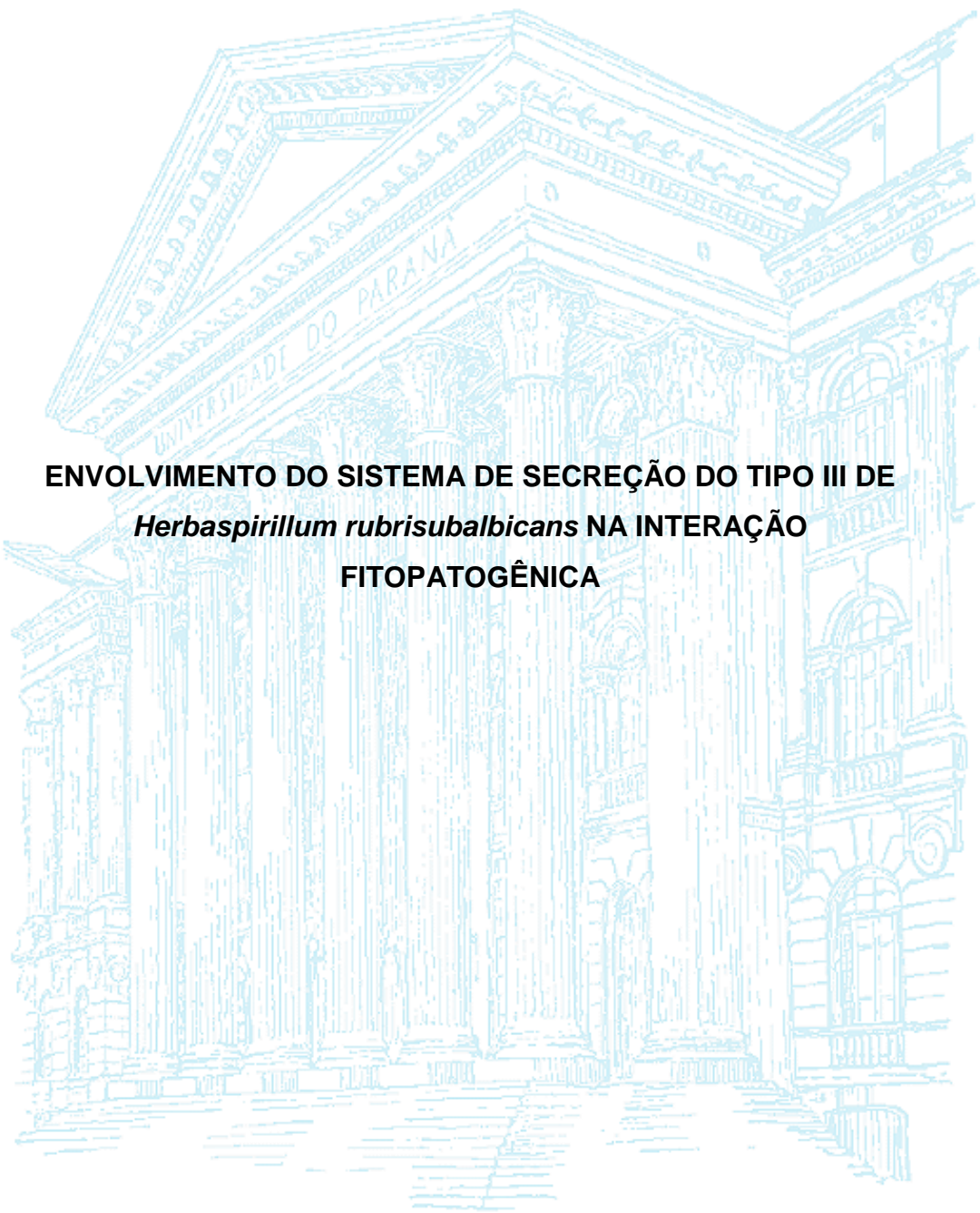


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA AUGUSTA SCHMIDT



**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III DE
Herbaspirillum rubrisubalbicans NA INTERAÇÃO
FITOPATOGÊNICA**

CURITIBA

2009

MARIA AUGUSTA SCHMIDT

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III DE
Herbaspirillum rubrisubalbicans NA INTERAÇÃO
FITOPATOGÊNICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Rose Adele Monteiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2009

*“Eu quero saber como Deus criou este mundo. Não
estou interessado neste ou naquele fenômeno, no
espectro deste ou daquele elemento. Eu quero
conhecer os pensamentos Dele, o resto são
detalhes.”*

Albert Einstein

Aos meus pais Cássia e Francismar pela inspiração e pelo amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar e desenvolver meu projeto de Mestrado no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, pelas idéias, sugestões e todo interesse demonstrado.

Agradeço imensamente aos meus orientadores Professora Rose Adele Monteiro e Professor Emanuel Maltempi de Souza, por ter aparecido e acrescentado em minha vida. Por todas as demonstrações de carinho e preocupação. Pelas grandes idéias, interesse, dedicação, tempo, paciência e alegria que me ofereceram. Muito obrigada.

