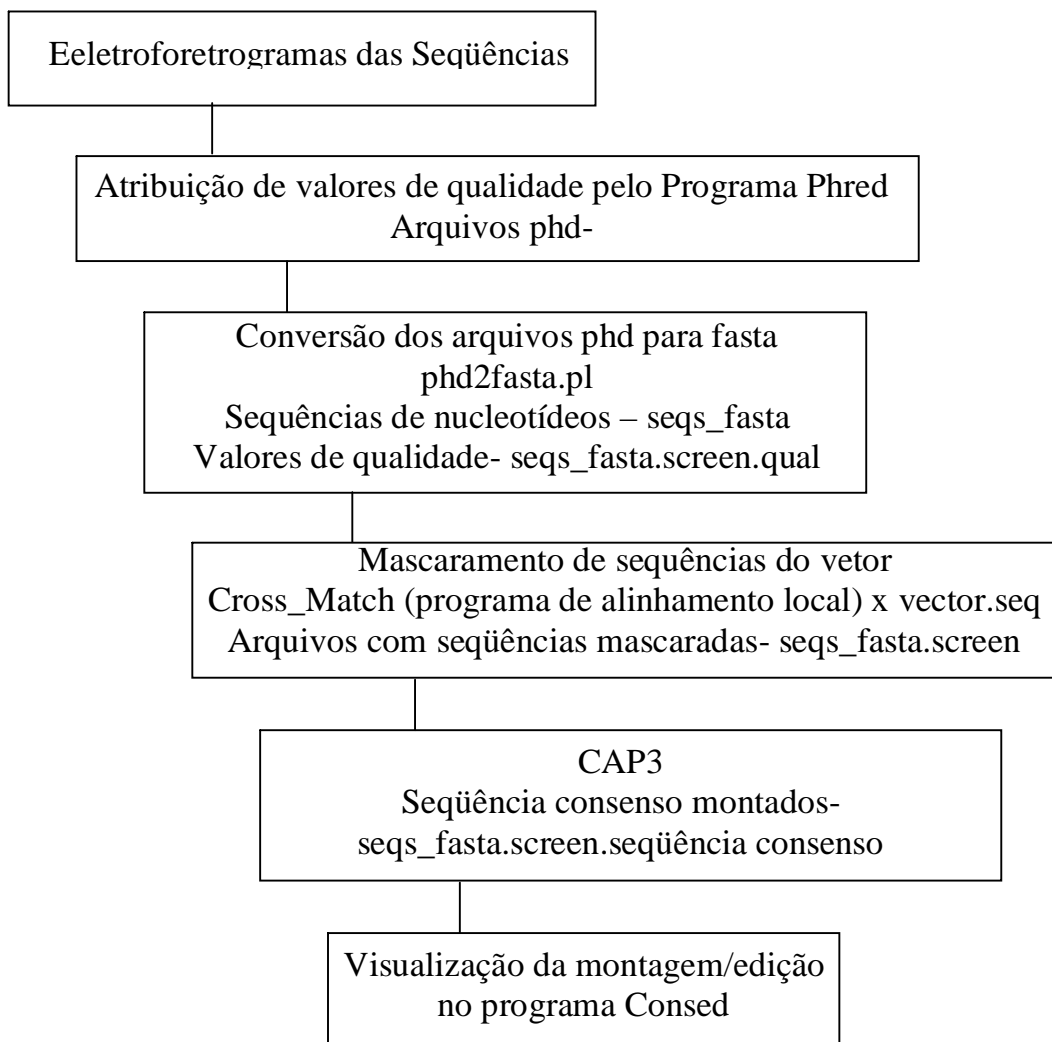
O programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999) realiza a montagem das seqüências em seqüência consenso. A montagem das seqüências nas direções 5' e 3' sobrepostos utiliza valores de qualidade produzidos pelo programa Phred (EWING, *et al.*, 1998a, EWING, *et al.*, 1998b) para a construção do alinhamento das seqüências e criação da seqüência consenso. A montagem apresenta três fases: na primeira as regiões dos reads nas direções 5' e 3' de baixa

qualidade são identificadas e as regiões de sobreposição são alinhadas. Na segunda fase, as seqüências são reunidas para a formação da seqüência consenso na ordem decrescente de porções sobrepostas e as seqüências “reversas e universais” são usadas para as montagens das seqüências consenso. Na terceira fase o alinhamento das seqüências é construído e a seqüência consenso tem seu valor (*E value*) computado tanto para cada base quanto para cada contig.

O programa PHRAP não foi utilizado, pois, apesar de produzir seqüências consenso maiores, o programa CAP3 produziu seqüências consenso com melhor qualidade (HUANG & MADAN, 1999).

A montagem foi visualizada através do programa Consed (GORDON, ABAJIAN, GREEN, 1998)

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA MONTAGEM DE SEQÜÊNCIA CONSENSO UTILIZANDO O PACOTE PHRED/PHRAP/CONSED



3.12.2 Análise das Seqüências de DNA nos programas FRAMEPLOT, BLAST e CLUSTALW

As seqüências consenso obtidas foram analisados no programa FRAMEPLOT (ISHIKAWA & HOTTA, 1999). Este programa permite a identificação de prováveis regiões codificadoras de proteínas (ORFs) no DNA bacteriano. A análise é baseada no conteúdo médio de (G+C) da terceira base do códon: bactérias com alto conteúdo genômico de (G+C)

tendem a apresentar valores maiores do que a media na terceira posição do códon em regiões codificadoras de proteínas (ISHIKAWA & HOTTA, 1999).

O programa BLAST (YE, MCGINNIS, MADDEN, 2006; ALTSCHUL, *et al.*, 1990) foi utilizado para busca de proteínas similares no banco de dados Genbank. O programa Clustal W (THOMPSON, *et al.*, 1994) foi utilizado para produzir alinhamentos das seqüências primárias das proteínas.

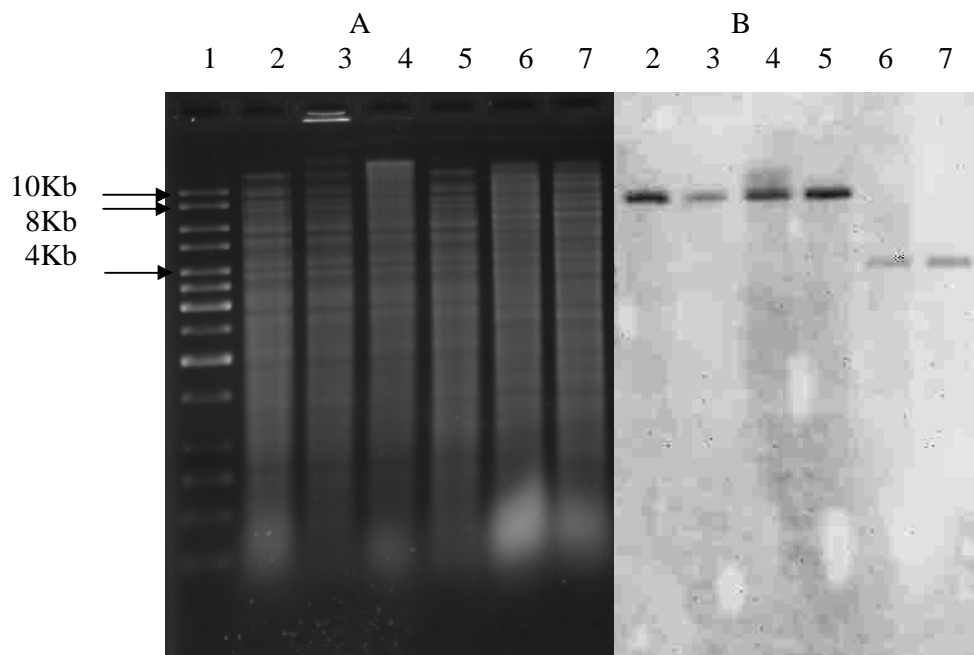
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DO GENE *hrcV* DE *H. rubrisubalbicans* POR HIBRIDIZAÇÃO

O plasmídeo HS09-00-000-059-E07 foi obtido do Programa GENOPAR contém um inserto de 1456 pb contendo o gene *hrcV* de *H. seropedicae*. O fragmento EcoRI/HindIII deste plasmídeo foi purificado e utilizado como sonda na hibridização com o DNA genômico das estirpes M1 e HRCC103 de *H. rubrisubalbicans* e das estirpes ZA95, ZM152 e HRC54 de *H. seropedicae* digerido com a enzima de restrição *Pst*I.

A figura 6 mostra que todas as estirpes de *Herbaspirillum* utilizadas apresentaram um sinal de hibridização com o gene *hrcV*. Entretanto o padrão de hibridização foi distinto entre as duas espécies: as estirpes de *H. seropedicae* apresentaram um fragmento *Pst*I de aproximadamente 10 Kb hibridizando com a sonda *hrcV*, enquanto que as de *H. rubrisubalbicans* apresentaram um sinal de aproximadamente 4 Kb. Estes resultados mostram que todas as estirpes testadas provavelmente possuem um sistema de secreção do tipo 3 e sugerem que as regiões genômicas que contêm o gene *hrcV* são similares entre as estirpes da mesma espécie, mas são diferentes nas duas espécies de *Herbaspirillum*.

FIGURA 6 - HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE ESTIRPES DE *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* COM O GENE *hrcV*.



O DNA genômico das estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* foi digerido com enzima de restrição PstI, submetido a eletroforese em gel de agarose 0,7% e os fragmentos foram hibridizados com o fragmento EcoRI/HindIII de 1,456 Kb do plasmídeo HS09-00-000-059-E07 (GENOPAR) marcado com dUTP-fluoresceína.

Painel A. Perfil eletroforético

- 1- 1 kb ladder (FERMENTAS)
- 2- DNA total de *H. seropedicae* estirpe SMR1 digerido com PstI.
- 3- DNA total de *H. seropedicae* estirpe HRC54 digerido com PstI
- 4- DNA total de *H. seropedicae* estirpe ZA94 digerido com PstI
- 5- DNA total de *H. seropedicae* estirpe ZM152 digerido com PstI
- 6- DNA total de *H. rubrisubalbicans* estirpe M1 digerido com PstI
- 7- DNA total de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 digerido com PstI

Painel B. Hibridização de A com o fragmento EcoRI/HindIII do plasmídeo HS09-00-000-059-E07 contendo o gene *hrcV* marcado com dUTP-fluoresceína.

4.2 SEQUENCIAMENTO DOS GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO TRÊS DE *H. rubrisubalbicans*

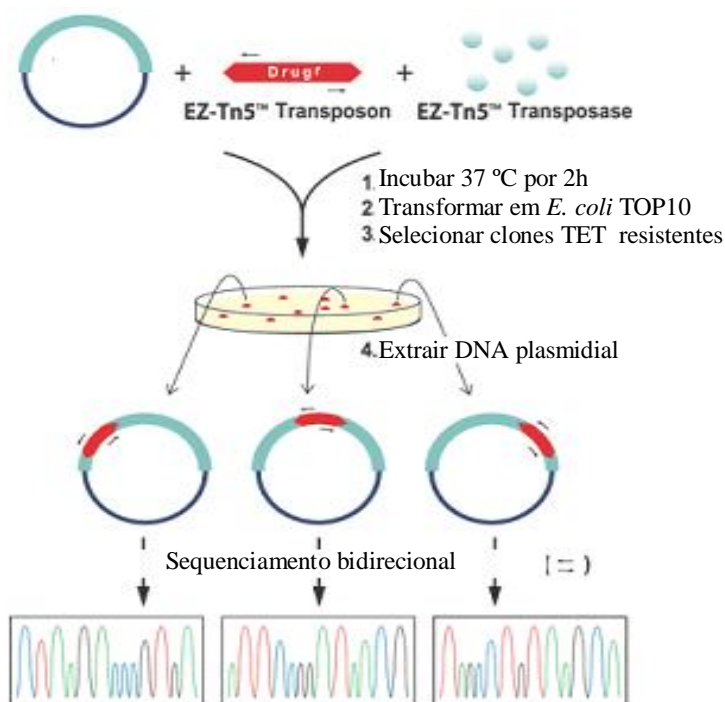
O banco de dados do Projeto de Sequenciamento Genômico Parcial de *H. rubrisubalbicans* (<http://aramis.genopar.org/bacteria/HR>) foi utilizado para identificação de possíveis genes do sistema de secreção do tipo 3 (SST3) utilizando o programa BlastX (BIRO, 2002) e o banco de dados nr do GenBank. Os prováveis genes do sistema SST3 identificados foram: *pilN*, *pilO*, *hrcC*, *hrpE*, *hrcJ*, *hrcU*, *hrpX*, *hrpQ*, *hrcN*, *hrpO* e *hrcV*. A identificação destes genes na seqüência genômica parcial de *H. rubrisubalbicans* M1 confirma a presença do sistema de secreção do tipo 3 nesta espécie e está de acordo com os resultados de hibridização

Os genes do SST3 foram encontrados em seqüências de 11 plasmídeos do banco aleatório de *H. rubrisubalbicans* no vetor pUC19 (<http://aramis.genopar.org/bacteria/HR>). A tabela 3 mostra os clones e os prováveis genes relacionados ao sistema de secreção do tipo 3 presentes.

Os plasmídeos selecionados foram submetidos à mutagênese aleatória utilizando-se um sistema de inserção *in vitro* do transposon *EZ-Tn5*TM <*TET-1*> (*EPICENTRE Biotechnologies—Enzyme Systems for RNA and DNA Research*). Os produtos de inserção podem ser seqüenciados a partir de iniciadores que hibridizam nas extremidades do transposon.

O processo de inserção do transposon *EZ-Tn5*TM <*TET-1*> está esquematizado na figura 7.

FIGURA 7 - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE MUTANTES COM TRANSPOSON *EZ-Tn5*TM <*TET-1*> *in vitro* E SEQUENCIAMENTO



O DNA plasmidial foi extraído conforme descrito no item 3.7.1 e submetido à reação de transposição *in vitro* (item 3.11.1) e o produto da reação foi transformado em *E. coli* TOP 10.