A todos os professores do laboratório, Prof^a Maria Berenice, Prof^a Roseli Wassem, Prof^o Leonardo, Prof^a Liu, Prof^a Leda, Prof^o Luciano e Prof^o Wanderson, pela amizade, sugestões e conselhos.

Aos funcionários do Departamento de Biquímica, Dona Julieta, Dona Roseli Prado, Dona Nanci, Dona Marilza por toda dedicação e disposição dispensados e especialmente ao meu amigo Valter de Baura, por todos os favores, conselhos, idéias, colaborações, músicas, piadas, risadas enfim, por todos os momentos.

Gostaria de agradecer aos meus amigos queridos que serão para sempre especiais para mim, Michelle, Marcelo Muller, Arnaldo e Marco Aurélio, especialmente a minha amiga Anelis. Obrigada pela confiança, convivência e carinho oferecidos.

A todos os outros colegas do laboratório de Fixação, em especial a Ana Cláudia, Stefania, Eduardo, Bruno, Giovana, Ju Osaki, Helisson, Viviane, Thalita, Carol, Renato, Gus, Luiza, Lilian, Geovani, Lúcia, Vânia, Mix, Ju Inaba, Giovana, Viviane, Marcelo, Marco Antônio pela amizade e incentivo.

Agradeço a todos os professores do Curso de Pós Graduação em Ciências – Bioquímica em especial aos Coordenadores Professora Leda Shubatsu e Professor Miguel Daniel Nosedá.

A todos meus colegas da turma de mestrado, especialmente a Anelis, Carol e Arquimedes pelo apoio e confiança.

Aos grandes amigos Anelis, Carol, Danilo e Rinaldo por cada momento dentro e fora da Universidade (inesquecíveis)!

A todos os colegas do Departamento, especialmente aos amigos Ju

Cassolato, Lu, Graciele, Lauro e Guilherme. Isso me faz lembrar de agradecer também ao seu Nilson e ao pessoal da pizzaria da Suzi que sempre nos atenderam bem, participando de momentos que ficaram para a história.

Agradeço a minha família, em especial à minha mãe, meu pai, a Cissa, Vitor, Artur e Rubens que sempre me deram amor, confiança, incentivo me ajudaram e torceram por mim sempre.

Finalmente gostaria de agradecer ao Roger que passou comigo por cada fase dessa jornada, com muita paciência e carinho. Obrigada pela confiança e por todo amor.

RESUMO

O *Herbaspirillum rubrisubalbicans* é uma bactéria diazotrófica e endofítica pertencente a classe β das proteobacterias que é capaz de se associar com várias Poaceae de interesse econômico como milho, arroz, sorgo, trigo e cana-de-açúcar. Esta bactéria é capaz de causar a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar e a doença da estria vermelha em algumas variedades de sorgo.

Em várias plantas a virulência das bactérias patogênicas é em parte dependente de um grupo de proteínas que são injetadas nas células do hospedeiro por um Sistema de Secreção do Tipo III (SST3). Esta é uma maquinaria altamente conservada capaz de secretar proteínas bacterianas em células eucarióticas. Recentemente, genes *hrp/hrc* que codificam as proteínas do SST3, foram identificados no genoma de *H. rubrisubalbicans*. Esse conjunto de genes foi parcialmente sequenciado neste trabalho tendo identificados 14 proteínas já descritas do SST3 e sete proteínas hipotéticas.

Dentre eles foram identificados os genes *hrpE* e *hrcN* que foram mutagenizados com a inserção do transposon EZ-Tn5TM <TET-1> contendo um gene de resistência a tetraciclina. As construções foram transferidas para o cromossomo do *H. rubrisubalbicans* M1 por recombinação homóloga e as colônias resistentes a tetraciclina foram selecionadas. Dois mutantes chamados TSE (*hrpE*) e TSN (*hrcN*) foram caracterizados.

A cana-de-açúcar B-4362 foi inoculada com a estirpe selvagem M1 e estirpe mutante TSE. Duas semanas após a inoculação foram observados sintomas característicos da doença da estria mosqueada nas folhas das plantas inoculadas com as estirpes do tipo selvagem. Plantas inoculadas com TSE, no entanto, não desenvolveram quaisquer sintomas da doença, sugerindo que o produto do gene *hrpE* está envolvido no desenvolvimento da doença da estria mosqueada por *H. rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar B-4362. Os mutantes TSN e TSE também foram inoculadas em *Vigna unguiculata* cv. *Red Coloonis* e diferentemente da estirpe selvagem, não foi observado o desenvolvimento de uma resposta hipersensitivas nestas folhas.

Estes resultados comprovam que o SST3 é funcional em *H. rubrisubalbicans* e os genes *hrpE* e *hrcN* são elementos estruturais da maquinaria do SST3.

ABSTRACT

Herbaspirillum rubrisubalbicans is a diazotrophic, endophytic β Proteobacteria which associates with several Poaceae such as maize, rice, sorghum, wheat and sugar cane. *H. rubrisubalbicans* causes the mottled stripe disease in the B-4362 variety of sugar cane, and red stripe disease in susceptible varieties of sorghum.

In several plant bacterial pathogens virulence is in part dependent on a group of proteins that are injected into the host cells by a type III secretion system (T3SS). This is a highly conserved secretion machinery to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells. Recently, the *hrp* and *hrc* genes, which code for the proteins of the T3SS, were identified in the genome of *H. rubrisubalbicans*. This cluster was partially sequenced in this work has already identified 14 proteins belonging of SST3 and seven hypothetical proteins.

Among them were identified the *hrpE* and *hrcN* genes who were mutated by inserting the transposon *EZ-Tn5TM<TET-1>* containing a tetracycline resistance gene. The constructions were transferred into the chromosome of *H. rubrisubalbicans* M1 strain by homologous recombination and tetracycline resistant colonies were selected. Two mutants named TSE (*hrpE*) and TSN (*hrcN*) were characterized.

Sugar cane B-4362 was inoculated with the wild type M1 and mutant strain TSE. Two weeks after inoculation characteristic symptoms of the mottled stripe disease were observed in the leaves of the plant inoculated with the wild-type strain. Plants inoculated with TSE, however, failed to develop any symptoms of the disease, suggesting that the *hrpE* gene product is involved in promoting the mottled stripe disease by *H. rubrisubalbicans* in sugar cane B-4362. The mutants TSE and TSN were also inoculated in *Vigna unguiculata* cv. *Red Coloonis* and differently than the wild strain, they cannot develop the hypersensitive response in these leaves.

These results comprove that T3SS is functional in *H. rubrisubalbicans* and the genes *hrpE* and *hrcN* are a structural element of the T3SS machinery.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenina trifosfato

atm - atmosfera

Amp – ampicilina

BSA – Bovin serum albumin (Albumina de soro bovino)

°C – graus Celcius

DNA – ácido desoxirribonucleico

D.O.₆₀₀ – densidade óptica em 600 nanômetros

h - horas

KD - quilodaltons

Km^R – resistente a canamicina

kV/cm – quilo volt por centímetro

L - litro

ms - milissegundos

mmol - milimol

mL – mililitro

μF – micro Faraday

μg - microgramas

μL - microlitros

μm - micrômetros

ng - nano gramas

nm - nanômetros

pb – pares de bases

p/v – para volume

q.s.p. – quantidade suficiente para

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

Tc^R – resistente a tetraciclina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CANA-DE-AÇÚCAR B-4362 INOCULADA COM <i>H. rubrisubalbicans</i> ESTIRPE M1.....	4
FIGURA 2 - ESQUEMA GERAL DO SISTEMA Sec DE SECREÇÃO	6
FIGURA 3 – MODELO DO TRANSLOCADOR TAT-DEPENDENTE.....	8
FIGURA 4 – ESQUEMA GERAL DO SST2 EM <i>Klebsiella oxytoca</i>	9
FIGURA 5 - RESUMO ESQUEMÁTICO DOS TIPOS DE SST5	11
FIGURA 6 – EXEMPLO DE TRANSPORTE DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO	12
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES MECANISMOS DO SST4.....	14
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SST6.....	16
FIGURA 9 – MODELO ESQUEMÁTICO DO SST3.....	18
FIGURA 10 - ESTRUTURA DOS COMPONENTES DO SST3 E SUAS LOCALIZAÇÕES.....	19
FIGURA 11 - MODELO DE REGULAÇÃO GÊNICA DO SST3 EM <i>X.campestris</i>	22
FIGURA 12 – DISPOSIÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> BASEADA NA SEQUÊNCIA DE <i>H. seropedicae</i>	25
FIGURA 13 - ESQUEMA GERAL DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES	35
FIGURA 14 – PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR B-4362 COM ESTIRPES DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	39
FIGURA 15 – PROCESSO DE INFILTRAÇÃO NAS FOLHAS DE <i>Vigna unguiculata</i>	40
FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DAS REGIÕES SEQUENCIADAS DOS GENES <i>hrp/hrc</i> FEITAS NESTE TRABALHO	46
FIGURA 17 – ESQUEMA GERAL DA DISPOSIÇÃO DO APARATO DO SST3 EM <i>H. rubrisubalbicans</i>	47
FIGURA 18 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrpE e FliH.....	49
FIGURA 19 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrcN.....	52

FIGURA 20 – PERFIL DE HIBRIDIZAÇÃO DO GENE <i>hrpE</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> ESTIRPES SELVAGEM M1 E MUTANTE TSE.	56
FIGURA 21 - PERFIL DE HIBRIDIZAÇÃO DO GENE <i>hrcN</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> ESTIRPES SELVAGEM M1 E MUTANTE TSN.	58
FIGURA 22 – PERFIL DE RESTRIÇÃO DO AMPLIFICADO DO 16S _{rna} DE DIFERENTES ESPÉCIES.....	59
FIGURA 23 – FOLHAS DE VIGNA INFILTRADAS COM SOLUÇÃO DE MgSO ₄ 10mM.....	63
FIGURA 24 – FOLHAS DE Vigna INFILTRADAS COM A ESTIRPE SELVAGEM M1 DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	64
FIGURA 25 - FOLHAS de Vigna INOCULADAS COM MUTANTE TSE DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	65
FIGURA 26 – FOLHAS DE Vigna INOCULADAS COM O MUTANTE TSN DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	66
FIGURA 27 – INOCULAÇÃO DO CULTIVAR B-4362 DE CANA-DE-AÇÚCAR COM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	69