As colônias de *E. coli* TOP10 transformantes foram selecionadas em meio LA contendo ampicilina (250 µL/ml) e tetraciclina (10 µl/mL). Doze colônias transformantes derivadas de cada um dos clones HR03-MF-00-000-052-H10, HR02-FP-00-000-009-C05, HR02-MF-00-000-052-H11, HR02-MF-00-000-053-F11 e quatro colônias de cada um dos clones HR02-MF-00-000-052-H1 e HR02-MF-00-000-057-H09 foram coletadas e cultivadas. O DNA plasmidial foi extraído e submetido à reação de sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos TET-1 FP-1 (5' - GGGTGCGCATGATCCTCTAGAGT - 3') e TET-1 RP-1 (5' - TAAATTGCACTGAAATCTAGAAATA - 3') que permitem o sequenciamento a partir das extremidade direita e esquerda, respectivamente, do transposon *EZ-Tn5*TM <*TET-1*>. Não foram obtidas colônias transformantes dos clones restantes. Os clones foram também sequenciados utilizando os oligonucleotídeos universal e reverso que hibridizam com o vetor.

As seqüências obtidas foram utilizadas juntamente com aquelas recuperadas do banco Projeto de Sequenciamento Genômico Parcial de *H. rubrisubalbicans*

(<http://aramis.genopar.org/bacteria/HR>) e montadas em *seqüência consenso* utilizando o programa CAP3 (Item 3.12.1).

4.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DOS SEQUÊNCIA CONSENSO OBTIDOS

Todas as seqüências obtidas foram utilizadas para montagem da ilha de patogenicidade com o programa CAP3. Foram obtidas treze seqüências consenso, as quais foram analisadas utilizando os programas FRAMEPLOT (ISHIKAWA & HOTTA, 1999) e BLAST. A Tabela 4 mostra o resumo da montagem das seqüências.

TABELA 4 – RESUMO DA MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO CONTENTO GENES *hrp/hrc* DE *H. rubrisubalbicans*

<i>Contig</i>	Número de leituras	Clones e orientação do seqüenciamento	Tamanho Contig	Erro provável/10Kb	Genes identificados
<i>Contig 1</i>	7	HR02MF00000052H11.b HR02MF00000052A02.b HR02MF00000052A02.TET HR03FP00000015A08.g HR03FP00000015A08.TET	1071	131,35	<i>HrcU</i> e <i>hrpX</i>
<i>Contig 2</i>	11	HR02MF00000057H09.b HR02MF00000057H09.TET HR02MF00000057H10.b HR02MF00000057H10.TET HR02FP00000009C05.b HR02FP00000009C05.TET	1209	28,73	<i>HrpE</i>
<i>Contig 3</i>	3	HR02FP00000009C05.g HR02FP00000009C05.TET	714	88,56	<i>hrcJ</i>
<i>Contig 4</i>	4	HR03FP00000001C01.g HR02MF00000050F12.b	1105	64,47	Fosfatase alcalina
<i>Contig 5</i>	7	HR03FP00000010H02.b HR03FP00000010H02.TET HR03FP00000003A06.b HR03FP00000008H07.b	697	91,69	<i>pilN</i>

TABELA 4 - RESUMO DA MONTAGEM DAS SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO CONTENTO GENES *hrp/hrc* DE *H. rubrisubalbicans*.

Conclusão

Contig	Número de leituras	Clones e orientação do seqüenciamento	Tamanho Contig	Erro provável/10Kb	Genes identificados
Contig 6	5	HR03FP00000008C01.g HR03FP00000008C01.b HR02MF00000058F12.g HR03MF00000056F09.b	1810	43,80	Fosfatase alcalina secretada, Provável Lipoproteína e Proteína hipotética
Contig 7	10	HR03FP00000013B07.b HR02MF00000053F11.g HR02MF00000053F11.TET	1459	50,66	<i>hrpQ</i> <i>hrcN</i>
Contig 8	8	HR02MF00000052H11.g HR02MF00000052H11.TET HR03FP00000015A08.b HR03FP00000015A08.TET	738	21,15	-
Contig 9	7	HR02MF00000053F11.b HR03FP00000023G09.b	847	93,91	<i>hrpO</i>
Contig 10	2	HR03FP00000049A08.b HR03FP00000049A08.TET	746	85,06	<i>hrcV</i>
Contig 11	5	HR03FP00000003A06.g HR03FP00000008H07.g HR03MF00000052B08.b HR03MF00000052B08.b1	743	77,59	<i>pilO</i> <i>pilN</i>
Contig 12	4	HR03MF00000052H10.g HR02MF00000057H09.g HR02MF00000057H09.TET	921	97,91	<i>hrcC</i>
Contig 13	3	HR03MF00000053D10.g HR03FP00000023G09.b	1099	85,29	Proteína de Resistência a acriflavina

As seqüências *.g foram obtidos utilizando oligonucleotídeo reverso do pUC19 (M13 – 5' – AGGAAACAGCTATGACCAT - 3'), as seqüências *.b foram seqüenciados com o oligonucleotídeo universal do pUC19 (M13- 5'- GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA - 3'). Os clones *.TET foram seqüenciados com os oligonucleotídeos do transposon *EZ-Tn5*TM <*TET-1*>.

O comprimento médio das seqüências obtido foi de aproximadamente de 1Kb e a qualidade média de 74 (aproximadamente 1 erro em 10Kb) seqüência na montagem final.

Para determinação de prováveis regiões codificadoras de proteínas foi utilizado o programa FRAMEPLOT (ISHIKAWA & HOTTA, 1999). As fases abertas de leitura (ORF) com maior probabilidade de corresponderem a produtos real de tradução foram comparadas com o banco de dados GenBank utilizando o programa BlastP. Esta comparação revelou a presença dos genes *hrcU* e *hrpX* (*contig* 1), *hrpE* (*contig* 2), *hrcJ* (*contig* 3), *hrcC* (*contig* 12). Estes resultados indicam também que as seqüências consenso 1, 3 e 12 estão fisicamente unidas no genoma de *H. rubrisubalbicans*. Esta conclusão se deve ao fato de que seqüências obtidas com o oligonucleotídeo **M13-UNIVERSAL**, que hibridiza com o vetor pUC19 dos plasmídios HR02FP0000009C05 e HR02MF00000057H10, fazem parte do *contig* 2 (APÊNDICE I). Por outro lado, as seqüências dos plasmídeos HR02FP0000009C05 e HR02MF00000057H10 obtidas com o oligonucleotídeo **M13-REVERSO**, que hibridiza com o vetor pUC19 na extremidade oposta dos insertos, formam as seqüências consenso 3 (APÊNDICE II) e 12 (APÊNDICE III). A ligação física destes seqüência consenso implica que os genes *hrpE*, *hrcC* e *hrcJ* provavelmente estão próximos no genoma do *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

O gene *pilN* está presente em duas *seqüência consenso*: no *contig* 5 (APÊNDICE IV) está a porção inicial do gene e no *contig* 11 a porção final. Este último *contig* contém também parte do gene *pilO* a jusante de *pilN* (APÊNDICE V). Os *contigs* 5 e 11 são compostos por seqüências dos plasmídeos HR03FO0000003A06 e HR03FP00000008H07 obtidas com os oligonucleotídeos **M-13 UNIVERSAL E REVERSO**, respectivamente.

Os genes *hrpX* e *hrcU* estão adjacentes no *contig* 1 (APÊNDICE VI), assim como os genes *hrpQ* e *hrcN* no *contig* 7 (APÊNDICE VII). O *contig* 7 contém a seqüência do plasmídeo HR02MF00000053F11 obtida como oligonucleotídeo **M13-REVERSO** e o *contig* 9 contém a seqüência deste mesmo plasmídeo com o oligonucleotídeo **M13-UNIVERSAL**; assim o gene *hrpO* provavelmente está próximo dos genes *hrpQ* e *hrcN*. O gene *hrcV* foi encontrado no *contig* 10 (APÊNDICE VIII).

O *contig* 4 contém a seqüência parcial de uma proteína similar a fosfatase alcalina secretada de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*E-value* =1e-161) e de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* str. 306 (*E-value* = 5e-161).

O *contig* 6 contém uma seqüência final de uma fosfatase alcalina secretada de *Burkholderia phytofirmans* PsJN (ZP_01508656; *E value* de 3e-07).

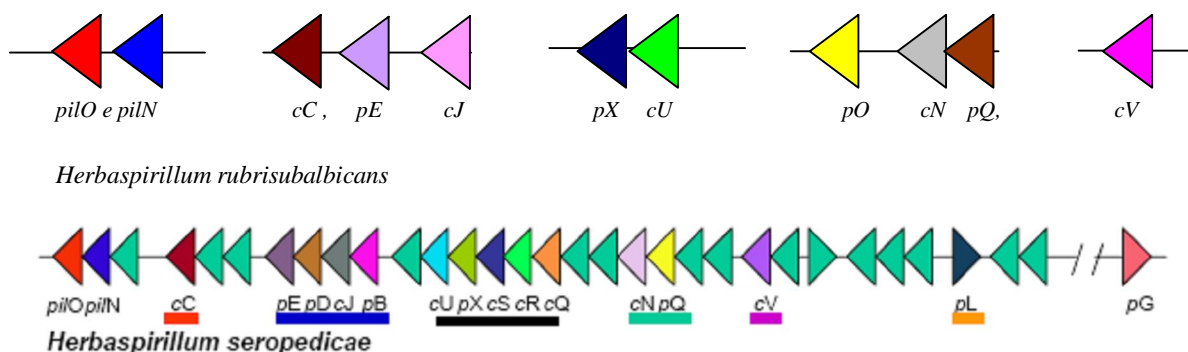
O *contig* 8 apresenta 9 fases abertas de leitura: 4 destas ORFS não apresentam similaridade significativa com seqüências de proteína do GenBank, enquanto as outras apresentam baixas similaridades com proteínas hipotéticas. Esta região provavelmente corresponde a um segmento intergênico.

Uma provável proteína similar à proteína de resistência a acriflavina de *Ralstonia metallidurans* CH 34 (*E-value*= 2e-37) foi encontrada no *contig* 13. Este *contig* contém a seqüência obtida com o oligonucleotídeo **M13-UNIVERSAL** do plasmídeo HR03FP0000023G09; a seqüência obtida do mesmo plasmídeo com o **M13-REVERSO** forma parte do *contig* 9 (APÊNDICE IX), que contém o gene *hrpO*. Portanto, estes resultados sugerem que o gene que provavelmente confere resistência a acriflavina está adjacente ao gene *hrpO*. A acriflavina (cloreto de 3,6-diamino-10-metilacridínio e 3,6-acridinodiamina) é um corante fluorescente usado como antisséptico local e também como corante biológico e tem a capacidade de se intercalar entre as bases dos ácidos nucléicos inibindo a replicação bacteriana.

4.4 ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*.

A disposição dos genes *hrp/hrc* e *pil* de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* está na figura 8.

FIGURA 8 - COMPARAÇÃO DO AGRUPAMENTO *pil/hrc/hrp* de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*



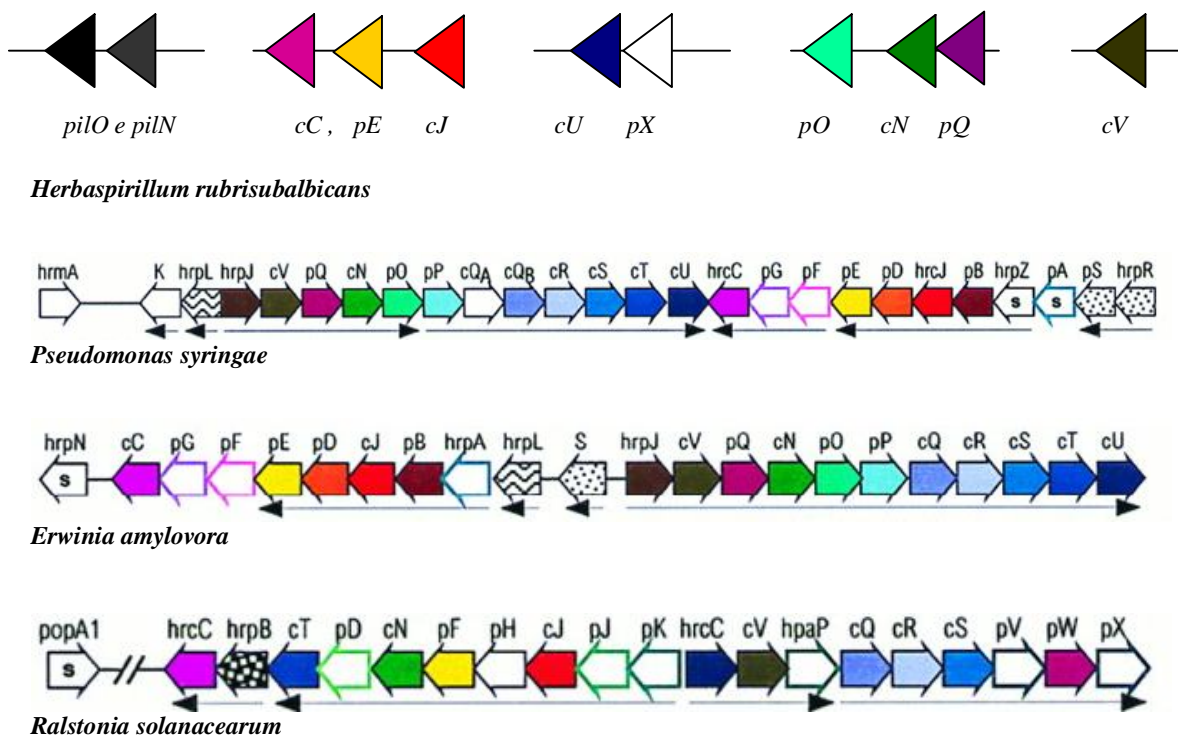
FONTE: DEDECEK, A. S. Análise dos genes *hrp/hrc* de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterização parcial dos genes *hrcC*, *hrcV* e *hrpG*. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 90, 2006.

O grupo de genes *hrc/hrp* de *H. seropedicae* compreende uma região de aproximadamente 28kb do seu genoma e contém 31 prováveis genes ou *orfs*. Quatorze destes codificam para proteínas que compõem o Sistema de Secreção do Tipo III (SST3), denominadas proteínas Hrp ou Hrc; 2 genes possuem similaridade com genes codificadores de proteínas componentes do sistema de secreção do Tipo IV (*pilN* e *pilO*) e os outros 15 são *orfs* consideradas hipotéticas conservadas ou hipotéticas. Um gene homólogo a *hrpG*, cujo produto é um provável regulador da expressão dos genes presentes na ilha, foi encontrado fora da ilha de patogenicidade (DEDECEK, *et al.* 2006).