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE SELVAGEM M1	60
GRAFICO 2 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE TSE.....	61
GRAFICO 3 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE TSN.....	61
GRAFICO 4 – SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES M1, TSE E TSN DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	62
GRAFICO 5 – RECUPERAÇÃO DE BACTÉRIAS DOS TECIDOS INTERNOS DE FOLHA DE <i>Vigna</i> INOCULADA COM AS ESTIRPES M1, TSE E TSN DE <i>H.</i> <i>rubrisubalbicans</i>	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLONES IDENTIFICADOS NA BIBLIOTECA GENÔMICA DE <i>H. rubrisubalbicans</i> RELACIONADOS AO SST3.....	24
TABELA 2 – COMPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SST3 EM ORGANISMOS PATOGÊNICOS	25
TABELA 3 - ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> E <i>Escherichia coli</i> UTILIZADAS.....	27
TABELA 4 - PLASMÍDEOS UTILIZADOS	28
TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS	31
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES.....	33
TABELA 7 - SOLUÇÃO NUTRIENTE BD PARA PLANTAS.....	38
TABELA 8 - PROTEÍNAS RELACIONADAS A SISTEMAS DE SECREÇÃO DE <i>H. rubrisubalbicans</i> , FUNÇÃO E IDENTIDADE COM OUTROS ORGANISMOS	48
TABELA 9 – TEMPO E GERAÇÃO DAS ESTIRPES M1, TSE E TSN DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	3
2.2 DOENÇA DA ESTRIA MOSQUEADA	3
2.3 SISTEMAS DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS	5
2.3.1 Sistemas Sec	6
2.3.2 Sistema Tat	7
2.3.3 Sistema de Secreção do Tipo II	8
2.3.4 Sistema de Secreção do Tipo V	9
2.3.5 Sistemas Sec-independentes.....	11
2.3.5.1 Sistema de Secreção do Tipo I.....	12
2.3.5.2 Sistema de Secreção do Tipo IV	13
2.3.5.3 Sistema de Secreção Do Tipo VI.....	15
2.3.5.4 Sistema De Secreção Do Tipo III.....	16
2.3.5.4.1 Estrutura do Complexo do SST3.....	19
2.3.5.4.1.1 Complexo da membrana interna	20
2.3.5.4.1.2 Complexo de membrana externa	20
2.3.5.4.1.3 Componentes extracelulares	21
2.3.5.4.2 Regulação da expressão dos genes <i>hrp/hrc</i>	21
2.3.5.5 SST3 EM <i>H. seropedicae</i>	23
2.3.5.6 SST3 em <i>H. rubrisubalbicans</i>	23
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos gerais	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Bactérias.....	27
4.2 Plasmídeos	28
4.3 Condições de Cultivo	29
4.3.1 Meios empregados para o cultivo de <i>H. rubrisubalbicans</i>	29
4.3.2 Meios empregados para o cultivo de <i>E.coli</i>	30
4.3.3 Antibióticos.....	31
4.3.4 Condições de armazenamento das estirpes bacterianas.....	31

4.4 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS	31
4.5 PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	32
4.6 ELETROFORESE DE DNA	33
4.7 DIGESTÃO DE DNA POR ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO	33
4.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	34
4.8.1 Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	34
4.8.2 Preparo de células eletrocompetentes de <i>H. rubrisubalbicans</i>	34
4.9 OBTENÇÃO DOS MUTANTES NOS GENES <i>hrpE</i> E <i>hrcN</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	35
FIGURA 13 - Plasmídeos referentes aos mutantes nos genes <i>hrpE</i> e <i>hrcN</i> , HR02-MF-00-000-009-C05.TET.Km e HR02-MF-00-000-053-F11.TET.Km, respectivamente.	35
4.10 HIBRIDIZAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL DOS MUTANTES TSE E TSN DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	35
4.10.1 Preparo da sonda.....	36
4.10.2 Hibridização	36
4.11 ENSAIOS DE INOCULAÇÃO DAS ESTIRPES M1 E MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> EM CANA-DE-AÇUCAR E VIGNA	37
4.11.1 Cultivares vegetais	37
4.11.2 Desinfecção das gemas e sementes.....	37
4.11.3 Condições de cultivo	37
4.11.4 Preparo dos inóculos de <i>H. rubrisubalbicans</i>	38
4.11.5 Inoculação das plantas com <i>H. rubrisubalbicans</i>	38
4.11.6 Determinação dos fenótipos de patogenicidade e colonização.....	40
4.12 CURVA DE CRESCIMENTO	41
4.13 SEQUÊNCIAMENTO DE DNA	41
4.14 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO AGRUPAMENTO DE GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 SEQUÊNCIAMENTO E ANÁLISE <i>in silico</i> DO GRUPO DE GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	45
5.1.1 Proteína HrpE	48
5.1.2 Proteína HrcN	51
5.2 OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1	55

5.2.1	Obtenção do mutante <i>hrpE</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1	55
5.2.2	Obtenção do mutante <i>hrcN</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1	57
5.3	DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DOS MUTANTES TSE E TSN.....	60
5.3.1	Curva De Crescimento	60
5.3.2	Inoculação das plantas de <i>Vigna</i> com mutantes TSE e TSN	63
5.3.3	Colonização interna das folhas de <i>Vigna</i>	67
5.3.4	Inoculação das plantas de cana-de-açúcar da variedade B-4362 com TSE	68
6.	CONCLUSÕES	71
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Herbaspirillum* pertencente a Classe β do Filo Proteobacteria, compreende bactérias gram-negativas, em forma de espiral, geralmente vibrióides, podendo se apresentar em forma helicoidal, sendo móveis em presença de oxigênio. As células podem apresentar de 1 a 3 flagelos em um ou ambos os pólos. O diâmetro destas bactérias varia entre 0,6 e 0,7 μm e o comprimento celular pode variar entre 1,5 e 5,0 μm . Estes organismos são aeróbios, não fermentam açúcares, e alguns deles fixam nitrogênio atmosférico sob condições de microaerofilia e crescem bem utilizando N_2 como única fonte de nitrogênio (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1992).

Parte dos microrganismos deste gênero são diazotróficos endofíticos e associam-se com várias plantas de interesse econômico, como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), bananeiras (*Musa* sp.), palmeiras e abacaxizeiros (*Ananas comosus*) (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1992; CRUZ et al., 2001).

A associação de *Herbaspirillum* com gramíneas aparentemente inicia-se com a adesão da bactéria à superfície radicular, seguida de colonização dos pontos de emergência das raízes secundárias e penetração por descontinuidades da epiderme. Ocorre então rápida colonização e ocupação de espaços intercelulares da raiz, assim como do aerênquima, xilema e, finalmente, porções aéreas (JAMES, 1997).

Já foram descritas dez espécies de *Herbaspirillum*: *H. rizosphaerae*, *H. autotrophicum*, *H. chlorophenolicum*, *H. frisingense*, *H. hiltneri*, *H. huttiense*, *H. lusitanum*, *H. putei*, *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1996; DING & YOKOTA, 2004; IM et al., 2004; KIRCHHOF et al., 2001; ROTHBALLER et al., 2006; VALVERDE et al., 2003; JUNG et al., 2007)

Apesar de serem reconhecidos como organismos benéficos, o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em especial pode causar sintomas de doenças em cultivares de sorgo e cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1996; OLIVARES et al., 1996).

O *H. rubrisubalbicans* é uma espécie fitopatogênica originalmente descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans* e foi incluída no gênero *Herbaspirillum* com

base em estudos moleculares (BALDANI et al, 1996).

Com isso, o *H. rubrisubalbicans* tornou-se um interessante modelo de estudo entre este microrganismo e a planta. Seu modelo de colonização, seguido de aparecimento de sintomas de doença é uma forma viável de visualizar a capacidade de colonização e de causar doenças em plantas.

H. rubrisubalbicans teve o seu genoma parcialmente seqüenciado pelo Programa GENOPAR (www.genopar.org), e agora os genes envolvidos nos processos de patogenicidade e de colonização estão sendo estudados a fim de se desvendar como se dá o processo de interação planta-bactéria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Herbaspirillum rubrisubalbicans é uma bactéria diazotrófica e endofítica, pertencente a classe β do Filo Proteobactéria. É uma espécie fitopatogênica originalmente descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans*, foi incluída no gênero *Herbaspirillum* com base em estudos moleculares (BALDANI et al, 1996).

O *H. rubrisubalbicans* pode ser isolado do interior de raízes, caule e folhas de várias gramíneas de interesse econômico como cana-de-açúcar, arroz e sorgo (BALDANI et al, 1996).

Este microrganismo não pode ser isolado do solo sugerindo que ele estabelece uma interação endofítica com gramíneas, que pode ser não patogênica ou patogênica. O *H. rubrisubalbicans* pode causar a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar e estrias vermelhas nas variedades de sorgo. O nome da espécie deriva de *ruber*, vermelho, e *subalbicans*, esbranquiçado, referindo-se aos sintomas da doença estria mosqueada, caracterizado pelo desenvolvimento de estrias vermelhas com manchas brancas nas folhas da cana-de-açúcar (OLIVARES et al, 1997). É uma doença de pouca importância econômica, que afeta poucas variedades e não mata a planta, apenas diminui a área fotossintética e a vida útil da folha (CHRISTOPHER & EDGERTON, 1992; OLIVARES et al, 1997).

2.2 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, 1992).