A organização parcial dos genes *pil/hrc/hrp* no genoma do *H. rubrisubalbicans* deduzida neste trabalho é semelhante aquela de *H. seropedicae* (Figura 8). Entretanto, em *H. seropedicae* não foi identificado um gene semelhante ao *hrpO*, localizado a montante de *hrcN* de *H. rubrisubalbicans*.

Os genes *pilO* e *pilN* (APÊNDICE V), *hrpX* e *hrcU* (APÊNDICE VI), *hrpQ* e *hrcN* (APÊNDICE VII) estão muito próximos no genoma e apresentam região intergênica curta, sugerindo que estes genes formam os operon *pilOpilN*, *hrpXhrcU* e *hrpQhrcN*.

FIGURA 9 - COMPARAÇÃO DO AGRUPAMENTO *pil/hrc/hrp* de *H. rubrisubalbicans*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* e *Ralstonia solanacearum*.



FONTE: HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. and Molecular Biol. Rev.** v. 62, p. 379-433, 1998.

O agrupamento *hrp/hrc* de *Pseudomonas syringae* *pv phaseolicola* compreende 28 genes em uma região de aproximadamente 24Kb. Dois genes codificam as proteínas tipo *hairpins* HrpA e HrpZ (CHARKOWSKI, HUANG, COLLMER. 1997). As proteínas HrpS e HrpR são proteínas reguladoras de resposta de um sistema de dois componentes e HrpL é um fator sigma alternativo (XIAO, *et al.*,1994). Os genes que codificam o sistema de secreção são organizados em quatro unidades transcricionais (CHARKOWSKI, HUANG, COLLMER. 1997): *hrpJcVpQcNpO* (LIDELL & HUTCHESON, 1994), *hrpPcQ_{AB}RSTU* (LIDELL & HUTCHESON, 1994), *hrpFGcCpTV* (HUANG, *et al.*, 1992) e *hrpAZBcJpDE* (HUANG *et al.*, 1995).

O sistema de secreção do tipo III de *Erwinia amylovora* compreende uma região de 25Kb contendo 22 genes organizados em três operons: *hrpJ-hrcU* (BOGDANOVE, *et al.*, 1996) , *hrpA-hrpE* e *hrpF -hrpV* (KIM,WEI, BEER, 1997). A proteína secretada HrpN

(*hairpin*) é codificada por um *operon* diferente localizado no final do agrupamento gênico, do lado esquerdo como é visto na figura 9 (WEI, *et al.*, 1992).

Em *Ralstonia solanacearum* os genes *hrp/hrc* estão localizado em um megaplasmídeo e compreende uma região de aproximadamente 27 kb com 18 genes. Os genes estão organizados em quatro unidades transcricionais: *hrpBA*, *hrpK-hrpC*, *hrpNO-hrpaP* e *hrpQ-hrpX* (ARLAT, *et al.*, 1992). Estes genes são necessários para a secreção da proteína PopA1, a qual promove a resposta hipersensitiva (ARLAT, *et al.*, 1992). O gene *hrpB* codifica um ativador transcricional global dos genes *hrp* (GENIN, *et al.*, 1992).

A comparação do agrupamento *pil/hrc/hrp* de *H. rubrisubalbicans* e de bactérias fitopatogênicas mostra que a organização dos genes *hrpQ*, *hrcN* e *hrpO* e *hrcC*, *hrpE* e *hrpJ* nos genomas de *H. rubrisubalbicans*, *Pseudomonas syringae* e *Erwinia amylovora* parece ser parcialmente conservada (figura 9). Por outro lado, não há muita semelhança na organização destes genes entre *H. rubrisubalbicans* e *Ralstonia solanacearum* (figura 9).

4.5 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS Hrp, Hrc, e Pil de *H. rubrisubalbicans*

O programa BLASTp foi utilizado para identificar no banco de dados de seqüências do GenBank e GENOPAR proteínas similares àquelas codificadas pelos genes *hrp*, *hrc* e *pil* de *H. rubrisubalbicans*. As seqüências de proteínas homólogas de *Herbaspirillum seropedicae*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae pv syringae* e *Pseudomonas syringae pv. tomato* foram então alinhadas com as de *H. rubrisubalbicans* utilizando o programa ClustalW (THOMPSON, *et al.*, 1994).

O alinhamento foi realizado com a seqüência parcial de aminoácidos para os genes incompletos *pilN*, *hrcC*, *hrcU*, *hrpX*, *hrcN*, *hrpQ*, *hrcV* e com a seqüência total de aminoácidos para os genes completos *hrpE*, *hrcJ* e *hrpO*. Não foi realizado alinhamento de aminoácidos da proteína PilO, pois a região seqüenciado continha um fragmento muito reduzido deste gene.

A identidade e similaridade destas proteínas estão mostradas na tabela 5. As proteínas de *H. rubrisubalbicans* apresentam maior identidade e similaridade com as proteínas de *Herbaspirillum seropedicae*, exceto a proteína HrpO.

TABELA 5 – IDENTIDADE E SIMILARIDADE ENTRE PROTEÍNAS Hrp, Hrc e Pil DE *H. rubrisubalbicans* estirpe M1 (*H.r.*), *H. seropedicae* estirpe SMR1 (*H.s.*), *Erwinia amylovora* (*E.a.*), *Pseudomonas syringae* pv *syringae* (*P.s. pvs*) e *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*P.s. pvt*).

Identidade Similaridade	Região da proteína de <i>H.r.</i> comparada	Função da proteína	<i>H.s.</i>	<i>E.a.</i>	<i>P.s. pvs</i>	<i>P.s. pvt</i>
PilN	208 aminoácidos da região N-terminal (APÊNDICE X)	Formação do <i>pili</i> Tipo IV (ROINE, <i>et al.</i> , 1996)	48,6% 56,8%	-	17,6% ¹ 18,1%	-
HrcC	159 aminoácidos da região N-terminal (APÊNDICE XI)	Formação do complexo multimérico em forma de anel na membrana externa. (DENG & HUANG, 1999)	76,7% 88,7%	42,6% ² 60,5%	36,5% ³ 53,5%	40,1% ⁴ 55,1%
HrpE	Proteína Completa (APÊNDICE XII)	Formação de um canal interno que permite sua própria passagem, da HrpF e mais outras 20 proteínas efetoras diferentes. (HU, <i>et al.</i> , 2001. WEBER & KOEBNIK, 2005).	34,3% 48,1%	23,7% ⁵ 41,7%	18,4% ⁶ 30,6%	27,2% ⁷ 41,5%
HrcJ	Proteína Completa (APÊNDICE XIII)	Formação da estrutura central no periplasma (DENG & HUANG, 1999).	48,1% 62,4%	24,6% ⁸ 42,5%	25,4% ⁹ 46,3%	27,7% ¹⁰ 43,8%
HrcU	199 aminoácidos da região N-terminal (APÊNDICE XIV)	Proteína estrutural do corpo basal e envolvimento no controle da secreção de substratos do SST3.(ALLALOUI, <i>et al.</i> , 1994)	30,8% 41,9%	22,5% ¹¹ 34,7%	21,1% ¹² 37,1%	-
HrpX	93 aminoácidos da região C-terminal (APÊNDICE XV)	Proteína estrutural do corpo basal e envolvimento na montagem do Hrp-pilus. (VAN GIJSEGEM, <i>et al.</i> , 2002)	77,9% 89,5%	24,8% ¹³ 45,0%	36,8% ¹⁴ 56,8%	34,7% ¹⁵ 54,7%
HrpQ	282 aminoácidos da região C-terminal (APÊNDICE XVI)	Proteína estrutural do corpo basal, componente da família YscD (HUECK, 1998)	36,8% 47,3%	22,5% ¹⁶ 37,3%	23,2% ¹⁷ 35,5%	23,5% ¹⁸ 35,5%
HrcN	200 aminoácidos da região N-terminal (APÊNDICE XVII)	É uma ATPase e realiza transdução de energia através da hidrólise de ATP para o SST3 e promove separação da proteína efetora e chaperona (AKEDA & GALAN, 2005)	51,6% 56,6%	34,5% ¹⁹ 48,3%	30,6% ²⁰ 41,9%	27,1% ²¹ 37,3%
HrpO	Proteína completa (APÊNDICE XVIII)	Possível função estrutural devido a baixa similaridade com FliJ, uma proteína periplasmática do aparato flagelar. (HE, 1998)	-	23,5% ²² 44,3%	19,2% ²³ 32,6%	19,9% ²⁴ 35,5%
HrcV	80 aminoácidos da região N-terminal (APÊNDICE XIX)	Proteína estrutural do corpo basal interage com chaperonas e facilita entrada de efetores no SST3. (ALEGRIA, <i>et al.</i> , 2004).	75,0% 86,2%	47,5% ²⁵ 73,2%	48,8% ²⁶ 72,5%	48,8% ²⁷ 72,5%

As sequências dos genes *hrp/hrc* do *Herbaspirillum seropedicae* estão disponíveis no sítio <http://nfn.genopar.org>. Os superscritos 1 a 26 correspondem ao número de acesso da sequência de aminoácidos no Genbank:

¹ refYP_234605.1, ² gbAAB49179.1, ³ refYP_234292.1, ⁴ gbAAO54911.2, ⁵ gbAAB49176.1, ⁶ refYP_234289.1, ⁷ refNP_791213.1, ⁸ gbAAB49174.1, ⁹ gbAAY36249.1, ¹⁰ gbAAO54906.1, ¹¹ gbAAB06008.1, ¹² refYP_234297.1, ¹³ gbAAB06007.1, ¹⁴ refYP_234298.1, ¹⁵ refNP_791220.1, ¹⁶ gbAAB06000.2, ¹⁷ refYP_234306.1, ¹⁸ refNP_791228.1, ¹⁹ refNP_791227.1, ²⁰ refYP_234 305.1, ²¹ refNP_791227.1, ²² gbAAB06002.1, ²³ gi66044463refYP_234304.1, ²⁴ gi28868607 refNP_791226.1, ²⁵ gbAAB05999.2, ²⁶ refYP_234307.1, ²⁷ refNP_791229.1.

A sequência de aminoácidos da proteína HrcC apresentou domínio conservado semelhante ao da proteína PulD. Estas proteínas estão presentes na membranas externa e são formadoras do poro do sistema de secreção e são chamadas de secretinas. (HUECK, 1998).

A proteína HrcN apresentou os domínios cd01136 e pfam02874. Estes domínios são característicos de ATPases do aparato de Secreção do Tipo III/flagelar e ATPsintase, respectivamente. A presença destes domínios sugere que a HrcN de *H. rubrisubalbicans* utiliza a hidrólise de ATP como fonte de energia para o sistema de secreção do tipo III.

A proteína HrcU apresentou domínio semelhante ao da proteína homóloga do aparato flagelar FlhB (domínio PRK05702) e o domínio pfam 01312 da família de proteínas FlhB, HrpN, YscU, SpaS, HrcU SsaU e YopU, que está envolvido com a exportação de peptídeos. Estes fato reforça a idéia que a proteína HrcU de *H. rubrisubalbicans* pode ter a mesma função que em outras bactérias fitopatogênicas.

A proteína HrcV apresentou os seguintes domínios conservados COG4789 e PRK06012. O primeiro é um domínio semelhante ao da proteína EscV. Esta proteína está presente na bactéria *Escherichia coli* e é homóloga a proteína HrcV de fitopatógenos (HUECK, 1998). O domínio PRK06012 é semelhante ao da proteína FlhA do aparato flagelar.

Os resultados obtidos indicam que, com exceção da proteína HrcJ, as proteínas Hrc de *H. rubrisubalbicans* encontradas até agora são conservadas entre as bactérias e são homólogas as proteínas do aparato flagelar. Em contraste, as proteínas Hrp não apresentaram domínios conservados.

5 CONCLUSÃO

1. Foram encontradas as seqüências parciais dos genes *pilN*, *pilO*, *hrcC*, *hrpE*, *hrcJ*, *hrcU*, *hrpX*, *hrpQ*, *hrcN*, *hrpO* e *hrcV* no genoma da bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Estes genes estão agrupados em genomas de outros fitopatógenos, tais como *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*, e compõem uma região chamada de Ilha de Patogenicidade.
2. Os genes *hrp/hrc* codificam as proteínas do Sistema de Secreção do Tipo Três (SST3). Este sistema catalisa a translocação de proteínas da bactéria diretamente no citoplasma do hospedeiro eucariótico. A descoberta de genes deste sistema no genoma do *Herbaspirillum rubrisubalbicans* sugere que proteínas secretadas por este sistema podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença da estria mosqueada em algumas variedades de cana-de-açúcar.
3. A organização e a seqüência de proteínas codificadas pelos genes *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* é similar a de *H. seropedicae*, sugerindo que a divergência entre as duas espécies deve ter ocorrido após a aquisição dos genes do sistema SST3.
4. Gene codificando uma fosfatase alcalina secretada por fitopatógenos do gênero *Xanthomonas* foram identificados em *H. rubrisubalbicans*, sugerindo que a participação do SST3 na interação patogênica com variedades susceptíveis.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITCH, R. B.; KIM, Y. J.; CHEN, S.; DICKMAN, M. B.; MARTIN, G. B. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. **EMBO Journal**. v.22, p.60–69, 2003.

AIZAWA, S. I. Bacterial flagella and type III secretion systems. **FEMS Microbiology Letters**. v.202, p.157-164, 2001.

AKEDA, Y.; GALAN, J. E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. **Nature**. v.437, p.911–915, 2005.

ALEGRIA, M.C.; DOCENA C.; KHATER L.; RAMOS ,C. H. I.; SILVA A. C. R.; FARAH C. S. New Protein-Protein Interactions Identified for the Regulatory and Structural Components and Substrates of the Type III Secretion System of the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. **Journal of Bacteriology**. v. 186, p. 6186-6197, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; GISH,W.; MILLER,W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p.403–410, 1990

ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: doubles agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review Phytopathology**. v.42, p.385-414, 2004.

ALFANO J.R.; COLLMER A.The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**.v.179, p.5655–62, 1997.

ALLOUI, A.; SANSONETTI, P. J.; PARSOT, C. MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasins, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins. **Journal of Bacteriology**. v.174, p.7661-7669, 1992.

ANDERSON,D. M.; FOUTS D. E.; COLLMER, A.; SCHNEEWIND, O. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. **PNAS**. v.96, p.12839–43, 1999.

ANDERSON D.M.; SCHNEEWIND, O. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. **Science**. v.278, p.1140–43, 1997.

ARLAT, M.; VAN GIJSEGEM, F.; HUET, J. C.; PERNOLLET, J. C.; BOUCHER, C. A. PopA1, a protein which induces a hypersensitive like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. **EMBO Journal**. v.13, p.543–53, 1994.

- BALDANI, J.I.; *et al.*, Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.46, p.802-10, 1996.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOEBEREINER, J. 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.
- BARNY, M. A. *Erwinia amylovora hrpN* mutants, blocked in harpin synthesis, express a reduced virulence on host plants and elicit variable hypersensitive reactions on tobacco. **European Journal of Plant Pathology**. v.101, p.333–40, 1995.
- BLOCKER A.; KOMORIYA, K.; AIZAWA, S. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. Review. **PNAS**. v.100, n.6, p.3027-30, 2003.
- BOGDANOVE, A. J. ; BEER, S. V.; BONAS, U.; BOUCHER C. A.; COLLMER A. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. **Molecular Microbiology**. v.20, p.681–83, 1996.
- BURGHOUT, P. *et al.* Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica* **Journal of Bacteriology**. v.186, p.4645–4654, 2004.
- BUTTNER, D.; BONAS, U.. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**. v.6, p.312–19, 2003.
- CHAMI, M. *et al.* Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p.37732–37741, 2005.
- CAMBRONNE, E. D., L. W. CHENG, AND O. SCHNEEWIND. LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia yop* virulon, are injected into host cells by a chaperone-dependent mechanism. **Molecular Microbiology**. v.37, p.263-273, 2000.
- CARNIEL, E.; GUILVOUT, I.; PRENTICE, M. Characterization of a large chromosomal “high-pathogenicity island” in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. **Journal of Bacteriology**. v.178, p.6743–6751, 1996.
- CHANGSIK O.; SUNGGI, H.; JAE-YONG, Y.;YONGSUP C. An *hrcU*-Homologous Gene Mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines 8ra* That Lost Pathogenicity on the Host Plant but Was Able to Elicit the Hypersensitive Response on Nonhosts. **MPMI** .v. 12, p. 633–639, 1999.

CHARKOWSKI, A. O.; ALFANO, J.R.; PRESTON, G.; YUAN, J.; HE, S. Y. The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. **Journal of Bacteriology**. v.180, p.5211–17, 1998.

CHARKOWSKI, A. O.; HUANG, H. C.; COLLMER, A. Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**. v.179, p.3866-3874, 1997.

CHENG, L. W.; ANDERSON, D. M.; SCHNEEWIND, O. Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. **Molecular Microbiology**. v.24, p.757–65, 1997.

CHRISTOPHER, W.N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **Journal of Agricultural Research**. v.41, p.259, 1932.

CORNELIS, G. R. The type III Secretion Injctisome. **Nature Reviews in Microbiology**. v.4, p. 811-825, 2006.

CORNELIS, G. R ; VAN GIJSEGEM F. Assembly an function of type III secretory systems. **Annual. Review in Microbiology**. v.54, p.735–74, 2000.

CORNELIS, G.R.; WOLF-WATZ, H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. **Molecular. Microbiology**. v.2, p.861–67, 1997.

COTTER, P. A.; MILLER J. F. In vivo and ex vivo regulation of bacterial virulence gene expression. **Current Opinion in Microbiology**. v.1, p.17–26, 1998.

DANIELL, S. J.; TAKAHASHI, N.; WILSON, R.; FRIEDBERG, D.; ROSENSHINE, I.; BOOY, F. P.; SHAW, R. K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G.; AIZAWA. S. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**. v.3, p.865-871, 2001.

DEDECEK, A. S. Análise da Ilha Genômica *hrp/hrc* de *Herbaspirillum seropedicae* e Caracterização Parcial dos genes *hrcC*, *hrcV* e *hrpG*. **Tese de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 90 p., 2006.

DOW, M. NEWMAN, M. A.; VON ROEPENACK, E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annual Review in Phytopathology**. v.38, p.241–61, 2000.

- DENG W.-L.; HUANG H.-C. Cellular Locations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ Proteins, Required for Harpin Secretion via the Type III Pathway. **Journal of Bacteriology**. v.181, p. 2298-2301, 1999.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Research**. v.8, p.186-194, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.D.; WENDL M.C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred.I. Accuracy. Assessment. **Genome Research**.v.8, p.175-185, 1998.
- FELIX G, BOLLER T. Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. **Journal of Biological Chemistry**. v.278, p.6201–8, 2003.
- FRANCIS, M.S.; WOLF-WATZ, H.; FORSBERG, A. Regulation of type III secretion systems. **Current Opinion in Microbiology**. v.5, p.166–72, 2002.
- GAL-MOR, O.; FINLAY, B. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**. v.8, n.11, p.1707-1719, 2006.
- GALAN, J.E.; COLLMER, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science**. v. 284, p.1322–28, 1999.
- GENIN, S.; GOUGH, C. L.; ZISCHEK, C.; BOUCHER. C. A. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Microbiology**. v.6, p.3065-3076, 1992.
- GHOSH, P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. p.771-795, 2004.
- GOMEZ-GOMEZ L.; BOLLER, T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. **Trends Plant Science**. v.7, p.251–56, 2002.
- GOPHNA, U.; RON, E. Z.; GRAUR, D. Bacterial Type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. **Gene**. v.312, p.151-163, 2003.
- GORDON, D.; ABAJIAN,C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. v. 8, p.195-202, 1998.
- HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review Microbiology**. v. 54, p.641-679, 2000.
- HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. **EMBO Reports**. v.2, p.376–381, 2001.

- HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLSDORFER, I.; TSCHAPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**. v. 23, p.1089–1097, 1997.
- HOICZYK, E.; BLOBEL, G. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. **PNAS**. v.98, p.4669-4674, 2001.
- HUANG, H.C.; LIN, R.H.; CHANG, C.J.; COLLMER, A.; DENG, W.L. The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpinPss secretion that are arranged colinearly with *Yersinia ysc* homologs. **MPMI** . v.8, p.733-746, 1995.
- HUANG, H.C.; HE, S.; BAUER, Y. D. W.; COLLMER, A. The *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrpH* product, an envelope protein required for elicitation of the hypersensitive response in plants. **Journal of Bacteriology**. v.174, p.6878-6885, 1992.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**. v.9, p.868-877, 1999.
- HUECK, C. J. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, p.379-433, 1998.
- IRIARTE, M.; CORNELIS, G. R.. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. **Molecular Microbiology**. v.29, p.915-929, 1998.
- ISHIKAWA, J.; HOTTA, K. FramePlot: a new implementation of the Frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. **FEMS Microbiology Letters**. v.174, p.251-253, 1999.
- JONES, D.A.; TAKEMOTO, D. Plant innate immunity—direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current Opinion in Immunology**.v.16, p.48–62, 2004.
- KIM, J. F.; WEI, Z. M.; BEER, S. V. The *hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. **Journal of Bacteriology**. v.179, p.1690-1697, 1997.
- KLASSEN G.; PEDROSA F. O.; SOUZA E. M.; FUNAYAMA S.; RIGO L. U. ; Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 887-891, 1997.
- KEEN,N.T; TAMAKI, S.; KOBAYASHI, D.; GERHOLD, D.; STAYTON, M. Bacteria expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. **MPMI**. v.3, p.112–21, 1990.

KIM, J. F.; BEER, S. V. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. **Journal of Bacteriology**. v.180, p.5203–10, 1998.

KUBORI, T.; MATSUSHIMA, Y.; NAKAMURA, D.; URALIL, J.; LARA-TEJERO, M. ; SUKHAN, A.; GALÁN, J. E.; AIZAWA, S. I. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. **Science**. v.280, p.602-605, 1998.

LIDELL, M. C.; HUTCHESON S. W. Characterization of the *hrpJ* and *hrpU* operons of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61: similarity with components of enteric bacteria involved in flagellar biogenesis and demonstration of their role in Hairpin_{PSS} secretion. **MPMI**. v.7, p.488-497, 1994.

MARTIN, G. B.; BOGDANOVA, A. J.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review in Plant Biology**. v.54, p.23–61, 2003.

MUDGETT, M. B.; CHESNOKOVA, O.; DAHLBECK, D.; CLARK, E. T.; ROSSIER, O. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. **PNAS. USA**. v.97, p.13324–29, 2000.

NOEL L; THIEME, F.; NENNSTIE, D.; BONAS, U.. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Microbiology**. v.41, p.1271–81, 2001.

NURNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. **Current Opinion in Plant Biology**. v.5, p.318–24, 2002.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**. v.135, p.723-737, 1997.

PAGE, A.L.; PARSOT, C. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. **Molecular Microbiology**. v.46, p.1–11, 2002.

POZIDIS, C.; CHALKIADAKI, A. ; GOMEZ-SERRANO, A.; STAHLBERG, H.; BROWN, I.; TAMPAKAKI, A. P.; LUSTIG, A.; SIANIDIS, G.; POLITOU, A. S.; ENGEL, A.; PANOPOULOS, N. J.; MANSFIELD, J.; PUGSLEY, A. P.; KARAMANOU, S.; ECONOMOU, A. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**. v.278, p.25816–25824, 2003.

REITER, W.D.; PALM, P.; YEATS, S. Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. **Nucleic Acids Research**. v.17, p.1907–1914, 1989.

ROINE, E., SAARINEN, J.; KALKKINEN, N.; ROMANTSCHUK, M. Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reassembles into pili. **FEBS Letters**. v.417, p.168-1721, 1997.

ROINE, E.; NUNN, D. N.; PAULIN, L.; ROMANTSCHUK, M. Characterization of genes required for pilus expression in *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. **Journal of Bacteriology**. v.178, p.410-417, 1996.

SAMBROOK, J.P; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARKER, M. R.; NEYT, C.; STAINIER, I. ; CORNELIS, G. R. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. **Journal of Bacteriology**. v. 180, p.1207–1214, 1998.

SCHECHTER, L. M.; ROBERTS, K.A.; JAMIR Y.; ALFANO J.R.; COLLMER, A. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. **Journal of Bacteriology**. v.86, p.543–55, 2004.

SCHUBERT, S.; RAKIN, A.; KARCH, H.; CARNIEL, E.; HEESEMANN, J. Prevalence of the ‘high-pathogenicity island’ of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infection and Immunity**. v.66, p.480–485, 1998.

SMITH, C. L.; KHANDELWAL, P.; KELIUKULI, K.; ZUIDERWEG, R.; SAPER, M.A. Structure of the type III secretion and substrate-binding domain of *Yersinia* YopH phosphatase. **Molecular Microbiology**.v. 42, p.967-979, 2001.

SOUZA, E. M. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 264 p., 1990.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J. B. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **PNAS**. v.96, p.15196–201, 1999.

STEBBINS, C.E.; GALAN, J. E. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. **Nature**. v.414, p.77–81, 2001.

STROBEL, N. E.; JI, C.; GOPALAN, S.; KUC, J. A.; HE, S. Y. Induction of systemic acquired resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv *syringae* 61 HrpZ_{PSS} protein. **The Plant Journal**. v.9, p.431-439, 1996.

TAMANO, K.; AIZAWA, S.; KATAYAMA, E.; NONAKA, T.; IMAJOH-OHMI, S.; KUWAE, A.; NAGAI, S.; SASAKAWA, C. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. **EMBO Journal**. v.19, p.3876-3887, 2000.

TARTOF, K. D.; HOBBS, C. A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. **Bethesda Research Laboratory Focus**. v.9. p.12, 1987.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS D.G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Germany: European Molecular Biology Laboratory. **Nucleic Acids Research**. v. 22 p, 4673–4680, 1994

VAN GIJSEGEM, F.; VASSE, J.; RYCKE, R.; CASTELLO, P.; BOUCHER, C. Genetic dissection of the *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. **Molecular Microbiology**. v. 44, p.935-946, 2002.

WATTIAU, P.; WOESTYN, S.; CORNELIS, G. R. Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. **Molecular Microbiology**.v.20, p.255–62, 1996.

WATTIAU, P.; BERNIER, B.; DESLÉE, P.; MICHIELS, T.; CORNELIS, G. R. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. **PNAS**. v.91, p.10493-10497, 1994.

WEBER, E.; KOEBNIK, R. Domain Structure of HrpE, the Hrp Pilus Subunit of *Xanthomonas campestris* pv. Vesicatoria. **Journal of Bacteriology**. v.187, p.6175-6186, 2005

WEI, Z. M.; LABY, R. J.; ZUMOFF, C. H.; BAUER, D. W.; HE, S. Y.; COLLMER, A.; BEER, S. V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. **Science**. v.257, p.85-88, 1992.

XIAO, Y.; HEU, S.; YI; LU, J. Y.; HUTCHESON, S. W. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hip* and *hrmA* genes. **Journal of Bacteriology**. v.176, p.1025-1036, 1994.