A variedade de cana-de-açúcar B-4362, de Barbados, é suscetível a esta doença (OLIVARES et al, 1997). A inoculação de *H. rubrisubalbicans* nas folhas

desta variedade provoca sintomas típicos da doença. O ponto de inoculação torna-se vermelho e necrótico e no sétimo dia ocorre a formação de estrias vermelhas ao longo dos vasos perto do ponto de inoculação, acompanhado de clorose (FIGURA 1). Neste estágio a bactéria é encontrada preenchendo completamente o protoxilema e parcialmente o xilema da região que foi afetada com as estrias vermelhas. No vigésimo dia a bactéria bloqueia os vasos do meta e protoxilema e ocorre uma necrose ao redor do ponto de inoculação. 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 – CANA-DE-AÇÚCAR B-4362 INOCULADA COM *H. rubrisubalbicans* ESTIRPE M1.



Sintomas típicos da doença da estria mosqueada em cana-de-açúcar. FONTE: OLIVARES et al. 1997.

A extensa colonização bacteriana resulta na expansão dos espaços intercelulares e subsequente compressão das células do hospedeiro. As colônias bacterianas podem eventualmente passar dos vasos para dentro do mesófilo circundante, podendo atingir os estômatos reduzindo o tempo de vida das folhas em

aproximadamente 75 dias. A planta hospedeira responde com produção de compostos fenólicos intercelulares e de goma para provavelmente restringir o desenvolvimento bacteriano dentro dos vasos e confinar as bactérias em grandes colônias. Além disso, ocorre morte localizada de células, um processo denominado de Resposta Hipersensitiva (RH) (OLIVARES et al, 1997). Esta resposta é consequência da comunicação entre a bactéria e a planta.

Muitas bactérias gram-negativas dependem do Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) para interagir com as células do hospedeiro eucariótico. Este sistema pode estar envolvido na translocação de proteínas responsáveis pela patogenicidade da bactéria através da parede celular vegetal (GHOSH, 2004).

2.3 SISTEMAS DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS

O termo secreção é utilizado para descrever o transporte ativo de proteínas do citoplasma, através da membrana para a superfície ou ainda no interior das células eucarióticas. O Sistema de Secreção do Tipo III é capaz de entregar as proteínas efetoras dentro das células eucarióticas, fazendo com que as vias de sinalizações das células da planta sejam alteradas. Essas mudanças podem resultar em um desarmamento da resposta imune criando um nicho celular para a estabilização e colonização da bactéria no interior da planta (HUECK, 1998).

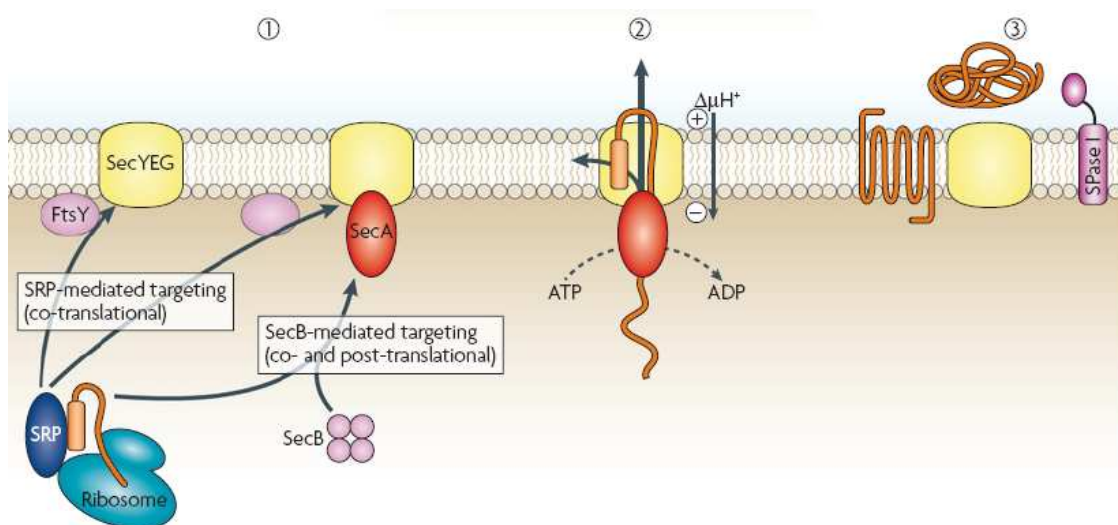
Nas bactérias gram-negativas os sistemas de secreção de proteínas podem ser divididos em seis diferentes tipos (I-VI). Essa classificação foi primeiramente baseada nas características de secreção das proteínas pela membrana externa (GERLACH & HENSEL, 2007). Os sistemas de secreção I, III, IV e VI podem exportar proteínas através das membranas internas e externas através de um único passo acoplado ao consumo de energia. Os sistemas de secreção do tipo II e V exportam proteínas através das duas membranas em dois passos distintos, utilizando o sistema geral de secreção (Sec) ou sistema Tat para a passagem através da membrana interna (SAIER, 2006).

2.3.1 Sistemas Sec

As proteínas translocadas pelo sistema sec-dependente são traduzidas como pré-proteínas e possuem um peptídeo sinal N-terminal característico. Estas pré-proteínas são reconhecidas por chaperonas citoplasmáticas SecB ou pela SRP (sinal recognition particle). O complexo SecB-préproteína tem como alvo a translocase formada pela proteína SecA, um motor molecular ao qual este complexo se liga, e pelas proteínas SecY, SecE e SecG que formam o canal condutor (ESER & EHRMANN, 2003).