YE J.; MCGINNIS, S.; MADDEN T.L. BLAST: improvements for better sequence analysis. **Nucleic Acids Research**. v.34, p.w6-w9, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE I – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO GENE *hrpE* DE *H. rubrisubalbicans*

```

10      20      30      40      50      60
GTACCCGACATCGGTAGTACGGATAGCGCACAGGCAGACGCTGTTCGTGGTCGGCCTGGCC
70      80      90      100     110     120
GAATTGGCGTGGCGGCTGGAGCAGGATTTTCTGGGATGTGGGCGCGCTTGC GCGGTTTG
130     140     150     160     170     180
CTGGATATGTCCGAACGAACCCGCATCGATGACGCGCTACCCGCTGCTCGCCGTCGTCCA
190     200     210     220     230     240
GTGAGCGAATCATCGGCCGCCGCCGGCGCGCCCTGCGTTGCTGGCAGTTCTGTTGCACC
250     260     270     280     290     300
CGTGCGCAACAGGGCTGATTTCTCCCAACGTTTTGAGGAAAGTAAAGAACCCATGAGCGA
                                                    hrpE →
310     320     330     340     350     360
CTTTGCCGTGCAGAGAGTGACCCTGCCCGACCATCTGCGTCCAGCCAATGGTGTGTTGCG
370     380     390     400     410     420
CTTGACTGGGCTGACTGTGACCAGCGATGCGGAACAACCTGGCTGCACAGATGCTGGCCCA
430     440     450     460     470     480
GGCCCCGGAAGAAGCTGCGCAAGTACGTAAGCAGGCCGAAGAGGAGGCCGGGCACGTCGT
490     500     510     520     530     540
CATGCGACAGCAGCAGGAGGTGCGCGCAGCAGGGCGCTGTATTGCTGGAAGGGCTGCGGCA
550     560     570     580     590     600
AGCGCAGGACGACATGCTTGAGCGCATCGAGGAAGTGGTGGTGGACCTCGCGCAGGAAGT
610     620     630     640     650     660
TATGGAACGCCTGCTGTTGGAGCTCACGCCACGCGAACGCATTACTGCCATGCTCCGTAG
670     680     690     700     710     720
GATACGCCAGGAGGCGCCGCCCAAGCTGCATGAGGCGGTGCTGTGGGTACACCCCGACGA
730     740     750     760     770     780
TCAGCCTCTGCTGCCGGCCTCATCCTGGGAAATGCAGACCGATTCCGCGCTAGCTCCTGG
790     800     810     820     830     840
CAGCTGCCGGCTGGAAGCCGCCAGCGGAGAGTGGCGCAGCGATTTTGCGCTGGCGGTGCA
850     860     870     880     890     900
GGCCTTGCGTGATGGCTTGGCGGGGGCAAGCGCTCGCCTCAAAGAGCAGGCGCCGTCCTG
                                                    *
910     920     930     940     950     960
AACGGGAAGGTACAGACTTTCCAAAAAATCCGAACCGAATCCCGTGTGCTGCCACCTAC
970     980     990     1000    1010    1020
CTGCCGTAAGCCCCCTGTCATCCACATGAGGAGATGAGCGACATGTCGAGCAATCCGGTA
1030    1040    1050    1060    1070    1080
TTGCAGAATCTGCGTCACATGGACAAGAAGTTCGATGAGATCAGCCAGAAGATCAACGAC
1090    1100    1110    1120    1130    1140
TTTAACCGCCAGCAGGCCGACGCGGAGATGCCCGATCCGGCTGCCTTCATGGATCTGCTG
1150    1160    1170    1180    1190    1200
CAAAAGCAATCTGTACCAAGAGCGCTATGAGCGCCCAATTCAATCTGCTGAAAAGCCG
TTGAAGACG

```

APÊNDICE II – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO GENE *hrcJ* DE *H. rubrisubalbicans*

```

      10          20          30          40          50          60
GGTTATCTAAGGATCCCCAGGGCTGTCTGAGGAACTGGAATCGACACTCCAGCAGTTCG
      70          80          90         100         110         120
ATCATGTATTTCTGCCC GCGTGCATGTGGTACTTCCGGAGCGCATTGCGCCGGGTGAACC
      130         140         150         160         170         180
GATTCAGCCGTCATCTGCCGCA GTTTCGTCAAATACCGACCACCGATGGACGAGGACAT
                                     hrcJ →
      190         200         210         220         230         240
GGTCATGCCGCGCATCCGCAAGCTCGTGGCCTCCAGTATTCCCGGCCTGAGCGGCGAGGA
      250         260         270         280         290         300
GGGGCGGGCCAAGGTAACGGTGGT GATGATGCCGGGTGAAGTCCCCACGGCGGGAATCGA
      310         320         330         340         350         360
ATGGACTACGCTGGGGCCCTTCGTGGTGGCCGTGTCATCGGTGAGAGCACTCGGCTTTAC
      370         380         390         400         410         420
CTTGCTGGGGCTGGGCTTGCTGATCCTGCTGGCAGGTGGCTGGCTACTGGTTCTGAATGT
      430         440         450         460         470         480
CCAGCGCAACCCCAAGCTCATGTTGATGATCGCCCGTCTGTCGATGCGTAAGGCCAAAGC
      490         500         510         520         530         540
CGGCGATCCGAGTGAATCTGCGCCTGCTGCCGCGACCGCAGCCCCAGCGGCGAATAAGCC
      550         560         570         580         590         600
AGCCCAGGCCAAATCGTGAAGAACTTCATTCTGAGCACGAGCCGCTCATCCTGAGCCAG
      *
      610         620         630         640         650         660
GCATTCTCGACTGGTGGTTCGCACCATGGCAATACATCGAAACTCCGGCCTTGCCGGGA
      670         680         690         700         710
ATGAGCGATACGCTCGTGGCGCGGCGTGACAGCTATCGGGCCTGGTGCGAGCAG

```

APÊNDICE III - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO GENE *hrcC* DE *H. rubrisubalbicans*

```

      10      20      30      40      50      60
GGTACTCAACGAAACCAAGTAACACCATGTCCATGGAAAGCCCAGACCACTGTCTGCAGA
      70      80      90     100     110     120
CACTGCCGCTGGATGAACCTGTCTCATCGATGGTGAAACGGTATTTCTTCGAGTCAAGC
      130     140     150     160     170     180
CAGAGGGCGCCGAGCTAGGCGTCTACCTGGCCGGCCAGCCCACCGACAGTGCCTGGCCG
      190     200     210     220     230     240
ACGCCATGCGCGTGAGTTTTTCAGAGTGCCAGGGAATTTGAGGCTGGCCTTGGCTGGGAGC
      250     260     270     280     290     300
AGGATGCGGGACTGGTGCTGTCTGCGCTGGATTGCCGGTGCAGAGTGGCTGGCATGACCTGG
      310     320     330     340     350     360
CTGAGCCATTGGAACAGATCCTCAACCAGCTCGCCCTATGGCGCGCCGCGATGTCCCGCA
      370     380     390     400     410     420
CGCACTCCAGCCAGGATAAACATGCCAAGCGCGACGAAGAACGCTTCTACAAACTGTTGT
      430     440     450     460     470     480
CTCAGTCCGGGGGAATGAAATGAATATCCGCGAGTTGATCAAATCGTGGGGTATGGGCGT
      hrcC →
      490     500     510     520     530     540
GTTGCTGGCCGCGCTGCTGCTGTGGGGGACGACGCTGCATGCAGCAGTGCCGGCAGCATG
      550     560     570     580     590     600
GAAGGACAGCGGATTCTCCATCAATGCCAATGGCATGACGCTCAATGGCGTGCTGGAGGA
      610     620     630     640     650     660
TTTTTCCCGTACCTATGGGGTACGGCTGTCTGATGAGCGGTGAGGGCGAGCGCCTGGTGAA
      670     680     690     700     710     720
AGGGCGGCTCAAAGCCGACAACGGCATTTGAGTTTCTCAACCGGCTCGGTGCGACCTACAA
      730     740     750     760     770     780
GTTTCGCTGGTTCGTCTACAACAACACCCTTTACGTGGCATCGGCTAGTGACAACACCTC
      790     800     810     820     830     840
CGAGCGACTAGAGGTGGGCGAGGATGCGGTGCAGGATGCCAAGGCGGCCCTAGTCGGGCT
      850     860     870     880     890     900
GGGTCTGTATGACGAGCGTTTCGGTTGGGGTGAGCTGCCTGATGAGGGCGTGGTCATCAT
      910     920
CAGTGGCCCCGCGGGGATCCTC

```


APÊNDICE IV - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO GENE *pilN* DE *H. rubrisubalbicans*

```

      10      20      30      40      50      60
TACCGACGGGCGACGATTGACTGGTAGCCTCGTCAAGGCAAGTGGGGCGCACGGCCCCGG
      70      80      90     100     110     120
GGGCGGTGATGCCCTCGGCGCCGCTGGTGACCCACGACACGGGGATCTGGTTGGGCAAGA
  pilN  →
      130     140     150     160     170     180
ATGTGGTCAAGCTGGGGCAGCCGGCATTACCGCCCATCTTTTACGAACCCACCACGTTCG
      190     200     210     220     230     240
ACCGCACCTCTTTTCGCTGAGCGAACTGGCCGAGCGCATCACCTTGCGTACCGGTATCC
      250     260     270     280     290     300
CCAGCAGGGTTACCGCCGACACTCAGGAAGTGGCCGGCATGGCGTTTCGTAATCGCCCGG
      310     320     330     340     350     360
GGCTGACAGGGTTCAATGCCACCCAGCCGCTGCCCCCTGGATTGCCTGGCGAGAATACAC
      370     380     390     400     410     420
CGGCTGCCACACCTGGTACGCCTGCCGCTAGTGCCGCTCGCCTACCGTTACCGGCCGCAC
      430     440     450     460     470     480
CGACGCCGCAACTGCTGTCCCTGCCGGGGGATGCCTCCACGGGCGTACGGATCTCCTATG
      490     500     510     520     530     540
CCAATGGTTTCGCTCAAGGGCTTGCTCGATACCGCAGCTGCGCGTTTCGGCGTCTCCTGGA
      550     560     570     580     590     600
AATACGTTGACGGGACGATTTCAGTTCTTCCACACCGAATCGCGTAACTTCCAGATCAATG
      610     620     630     640     650     660
CCATTCCGGGCGACTCCAATTTACGGCCACCGTGACCAGTGGCGCAACATCCACCGGTG
      670     680     690
GTGTCTCCGGTGGAGGCAGCAGCGGCGGTGGCAGCAG

```

APÊNDICE V - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO GENE *pilN* e *pilO* DE *H. rubrisubalbicans*

```

      10          20          30          40          50          60
GTCGAAGTTCTCCGGGACCACGGCGGTGAATCGATGCCTTGTCTGAACAAGGCAAGGTGC
      70          80          90         100         110         120
GCCGCCAGACCACCGCTTCGGTGGTGACCCTGAACAATCAGCCAGTACCGGTGCAGGTGG
      130         140         150         160         170         180
CGCGCCAGACCAGTTACCTGCAATCCTCGCAGACTTCGATCGTGGCCAGGTTCGGTACCA
      190         200         210         220         230         240
CGACCACCCTGATTCCAGGGGTGGTGACGGCAGGCTTCAATATGAGCATCCTGCCGCACG
                                     pilN →
      250         260         270         280         290         300
TGCTGACCAACGGCACGGTGATGCTGCAGTTCTCTACCGACATCTCCACCCTGCGCGGCA
      310         320         330         340         350         360
TCAGGCAGATCGAAAGCAATGGCAGCCGTATTGAATCCCAGAGCTCGATACCCGCAATT
      370         380         390         400         410         420
TCCTGCAGCGGTGGCAATGAAGTCCAACGAGACACTCATCATCAGCGGCTTTGAACAGA
      430         440         450         460         470         480
CCGATGACAACCTCGATTACAAAGGGGTAGGGACGCCCCGGAATTTCTGCTCGGTGGTG
      490         500         510         520         530         540
GCGTCAATGGCCAGAATAACAAGGAGATTCATCGTCGTGCTCATTACGCCGGTGGCCATGG
                                     *
      550         560         570         580         590         600
CTGCGATCTGAGGAATAGGAACCGAGCCATGGCGAGCTATGTTACCCAGATAGAAAAGCA
                                     pilO →
      610         620         630         640         650         660
CAGGTTTCGTCTGTGGGCTTTTCTGGCAATCCCTGTCGCGTCCGCGCGAACTGAAGAAGGA
      670         680         690         700         710         720
GGCCATTGATCTCGGCCGCAAGATCGATTCCGATCTGCTGGTTATCCGCATGGACCATTC
      730         740         750         760
CAACGCCCAGGCTGGTATTGCGCATAGTCGGGAGGGCGGGCGT

```

APÊNDICE VI – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DOS GENES *hrpX* e *hrcU* DE *H. rubrisubalbicans*

```

      10          20          30          40          50          60
CGCCTACACTTTGCTACCGCCTTTTCGAACCAGGGCATTTCGAAGTGCTGGTCAAGCGTTT


---


hrpX →
      70          80          90          100         110         120
CGGCGAATTTCCTGTGGTACGTCGTAGTCTATGGCGCGCCCGTCATCATTCCCCTGATGCT
      130         140         150         160         170         180
GATCGAATTTCGCCTTTGCCATCATTGGTGTATTCGCCTCCAACCTACAGGTCTCCTTCGC
      190         200         210         220         230         240
CTCGGCACCCATCAAGAGCTTGGTTCGGACTGCTGATTCTGCTGATGTACTGGGCCACTTT
      250         260         270         280         290         300
TTCGCATCACGTGACCGGCGATTTTGCCATTTGCTGGACCTGCTGGCCAGCCTGACGGA
                                                                 hrcU →
      310         320         330         340         350         360
TGCGGGGAAGCGATGAGCGGAAGAAAAGAACGAAGAACCACCCACAAGAAGATCGAGGAT
      *
      370         380         390         400         410         420
GCCAGAAAGAAGGGCCAGATCGCCGTCAGTCGCGACCTGGCGCGTCTGGCGATGCTGGTG
      430         440         450         460         470         480
GCGGTAGCCGAACCTGGCCATGGCGACCGAATCGCTCTGGCGCGGTGCGATTTCCAATCTG
      490         500         510         520         530         540
ATGGAGGCGGTATCCATGGCGTGGGACAGGACTTCATACCAGTGGCCATGACCATCCTCA
      550         560         570         580         590         600
GTTCGGCCGGGATCTTCGTGGCTATCGTCATCGCCATTTGCTTCGTGGTCTGCATCGTCA
      610         620         630         640         650         660
TCGGCGTAGCCGCACACTGGGGCCAGTTCGGAATGCTGGTGGCGACCGAGGCGCTTACGC
      670         680         690         700         710         720
CCAAGTTCGACAAGCTCAATCCGGTCAACGGTCTCAAGCAGATCATCTCCAAGAAGAAGC
      730         740         750         760         770         780
TGGTGGAGCTGATGACCACCGTGGGCAAGGCCTTGTTGATCGGCTGGATCGTCTATGTGC
      790         800         810         820         830         840
TGGTGC GCGGCAAGTTGGCCAATATTGTTTCCCTCTCCTGTGGTGGATCCAAAGGAGAGCG
      850         860         870         880         890         900
TATTACGGGTTTCTGACCATTCTGCGCGCGATCTTCCCCGTCATCATCGTGGTCTGCCTG

```

T
→

APÊNDICE VII – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DOS GENES *hrpQ* e *hrcN* DE *H. rubrisubalbicans*

```

10      20      30      40      50      60
CTCAACGCTGATGACAACCACAAGCGTGATTTCTCCAGCTGAAGATCGACGATTTTCGCG
70      80      90      100     110     120
CGCCTCGGTTTCGATCTGGCTGACCGTTACCGAAGAGGGCAGTGCCTGGCGCGACCCACCC
130     140     150     160     170     180
CCGGAGCCAGCCGACAGCATGGCCGAGGCGCAAGATATTGTGGCACCTGCGACGCCTGAA
190     200     210     220     230     240
GGCAGTAGCGCCGACGGCGCGGTGCCGCACGATACCGTGGTAACGTCCGATGCTGCTACG
250     260     270     280     290     300
GCCACTCCGTGCGGCTGACATCTTGCAGCCCATGCCAGTCAGAGCCAGGCGCAATCGCCGC
310     320     330     340     350     360
CTGCTCCTGCTACCGTTGTCACTGATAGCTCTGCTTTCGGCCGAGCAGCCTATGCCATC
370     380     390     400     410     420
ACGCGCCATTATCCGGCAGGCGGCGAGGAAAGCCTGTCCGCCAATGAGTCACTGCTGGCG
430     440     450     460     470     480
CCGCTCGGTGCCAAGGCAGCCATTGAGCCGCTGCCGCCAAGATGAGTCCCGAGCAGTTG
490     500     510     520     530     540
CGTGCCGCATTTTCGCAAGCGACTGGCTGAGGTGGATCTGCTCAAGCGTTTCAATCTACAA
550     560     570     580     590     600
CTGGAGGATCGTGAGTGGATACTGCAAGCGGCCCTGGATGAGGAAGAGAGCGAACGTTTC
610     620     630     640     650     660
CAACGAATGCTTGGCAGCTTCGTACGCACCCATGACATCGACTTTCCAGTCAAGGTCAAG
670     680     690     700     710     720
ATCGGCAGCGCTGAATCGATGTTGCCGTTCCGCATACAGCAGGTCATTTCCGGCAGCAAT
730     740     750     760     770     780
GCCAGCATCGTCACCGACGATGGCCGTCGTCTCTACATCGGAGACGAATATCGTGGCGTC
790     800     810     820     830     840
GTGCTGGCCGGTATCGACGGCAACCAGGTCAGCTTACCAGGTCGCCACAACATCAACGTT
850     860     870     880     890     900
AGGTGGTGAACGCGATGGCGACAATGACTGTAGCCATCGAGGGTAGCGATCCACTGGAGC
  hrpQ *  hrcN  →
910     920     930     940     950     960
TGAAACTGCAGTACATGCGTCGGCAGCTGGGCGCATGGCGACAGAGCCTGAACCCGCGCC
970     980     990     1000    1010    1020
CGGGTTTCGTCACTTTCGGCAAAGTATCTCAGGTCTTGGGCACGCTGGTGGAAAGCCCACA
1030    1040    1050    1060    1070    1080
TGCCCCCGGTGCAGATCGGTGAGCTCTGCCATCTGCGCGACCCGCACGTGGAGGGACCGC
1090    1100    1110    1120    1130    1140
CCATCCTGGCCGAAGTGGTAGGCTTCACTGACAAGGCCGCGATCCTCTCGGCGCTCAGCC
1150    1160    1170    1180    1190    1200
CGCTGGAGGGGGTCTCCAGCAGTACCATCATCGAACCCTTGCGGCGCGCCACAGCATCG
1210    1220    1230    1240    1250    1260
AGGTCCGGTGATCACCTGTTTGGTTGCGTTCTGGATGGATTTGGACGCTGGATGTTCCGTG

```

1270 1280 1290 1300 1310 1320
CGCCGGCAGCAGCCGAGAACGTGGCGACATGGCGCGCCATGTCGCCGGTGATGCGCGACG
1330 1340 1350 1360 1370 1380
CTCCCAAGGCCACTGACCGGCCGCGCATCTCAGTGCCGCTGGCCACGGGCGTGCGGGCCA
1390 1400 1410 1420 1430 1440
TCGATGGTCTGCTGACCATGGGGTACCGGGCAGCGCATCGGCGTATTTGCCGGCCCTGGA
1450
TGCTGTCTCTTATACACAT

APÊNDICE VIII - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO GENE *hrcV* DE *H. rubrisubalbicans*

```

      10      20      30      40      50      60
CACGAATGCGGAGCTGCAAACGGGCTCATCGCGCACTCGCTGCAACTGCCCCGAAGAATT
      70      80      90     100     110     120
GCGCGGCCCTGCCTGGCCGCGGTCCGTAGGGTCAATGACAACATTGACTGGCGCTTGCGC
      130     140     150     160     170     180
CTGCAACAGATGCGTCGCAGTCACGCCGAAGTCCGTCCAATCAGCAAGACCAGGAAGAT
      190     200     210     220     230     240
GATGAGAAGAAAGAGACCGCATGACGCCATGCCCGATGAACTGCTCATGGCCATCGGTCT
      250     260     270     280     290     300
GGTATGGGGCTACTTCAGCGCCTACCAGTACGAAGCTGCCCATGAGCTGGCCCAAGGTTG
      310     320     330     340     350     360
CCTGCAAGTCTGGCCGACGATCCGAAACTGTTCTGATGGCCTCCTATGCCGCGGCCGA
      370     380     390     400     410     420
ATTACTGGAGCCAGTGGACCGGCAGCGTCTTGAGGCTATGCGCAACAAGGAAAACGAAGC
      430     440     450     460     470     480
CTGGATCGACTTGATCATTTCAGGCTCGATGCTGGCGAGGCGTCCCAGGCGCTTTCCGC
      490     500     510     520     530     540
TACCACTCGCTAGGGGGCGGCATGCAAGGAATCGGGATACTGATGGCGCTCAACAAGTTT
      hrcV →
      550     560     570     580     590     600
GCTGCCAAACTTGCTCAGCGCGCTGAATTGATCGTCGCCGCTTCGTTCATCGGCATCGTG
      610     620     630     640     650     660
TTCATGCTGGTGCTGCCCATGCCGGTATGGCTACTGGACATGCTCATCGCCTTGAGTCTG
      670     680     690     700     710     720
TGTATTTCCGGCCTGATTGTGATCGTGGNCATGTATATGCCCGGTCCGACGGCCTTTTCC
      730     740
ACCTTCCCGGCAGTACTACTGCTGAC

```

APÊNDICE IX – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO GENE *hrpO* DE *H. rubrisubalbicans*

```

      10      20      30      40      50      60
GCGCGCTGAACAAGTACTAGCTTTTCCTGCGCCAGGACACTAGCACAGTGCCCCATTCCAGCC
      70      80      90     100     110     120
CACGCTGGACAAGCTCATGGAAGTGCAGGCATGACGATCGGACAGCAGTTCGGCGGGTGGG
                                hrpO  →
      130     140     150     160     170     180
ATGGGGCGCCGCCCCCGCCGCGAGGTCATTGATGTCCCCGAACGCAAGCGCGAGGACCGT
      190     200     210     220     230     240
CGGCTCGATCAGTTGCTCCATGTGCGCAAGCAACGTCTGGGACGTCTGGAGCGCGAACGC
      250     260     270     280     290     300
AACGAAGCCCGCCAAGCCTGGCGCGCGTACGCAACCAATTGCAGCAGGCCCCGGCAACTC
      310     320     330     340     350     360
TGGCGCGACATGCTTGCCCGCACGCAGGAGCAATGGCAGCAGTACGCCGCGAGTTCATG
      370     380     390     400     410     420
CAGATGACGCTAACGACCGGTCAATTCAATCGGGCCAAGGCGCTCTACAAGCGTATGCAA
      430     440     450     460     470     480
GCTGAAAGCGCTCAACAGTATCTACGATGTCAGGAATGGGTTCGAGCGCTGCCGTCAGGCG
      490     500     510     520     530     540
CGTGCGGTTTTTTTTTGAGGCCCGACGCAAAGTGCTGGAAGCTAACCGGCAGCAAGAAAAA
      550     560     570     580     590     600
CTGAGCGTGTTGCGCGATCAGATGCGTGCTCAGGAACAGATCATGGAGCAATGAACGATG
                                                *
      610     620     630     640     650     660
CCACCTCAACCTATCTCCTCGTTCGTGGACACCTTCTACGGCGAGACCATGCCTGTGCGG
      670     680     690     700     710     720
CGGCCACCCGCCAAACGCGTACCGCCATTCACTGCGCACTTGCCGCCATGCCGCCGGCG
      730     740     750     760     770     780
GCTCCATCCCATAGTCAGACAAGCCCTCAGATGAATGCGCGTGCACGTACTGCAGCGGCT
      790     800     810     820     830     840
CCTAGACGTGTGGCCCAGGAGCGATCCTCCATCTCGAGCAGCAGCGAACGGGTGCCTGCG
AATCCCA

```

APÊNDICE X - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA PiIN DE *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

	10	20	30	40	50
Pseudomona	MSMPFMRQTA	LSLAVLTASA	CS--VQRVDE	AAARAEATAD	SAGRYAAIQR
Hseropedic	MNLASMKLPI	LLPLVVVMAG	CSALADRIEG	NVNQEGDRAT	RLSRDVGRTA
Hrubrisuba	-----	-----	-----	-----	-----
Clustal Co					
	60	70	80	90	100
Pseudomona	NKQQQERRDT	VIFSDKPWVS	TQPVVARRGI	PTKYDCEVAY	RPAGSVGIAE
Hseropedic	PGSVLPSTPL	VKHESGIWLG	KTAIKLGQPS	LPPIFYEPTT	FDRTINSLTE
Hrubrisuba	----MPSAPL	VTHDTGIWLG	KNVVKLGQPA	LPPIFYEPTT	FDRTLFLSLSE
Clustal Co		* .. * : :	. :	* :	..**
	110	120	130	140	150
Pseudomona	IAQYISRQCG	IPVLVSPDAL	NPGLLNANAP	AQ-----GN	NAPPISTAPN
Hseropedic	LAERITLRSG	LPSKVTPDAL	EVSSAAFRLR	GGGMPLRPGM	MGAGPAPAGG
Hrubrisuba	LAERITLRTG	IPSRVTADTQ	EVAGMAFRNR	PG----LTGF	NATQPLPPG-
Clustal Co	::* * : *	::* * : *	: . .	*
	160	170	180	190	200
Pseudomona	PDSLAGLLPA	GITGGSNLAQ	ASQG---RS	SDFASMLTPN	LVSGLRFT--
Hseropedic	APVAMLPLPL	GAPGEGQSSP	VQPGRGPAAS	TGQTQPTFTD	LPNGVRIAYN
Hrubrisuba	--LPGENTPA	ATPGTPAASA	ARLP-LPAAP	TPQLLSLPGD	ASTGVRISYA
Clustal Co	* . *	: .	. :	: .	.***:
	210	220	230	240	250
Pseudomona	-GKASGLLDE	VTARLGLTYR	FNPTSRSVQV	SYFDTKVFDV	YAFGDVQEIK
Hseropedic	SGSLKGLLDT	AAARFGVSWK	FSEG--VIQF	FHTESRNFQI	SAIPGDSTFS
Hrubrisuba	NGSLKGLLDT	AAARFGVSWK	YVDG--TIQF	FHTESRNFQI	NAIPGDSTFT
Clustal Co	* . *****	..*****:	: * .	: : : * : :	* : . . :
	260	270	280	290	300
Pseudomona	STVRSGMTTS	SGSGSGSSSG	SSSGSSSSGV	SGDSGSNQST	TVTLNTSILT
Hseropedic	ATVTSGATST	GGTAGTNGGG	GSGGGSGGAG	SGGGGVNANN	TQNTAVASKL
Hrubrisuba	ATVTSGATST	G---GVSGGG	SSGGG-----	-----	-----
Clustal Co	::* * * : : *	.*.*.		
	310	320	330	340	350
Pseudomona	DIQSNVRAML	STS--PPGRM	YLSPTGTLT	VTDRPDVLSN	VETYLAKTNH
Hseropedic	SVYTGIESAI	KVMLSPYGKV	LASPATGSIT	VVDTPDSLDR	IATYIDGENK
Hrubrisuba	-----	-----	-----	-----	-----
Clustal Co					
	360	370	380	390	400
Pseudomona	AITQQVLFNV	KVFEATLTD	DQLALNWAAV	YNSLSTKWGL	SLSNTVPGIS
Hseropedic	SLSRQIAINV	TVLSVTLSDD	DQYGINWNAV	YRSLNSTFGI	ANAYEGA-LS
Hrubrisuba	-----	-----	-----	-----	-----
Clustal Co					


```

                410          420          430          440          450
Pseudomona   SSAISGSVGI VDTANSWAG  SNAIIQAI AE  QARISNVRSP SVTTLNLQPA
Hseropedic   TGLVSFTAGI PSSGTSGFSG SQAVIQALSQ QGKVRRTTA SVVTLNNQPV
Hrubrisuba   -----
Clustal Co

                460          470          480          490          500
Pseudomona   PLQIGNVQGY IPSVQTNNTA SVGSSTAITP GTITSGFNMT LQPRLMDDDE
Hseropedic   PVQVARQTTY LQSLQSSLVA QVGTTTSLTP GVVTAGFNMS ILPHMLTNGT
Hrubrisuba   -----
Clustal Co                                     *: : *::: .

                510          520          530          540          550
Pseudomona   MLLMVSINMS SKPTFEPF TS  NGSS----- -VQIPNYDAK SLSPKVKLRS
Hseropedic   VMLQFSTDIS TLRRI RQITA  STDSSGRATA LIESPELDTR NFLQRVAMKS
Hrubrisuba   VMLQFSTDIS TLRGIRQIES NGSR----- -IESPELDTR NFLQRVAMKS
Clustal Co   ::: .* ::: :  . : : . .          :: *: *:: :. : * :::

                560          570          580          590          600
Pseudomona   GQTLILSGFE ELSDN TDKIG  TGSPGFFGLG GGRKRTSSKS VLVVLITPIV
Hseropedic   NETLIISGFE QTDENLGRSG VGDPKNLLLG GGVSAATNKE VIVVLITPVA
Hrubrisuba   NETLIISGFE QTDDNLDYKG VGTPRNFLLG GGVNGQNNKE IIVVLITPVA
Clustal Co   .:****:**** : .:* . * . * * : ** ** . . . . : :*****:

Pseudomona   TN---
Hseropedic   MGSAS
Hrubrisuba   MAAI-
Clustal Co

```

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizados espaços. Estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências. O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e – (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína PilN de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: refYP_234605.1 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.