Depois desta primeira etapa o peptídeo sinal é clivado por peptidases periplasmáticas e então a proteína se encontra no seu estado maduro (FIGURA 2). Esta proteína poderá atravessar a membrana externa por diferentes caminhos: (i) por um complexo de secreção ou Sistema de Secreção do Tipo II, (ii) por um sistema auto-transportador ou Sistema de Secreção do Tipo V.

FIGURA 2 - ESQUEMA GERAL DO SISTEMA Sec DE SECREÇÃO



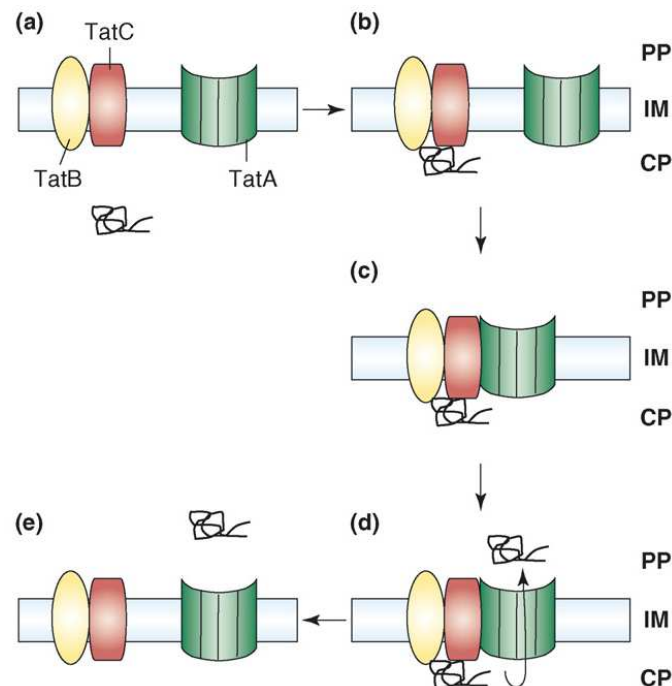
No passo 1 a proteína pré-secretada (laranja), com peptídeo sinal - retângulo), se liga a proteína SRP (azul) ou a chaperona SecB (rosa) e é enviada para as translocases SecYEG (amarelo). SecA (vermelho) reconhece o peptídeo sinal e fornece a energia necessária para a translocação. Nesta etapa (fase 2) a proteína secretada perde o peptídeo sinal e segue para a fase 3 onde é translocada para o espaço periplasmático (PAPANIKOU et al, 2007).

2.3.2 Sistema Tat

O Sistema Tat (Twin-arginine Translocator) é uma via de transporte de proteínas presente em Bacteria, Archea e em cloroplastos. Proteínas transportadas por este sistema possuem um motivo de argininas geminadas no peptídio sinal. O sistema Tat está localizado na membrana interna e de maneira geral é composto por 3 tipos de proteínas integrais de membrana: TatA, TatB e TatC (CLINE & MCCAFFERY, 2007) (FIGURA 3).

Em *E. coli* foram identificados dois complexos de alta massa molecular diferentes. Um dos complexos, formado por protômeros da proteína TatA, é chamado de módulo transportador. O outro complexo, chamado de módulo de reconhecimento de sinal é formado pelas proteínas TatB e TatC (SARGENT, 2007; BUCK, LAMMERTYN & ANNÉ, 2008).

Na ausência de proteínas transportadas por este sistema, os dois complexos encontram-se separados. Quando um motivo de argininas geminadas no peptídio sinal é reconhecido pelo complexo TatBC ocorre a associação dos dois complexos de uma maneira dependente da força próton motriz. A proteína alvo é então translocada para o periplasma passando pelo canal formado pelas proteínas TatA e então os dois complexos se dissociam novamente (PALMER, SARGENT & BERKS, 2005; BUCK, LAMMERTYN & ANNÉ, 2008).

FIGURA 3 – MODELO DO TRANSLOCADOR TAT-DEPENDENTE

(a) Na ausência do substrato Tat não estiver presente, os complexos TatA (verde) e TatBC (amarelo e vermelho) estão presentes em forma de complexos distintos na membrana interna (IM). (b) O ciclo de transporte Tat começa quando as argininas do peptídeo sinal do substrato de Tat é reconhecido por TatB e TatC. (c) O complexo associado de TatA com TatBC vinculado ao substrato. (d) O substrato é translocado a partir do citoplasma (CP) ao periplasma (PP), através do canal formado pelas proteínas TatA. (e) Os dois complexos se dissociam novamente (BUCK et al, 2008).

2.3.3 Sistema de Secreção do Tipo II

O SST2 é formado basicamente por 12 componentes, uma secretina de membrana externa, pseudopilinas, a pré-pseudopilina peptidase/metiltransferase e proteínas envolvidas na montagem do sistema e no reconhecimento do substrato (CIANCIOTTO, 2005).