APÊNDICE XI - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrcC DE *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

```

                10          20          30          40          50
Erwinia am      MVEKRELRCR LLGALLMLCA TLPAG--AQT PADWKEQSYA YSADRTPLST
Pseudomona      -----MRKA LMWLPLLLIG VIPATW-AVT PEAWKHTAYA YDARQTELST
Pseudomona      -----MRKA LMWLPLLLIG LSPATW-AVT PEAWKHTAYA YDARQTELAT
Hseropedic      MNAREIIKSW GMGLLLAGLL LWGTTLHAAV PPAWKDGGFS ISANGMTVRG
hrbrisubal      MNIRELIKSW GMGVLLAALL LWGTTLHAAV PPAWKDSGFS INANGMTLNG
Clustal Co      ::      :      *      :      *      .      *      **      .::      .*      :

                60          70          80          90          100
Erwinia am      VLQDFADGHS VDLHLGNVED TEVTAKIRAE NASAFDLRLA LEHHFQWFVY
Pseudomona      ALADFAREFG MSLDMSPVQG -KLDGRIRAQ NPEEFLERLS QEYHFQWFVY
Pseudomona      ALADFAKEFG MALDMPPPIG -VLDDRIRAQ SPEEFLDRLG QEYHFQWFVY
Hseropedic      VLEEFSTRYTG VRLNLSADGA QIVKGRLKAD NGVEFLNRLT GAHRMRWFVY
hrbrisubal      VLEDFSTRYTG VRLSMSGEGE RLVKGRLKAD NGIEFLNRLG ATYKFRWFVY
Clustal Co      .* :*: .. : * :      :      :*: *      .      **:*      :*:***

                110         120         130         140         150
Erwinia am      NNTLYVSPQD EQSSERLEIS PDAAPDIKQA LSGIGLLDPR FGWGELPDDG
Pseudomona      NDTLYVSPSS EHTSARIEVS PDAVDDLQTA LTDVGLLDKR FGWGSLPDEG
Pseudomona      NDTLYVSPSS EHTSARIEVS SDAVDDLQTA LTDVGLLDKR FGWGVLPNEG
Hseropedic      NDTLYVTPAA DNTSSRMQVG EDAVMDAKAA LVGLGLFDER FGWGELPDEG
hrbrisubal      NNTLYVASAS DNTSERLEVG EDAVQDAKAA LVGLGLYDER FGWGELPDEG
Clustal Co      *:*:*:*: . :*: *:*: . ** . * : * * * .:* * * * * * * * * *

Erwinia am      VVLVTG---
Pseudomona      VVLVRG---
Pseudomona      VVLVRG---
Hseropedic      VVIVSG---
hrbrisubal      VVIISGPRG
Clustal Co      **:: *

```

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências.

O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e - (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrcC de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: gbAAB49179.1 (*Erwinia amylovora*), refYP_234292.1 (*Pseudomonas syringae pv syringae*), gbAAO54911.2 (*Pseudomonas syringae pv tomato*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.

APÊNDICE XII - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrpE DE *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

```

                10          20          30          40          50
Erwinia am      ----- -MLTRRRRITL
Pseudomona      ----- -MLAKRSIAL
Pseudomona      MSSSNKESAS DLIRAKDAAL LDIWALPSFD PHVEPEPEPE PELVDEPAEM
Hseropedic      -----LAPCQ ARRCCLDPY PYFLPLPEAS SYVAP---AT SSFLAAELCL
Hrubrisbal      -----M SDFAVQRVTL
Clustal Co      :           :

                60          70          80          90          100
Erwinia am      LNAEADLAPV VSQAQLCIQQ QGQDILEQAR QQAQAMLEEA ERQAEVEMLN
Pseudomona      TAATLLREPI LRREDIADSL LARDILADAR QQATQILALE QEKAE----H
Pseudomona      EEVPLDEVQP LTLEELLESIR -QEAWNEGFA TGEKEGFHST QLKVRQEAQEV
Hseropedic      PPSLRPRHGV VSSVDFRVTE DARLAAAQLV QQAQAEAAAGI REQARADALA
Hrubrisbal      PDHLRPANGV LRLTGLTVTS DAEQLAAQML AQAREEAAQV RKQAEQEEAGH
Clustal Co      :           :           .           . :..

                110         120         130         140         150
Erwinia am      AQQRAEQAFW QQADTLLQSW QQQYQQLEAQ VLEVMSVLT QALDQLLTDV
Pseudomona      LQQQALAQFW ENANAFLGEL QVQREALQEQ AMTAVEELLS ESLRHLDDDT
Pseudomona      VLAQKVASLE QLMGNLLAPI AEQDTQIEKA VIYLVEHIAR KVIQRELVTD
Hseropedic      ALHDEERRIA HEAGQLLARL REREASMLEG VAGLAVDLAH SIFDRLLVDT
Hrubrisbal      VVMRQQQEVA QQGAVLLEGL RQAQDDMLER IEEVVVDLAQ EVMERLLEL
Clustal Co      .           .           :*           :           :           . : : *

                160         170         180         190         200
Erwinia am      PQTQRLAAIL RQLLRAKTLT EQGSLYCHPA QHLEIADWLR -SHDHLAWQL
Pseudomona      TLAERARALA RNLAASQLNE AVATLSVHPQ IADAVAEWLA DSRFSEHWQL
Pseudomona      S--AQIASVL RDALKLLPMG AQNVRIFINP QDFLLVKAMR -ERHEESWKI
Hseropedic      TARERVMAAC RRVREEAPPK LTEAVAWLHP EDAASLAQED ----ALPWEL
Hrubrisbal      TPRERITAML RRIRQEAPPK LHEAVLWVHP DDQPLLP--- ----ASSWEM
Clustal Co      .           :           :           *           :           :           *::

                210         220         230         240         250
Erwinia am      QPDESLAQDS LKLVTANGEL SLDWQQAVRQ LLP-----
Pseudomona      KRDIATIASDS LRLSDANGAF DIAWADLRKG LLG-----
Pseudomona      VEDEDLLPGG CRIETEHSRI DASVETRIAL AISKMHDLQH EQVTHPAAAD
Hseropedic      RTDARLAQGS CRLEAASGEW RADFSLAAEA LRATVQQWNA PGGGATEDAC
Hrubrisbal      QTDSALAPGS CRLEAASGEW RSDFALAVQA LR-----
Clustal Co      *           :           ..           ::           .

                260         270
Erwinia am      -----PQTAS -----
Pseudomona      -----VEPAA -----
Pseudomona      LSVDLDVSPG KASNAEESDA DTLDAP
Hseropedic      GVGQDDELDD DPDQEEEDGE QS----
Hrubrisbal      -----DGLAG ASARLKEQAP S-----
Clustal Co      :

```

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências.

O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e – (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrpE de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: gb|AAB49176.1 (*Erwinia amylovora*), refYP_234289.1 (*Pseudomonas syringae pv syringae*) e refNP_791213.1 (*Pseudomonas syringae pv tomato*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.

APÊNDICE XIII - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrcJ DE *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

```

                10          20          30          40          50
Erwinia am      -LDPDVIEPR IRRMVASSLP GLAGRSD--K DLAIIVFVPAE SYQDKPPQVS
Pseudomona      ALDPDSVRGR IQQMVASSIP GMSTQSAESK KFSIVFVPAT EFQETTQWVS
Pseudomona      ALDPDSVRGR IQQMVASSIP GMSTQSVDSK KFSIVFVPAA EFQETTQWVS
H seropedi      PLDEDAVMPR IRRLVASSIP GLASEDG-RS KVSVMMPGE PPTPGIEWTM
H rubrisub      -MDEDMVMPR IRKLVASSIP GLSGEEG-RA KVTVMMPGE VPTAGIEWTT
Clustal Co      :* * : * *::***** *:: .. ..::*::*. .

                60          70          80          90          100
Erwinia am      FGPFLVTPER S--AQLSWLS GMIGVL---- ----- --ILMVVAGV
Pseudomona      FGPFKLDSAN LPFWNLMLWL VPVGLA---- ----- --VLLLIIAL
Pseudomona      FGPFKLDSTN LPFWNLMLWV APVGLA---- ----- --LVLLIGAL
H seropedi      LGPFTVAVSS AGGLALTMSA LLLTTLSSLG YIGLQRALRH PRVARMVAEF
H rubrisub      LGPFVAVVSS VRALGFTLLG LGLLILLAGG WLLVLNVQRN PKLMLMIARL
Clustal Co      :*** : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

                110          120          130
Erwinia am      LGWPHWQR-- -----YRQRQ QPPPPGQNNE ---
Pseudomona      LLRSDWRASV LGRIGLAGRS RSTV PARA-- ---
Pseudomona      LVRSDWRASL LRRIGFGSRG RSTL PARA-- ---
H seropedi      AARRIKKAQD KAQAKAQGQA KPQAPEPTAG RGT
H rubrisub      SMRKAKAGDP SESAPAAATA APAANKPAQA KS-
Clustal Co      .

```

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências.

O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e – (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrcJ de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: gbAAB49174.1 (*Erwinia amylovora*), gbAAY36249.1 (*Pseudomonas syringae pv syringae*) e gbAAO54906.1 (*Pseudomonas syringae pv tomato*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.

APÊNDICE XIV – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrcU DE *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

	10	20	30	40	50
Erwinia am	-MAEKTEKPT	AKKLQDARRK	GQVPQSQDVP	KLLICAGVVE	TVLALDDVGM
Pseudomona	-MSEKTEKAT	PKQLRDAREK	GQVQSQDLG	KLLVLMVAVSE	ITLALADESV
Hseropedic	MSDDKNEEPT	DKKIEDAKKK	GQIAVSRDLA	RLVTLVAVME	AALAADSLWR
Hrubrisuba	-MRGSDERRK	ERRTHPQEDR	GCQKEGPDRR	QSRPGASGDA	GGGSRGTGHGD
Clustal Co	. * . .	:: . . :	* . *	: .	: .
	60	70	80	90	100
Erwinia am	QKLQALMMLP	-----LARIG	QPFELALSEV	VSSAIILVAT	FCGLTVAIAA
Pseudomona	NRLEALLSLS	-----FQGID	RSFAASVELI	ASEGLSVLLS	FTLCSVGIAM
Hseropedic	GAVFNLMEGG	-----VLGVG	QDFQTAMNNQ	LTAALILLAV	AFFAVLVICP
Hrubrisuba	RIALARCDFQ	SDGGGIHGVG	QDFIPVAMTI	LSSAGIFVAI	VIAICFVVCII
Clustal Co		. : :	: * : . . :	. : .	. : .
	110	120	130	140	150
Erwinia am	LLRIIGGWIQ	YGPLFAPEAL	QPDFNRLNPI	NQFKQMFSVK	KLSEMLNSIV
Pseudomona	LMRLISSWMQ	IGFLFAPKAL	KIDPNKINPF	SHAKQMFSGQ	NLLNLLLSVL
Hseropedic	LAAVVGHWGQ	FGMLIATEAL	EPKLDKLNVP	NGIKQIFSCK	KLVELFITVG
Hrubrisuba	VIGVAAHWGQ	FGMLVATEAL	TPKFDKLNVP	NGLKQIISKK	KLVELMTTVG
Clustal Co	: : . * * * * . : : * * * * .	* * . * . : * * * * .	. : : * * * .	. * * : * * : : * * : : :	: * : : : :
	160	170	180	190	200
Erwinia am	KAVAICTIFY	LVLTPDLESL	SRLAYGDLDS	FWPAVETLLI	HVSRQTLTLL
Pseudomona	KAIAIGATLY	VQVKPVLGTL	VLLANSDLTT	YWHALVELFR	HILRVILGLL
Hseropedic	KAALIAGMMY	SAIHSQLGAI	FTLAGGEPKD	VYEAFTVLLR	NIFHLIIVVC
Hrubrisuba	KALLIGWIVY	VLVRGKLANI	VSLSCGDPK-	-----	-----
Clustal Co	** * . * : * : * : . :				
	210	220	230		
Erwinia am	LVLTLDFGL	QKYFFIKQQR	MSHQDIRDEH	KQSEGD	
Pseudomona	LAIAMIDFAM	QKYFHAKKLR	MSHEDIKKEY	KQSEGD	
Hseropedic	LVLGVIDYAV	QKYFHKKDLM	MDQEEIKREF	KESEGD	
Hrubrisuba	-----	-----ESVLR	VSDHSARDLP	RHHRGL	
Clustal Co		. : : : .	: : . *		

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências.

O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e – (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrcU de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são:

gbAAB06008.1 (*Erwinia amylovora*) e refYP_234297.1 (*Pseudomonas syringae pv syringae*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.

APÊNDICE XV - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrpX DE *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

	10	20	30	40	50
Pseudomona	-GLDVFLEQL	NQTMQHMLLY	AAPFIALLLL	IEAAFIIIGL	YAQQLNVSIL
Pseudomona	EGLDVFLGQL	NQTLQHMLLY	AAPFIALLLL	IEAALAIIGL	YAQQLNVSIL
Erwinia am	EGFKQYLALL	ADTFTHIIY	AGPLVALLLL	LDFSIAILSL	YSPQLQVFVL
H.seropedi	GHFDVLVKRF	GELLWYIVVY	GAPVLIPLVL	IEFGFAIVGV	FASNLQVSFA
H.rubrisub	GHFEVLVKRF	GEFLWYVVVY	GAPVIIPML	IEFAFAIIGV	FASNLQVSFA
Clustal Co	:. : :	: : : : : *	..*.: ** :	:.***.: :	: : ** *

	60	70	80	90	
Pseudomona	AMPAKSMAGL	AFLLIYLP	LELGTGQLL	LVDLKSLLTL	LVQVP
Pseudomona	AMPAKSMAGI	AFLLVYLP	LELGTGELSK	LADLKSILGF	VVQVP
Erwinia am	SVPAKCLVGL	LFFVLYIPTL	NALGEDRILQ	LRDLSKLLPL	ILGGH
H.seropedi	SAPVKSLVGL	LIMLLYWSTF	SHYVAGDFAH	LLDLLTVLMA	QR---
H.rubrisub	SAPIKSLVGL	LILLMYWATF	SHHVTGDFAH	LLDLLASLTD	AGKR-
Clustal Co	: * * . : . * :	: : : * . * :	. : : * ** *		

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências.

O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e - (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrpX de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: gbAAB06007.1 (*Erwinia amylovora*), refYP_234298.1(*Pseudomonas syringae pv syringae*) e refNP_791220.1 (*Pseudomonas syringae pv tomato*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.

APÊNDICE XVI - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrpO DE *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

```

                10          20          30          40          50
Pseudomona  -----MDEP LEDDP----- ---QQVALQQ VIGLLTPLRQ HRQASAERAH
Pseudomona  -----MDET LEEDP----- ---QREALEQ VISLLTPLRQ HRQASAERAH
Erwinia am   ---MPLIDHE LDHQPD---- --VQRQNLQQ ALNVLMPIRR QRMNRAQRQL
H.rubrisub  MTIGQQSAGG MGRRPRREVI DVPERKREDR RLDQLLHVRK QRLGRLERER
Clustal Co   :      *          ::      ::      :. *   **:  :*   :*

                60          70          80          90          100
Pseudomona  RQAQLELKSM LDHLAETRAS LNQERDNHKR RRESLSHAHL QKTLSLTDVD
Pseudomona  RQAQVELKSM LDHLSETRAS LDQERDNHKR RRESLSQDHL QKTISLNDVD
Erwinia am   RQQQMQVEQA RQHQLAQQQQ LTQYQQDYQQ QRD----QFQ QRQPSREKLT
H.rubrisub  NEARQAWRAS RNQLQQARQL WRDMLARTQE QWQSRREFM QMTLTTGQFN
Clustal Co   .: : .      ::      :      :      :. : :      . * : ..

                110         120         130         140         150
Pseudomona  GWHEKERTML DRLACIRQDV EQQQMRVAEQ QALLEQKRLQ AKASQRAVEK
Pseudomona  RWHEKEKNML DRLAFIRQDV QQQQLRVAEQ QTLLEHKRLQ AKASQRAVEK
Erwinia am   QRLASEQQAL QAVGLQQQQC QQAQQACEEA ASELEQAAQR ARQQQKAVEK
H.rubrisub  RAKALYKRMQ AESAQQYLRC QEWVERCRQA RAVFFEARRK VLEANRQEQK
Clustal Co   :      .      ::      :      : : . : . : : **

                160
Pseudomona  LACMEETLNE EG-----
Pseudomona  LACMEETLNE EG-----
Erwinia am   LEYLSEHLEE A-----
H.rubrisub  LSVLRDQMRA QEQIMEQ
Clustal Co   * : : :.

```

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências. O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como: * (asterisco) , : (dois pontos) e – (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrpO de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: gbAAB06002.1 (*Erwinia amylovora*), gi66044463refYP_234304.1 (*Pseudomonas syringae pv syringae*) e gi28868607 (*Pseudomonas syringae pv tomato*).

APÊNDICE XVII - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA *hrpQ* de *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

```

                10          20          30          40          50
Pseudomona    MFELRVLNGQ HQGAALPLIG E-QWSIGSAQ QQDLALDDSG VESLHCRLQR
Pseudomona    MFELRVLNGQ HQGAALPLIG E-QWSIGSAG QHDLALDDAG VESLHCRLQR
Erwinia am    MHELRLVLTGL HRGAALPLSG Q-QWWIGAAQ DADLALFDPG IKDRHCRLSK
Hseropedic    MQELRILNGY HRGATLPLAD SGERILGAE E DADVVLADPG IAGQHARLAL
Hrubrisuba    -----LN-- -----
Clustal Co    * .

```

```

                60          70          80          90          100
Pseudomona    LDDSWTLNAE EGAVCDEEGH -SQASVDLTL NTAFMLGSVW LCVSPAGDEW
Pseudomona    VDDNWTLNAE QGAVCDEQGN -ARPSIDLTL NNAFMLGSVW LCVSPAGDEW
Erwinia am    TDLGWVETAL EGPLNDNEQN RCEQLTDLQP GTAFALGHIW LSIVSASMPW
Hseropedic    TPEGWTLTAM DGCLRRADSN RPESALQLAF GELARADRIW LTVVDQDAPW
Hrubrisuba    -----ADDN HKRDFLQLKI DDFARLGSIW LTVTEEGSAW
Clustal Co    . . . . . : . : * : . *

```

```

                110         120         130         140         150
Pseudomona    PSVPAVIPKQ PQAEAEPARH EAPLEKVKSR SQFLNRTTGI IAGLLVGVIG
Pseudomona    PSVPAVIPKQ PEAESGQARN DVPLEKVKSR SQFLNRTTGI IAGLLVGVIG
Erwinia am    P----- EENDEPMQEE EIPLAGAAAV AVATDDKPAA VAATLE----
Hseropedic    TDPPPEPVDT PHSSGDQEGP PADQETAYSD ALPLPATDED EPQQQAPAPT
Hrubrisuba    RDPPPEPADS MAEAQDIVAP ATPEGSSADG AVPH--DTV VTSDAATATP
Clustal Co    : . . . .

```

```

                160         170         180         190         200
Pseudomona    SAWSLTRPAA IVLDQG---P AHIASAMTTA PGMNNAAPKT SQPAAKPAGP
Pseudomona    SAWSLTRPPA IAMDQS---P AHLAAATTEA S-----PDT PKAPARAANP
Erwinia am    -----KRPLP LWAKAV---Y LLLSLLLVM L-----GWLL QDSIASPSAP
Hseropedic    PDDATAAEP A LARRGRGYRM VLLPFFMATA LTGAAAYALS SH-PAPADEQ
Hrubrisuba    SADILQPMPV RARRNR--RL LLLPLSLIAL LSAAAAYAIT RHYPAGGEES
Clustal Co    : . . . . *

```

```

                210         220         230         240         250
Pseudomona    ATDKRVRLA- ----- ----SMEAVR HQLTTMLSDR -MLTDVSVAE
Pseudomona    VTDNRIRLS- ----- ----SADAVR HQLSTMLSDR -LLTDVSVVEE
Erwinia am    PAPGKPLLS- ----- ----SVERTR QVVTSMMLDR GLDRSVTLSS
Hseropedic    ARARAEELKR LAALP----- -RKLPAEELE AALRKRLAEV DLLSRMTLDL
Hrubrisuba    LSANESLLAP LGAKAAIEPP AAKMSPEQLR AAFRKRLAEV DLLKRFLNLQL
Clustal Co    * . . . . * : : . . :

```

```

                260         270         280         290         300
Pseudomona    TPEGLMLNGH LKEESLVVYQ RMLQRFKDRY DSPVTVLDNV ASARNLTPFV
Pseudomona    TPDGLILNGD LKEESLLVYQ RMLQRFKALY DSPVTVLDNV GSNRNTLPFV
Erwinia am    DSNLTLTSGS INSEDNRLE RMLANLYQHF DVKLP IHNRA TTVSMRLPFT
Hseropedic    REGAWTLRGA MGEDDAERLQ RMLRDFAKAY VIDFPIDVKI GSPESMLPFR
Hrubrisuba    EDREWILQAA LDEEESERFQ RMLGSFVRTH DIDFPVKVKI GSAESMLPFR
Clustal Co    * . : . . : *** : . . . : . : ***

```

```

                310          320          330          340          350
Pseudomona  VVQIMTGPHA HLVTADGRRM YVGDEKDGLR LTKIDDQRLQ FDGDRHIEVT
Pseudomona  VVQIMTGPHA HLVTADGRRV YVGDEVDGLR LTRIDNQLRQ FDGDRHIEVN
Erwinia am   IVQISSGPHA NIVTADGQRI FIGDEIDRLR LVAINADSLE FAGRENIRVK
Hseropedic  IVQVLNGSDP SIVTDDGRRR YVGDEYRGVR LAAVAGNQIR FTGKQALNVS
Hrubrisuba  IQQVISGSNA SIVTDDGRRR YIGDEYRGVV LAGIDGNQVS FTGRHNINVR
Clustal Co  : * : . * . . . : ** * : * : : : * * . : . *

```

```

Pseudomona  W
Pseudomona  W
Erwinia am   W
Hseropedic  W
Hrubrisuba  W
Clustal Co  *

```

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências.

O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e – (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrpQ de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: gbAAB06000.2 (*Erwinia amylovora*), refYP_234306.1(*Pseudomonas syringae pv syringae*) e refNP_791228.1(*Pseudomonas syringae pv tomato*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.

APÊNDICE XVIII - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

```

                10          20          30          40          50
Erwinia am    ---MVMSALQ QRLTQWAQQH QRR----- -LERYAPVSR YGRVTGISGI
Pseudomona   -----
Pseudomona   -----MN AALNLWKDAH ARR----- -LSEYCAVRV IGRVSAVRGI
Hseropedic   -----
Hrubrisuba   MATMTVAIEG SDPLELKLQY MRRQLGAWRQ SLNPRPGFVS FGKVSQVLGT
Clustal Co

                60          70          80          90          100
Erwinia am    LIECILPGAR IGDLCRIQRS --DGSVVLSE IVGFSPEKIL LSALGALDGI
Pseudomona   LLECKIPAAK VGDLCEVSKA --DGSFLLAE IVGFTQECTL LSALGAPDGI
Pseudomona   LLECKIPSAK VGDLCEVSKA --DGSLLLAE IVGFTQECTL LSALGPPDGI
Hseropedic   -----MPPVQ IGELCNLFNP EQPGKTMLAE VVGFTDKASI LSALSPLIEGV
Hrubrisuba   LVEAHMPPVQ IGELCHLRDP HVEGPPILAE VVGFTDKAAI LSALSPLIEGV
Clustal Co    :* .: :*:**.: . * :** :***: : : ****.. **:

                110         120         130         140         150
Erwinia am    SQGATIVPLY LPHSICVSEQ LLGSVLDGFG RALEPGGHS AFAEPTQVRA
Pseudomona   QVGAPIRPLG IAHRIGVDDT LLGCVLDGFG RPLLGDC LGA FAGPDDRRDT
Pseudomona   QVGAPIRPLG VAHRIGVDDS LLGCVLDGFG RPLMGDC LGA FAGPEDRRTT
Hseropedic   STRTVIEPLR RSHSIEVDGH LFGCVLDGFG RWMFR-APAA QENVATWRAM
Hrubrisuba   SSSTIIEPLR RAHSIEVDGH LFGCVLDGFG RWMFR-APAA AENVATWRAM
Clustal Co    . : * ** . * * * . : * : * . * * * * * * * * * * * * * * * *

                160         170         180         190         200
Erwinia am    VPVLNDAPPP TERPRITTP LPTGLRAIDGL LTIGNGQRVG IFAGAGCGKT
Pseudomona   LPVIADALPP TQRPRITRSL PTGIRAIDSA ILLGEGQRVG LFAGAGCGKT
Pseudomona   LPVIADALPP TQRPRITRAL PTGIRAIDSA ILLGEGQRVG LFAGAGCGKT
Hseropedic   SPVIRDAPPA TSRPRIATPL PTGVRAIDGL LTMGMGQRIG VFAGPGCGKT
Hrubrisuba   SPVMRDAPKA TDRPRISVPL ATGVRAIDGL LTMGY-----
Clustal Co    **: * * . * . * * * : * . * * * * * * . : : *

                210         220
Erwinia am    TLLAELARNT PCDAIVFGLI
Pseudomona   TLMAELARNM DCDVIVFGLI
Pseudomona   TLMAELARNM DCDVIVFGLI
Hseropedic   TLMAAIARGC QAEIVFGLI
Hrubrisuba   --RAAHRRIC R--PWMLSLI
Clustal Co    * * . : . * *

```

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências. O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e - (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.

- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrcN de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: refNP_791227.1 (*Erwinia amylovora*), refYP_234 305.1 (*Pseudomonas syringae pv syringae*) e refNP_791227.1 (*Pseudomonas syringae pv tomato*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.

APÊNDICE XIX- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA *hrcV* de *H. rubrisubalbicans* E OUTRAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

```

                10          20          30          40          50
Hseropedic    ---MGIVMLL NKFAIQLGKR AELLAAALVI GIVFMLVLPM PIWLLDILIA
Erwinia am    --MSSLFVWL NRLAISAMQR SEVVGAAIVM SIVFMMI IPL PTGLIDVLIA
Pseudomona    --MNQIINFL NMVALSAMRR SEVVGAFVVI AIVFMMITPL PTGLVDVLIA
Pseudomona    --MNRVINFL NMVALSAMRR SELVGAFVVI AIVFMMITPL PTGLIDVLIA
Hrubrisuba    MQGIGILMAL NKFAAKLAQR AELIVAAFVI GIVFMLVLPM PVWLLDMLIA
Clustal Co    :. * * .* . :* :*:: * :*: .*****: *: * *:::***

                60          70          80
Hseropedic    MSLCASGLIV VVAMYMAGPT AFSTFPAVLL
Erwinia am    LNICISSLLI VLAMYLPKPL AFSTFPSVLL
Pseudomona    VNICISCLLI MLAMHLPRPL AFSTFPAVLL
Pseudomona    VNICISCLLI MLAMHLPRPL AFSTFPAVLL
Hrubrisuba    LSLCISGLIV IVXMYMPGPT AFSTFPAVLL
Clustal Co    :.* * *::: :: *::. * *****:***

```

Entre as seqüências de aminoácidos é possível observar traços, os quais são simbolizam espaços, estes espaços são inseridos pelo programa para melhorar o alinhamento das seqüências.

O resultado do alinhamento das seqüências de aminoácidos é representado pela linha Clustal Co, a qual apresenta sinais indicativos como : * (asterisco) , : (dois pontos) e – (traço) .

- O asterisco (*) inidica aminoácido conservado.
- Os dois pontos (:) indica que há prevalência de um aminoácido na maioria das seqüências.
- O traço indica que os aminoácidos alinhados diferenciam por um nucleotídeo no códon que os codificam.

As seqüências de aminoácidos das proteínas homólogas a proteína HrcV de *H. rubrisubalbicans* foram retiradas do banco GenBank. Os números de acesso das proteínas homólogas são: gbAAB05999.2 (*Erwinia amylovora*), refYP_234307.1 (*Pseudomonas syringae pv syringae*) e refNP_791229.1 (*Pseudomonas syringae pv tomato*).

As seqüências de aminoácidos das proteínas da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foram retirada do Banco de dados GENOPAR.