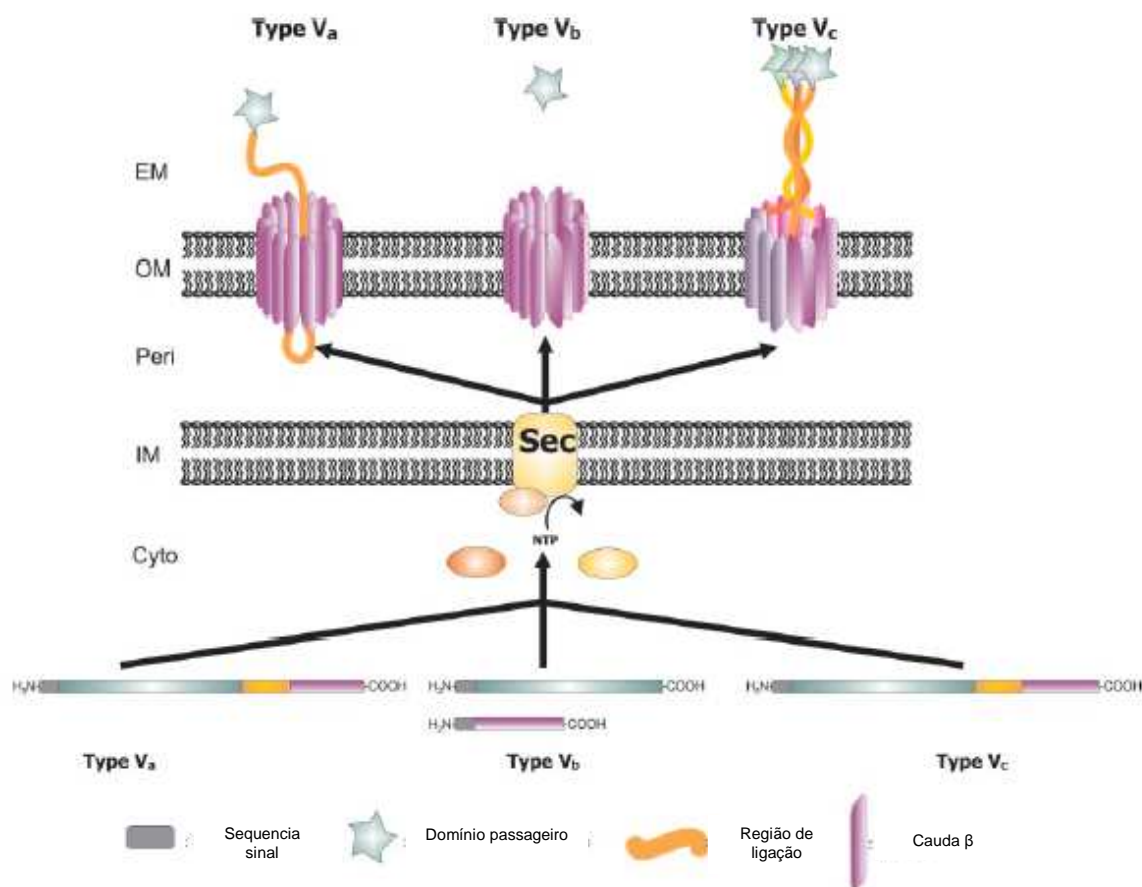
O SST2 melhor caracterizado é o de *Klebsiella oxytoca* por PUSGLEY e colaboradores (1997) e é formado pelas proteínas Pul (FIGURA 4).

Existem algumas evidências que sugerem que o SST2 pode estar envolvido com patogênese. Muitas das enzimas secretadas por este sistema têm funções degradativas e podem estar envolvidas com danos às células hospedeiras. Algumas mutações nos genes do SST2 podem atenuar a virulência dos patógenos (CIANCIOTTO, 2005).

exoproteínas, domínio α , ou ainda de domínio passageiro e possui a sequência sinal necessária para a translocação através da membrana interna. As proteínas TpsB são chamadas de domínio B formador de poro ou domínio transportador e são responsáveis pela translocação das proteínas TpsA (JACOB-DUBISSON et al, 2004).

As famílias das adesinas oligoméricas – Coiled Coil – tem sido descritas como uma superfamília das autotransportadoras oligoméricas de superfície. Essas proteínas devido a sua estrutura terciária são secretadas diferentemente do sistema V_a , devido ao modo alternativo de secreção elas foram designadas de sistema V_c . A proteína YadA é a adesina melhor caracterizada, sendo a principal adesina da bactéria enteropatogênica *Yersinia* spp (GELARCH et al, 2007). A YedA forma trímeros estáveis de alto peso molecular que se projetam para fora da membrana externa, esta proteína pode ligar várias proteínas da matriz extracelular como o colágeno e é importante para o esclarecimento da patogenicidade (HOICZYK et al, 2000). Os modelos esquemáticos dos tipos do SST5 estão mostrados na FIGURA 5.

FIGURA 5 - RESUMO ESQUEMÁTICO DOS TIPOS DE SST5



Secreção de proteínas do tipo AT ou V_a está representado do lado esquerdo do diagrama, as TPS ou tipo V_b no centro e do tipo V_c ou AT-2 esquematizada a direita. São mostrados quatro domínios funcionais: a sequência sinal, o domínio a ser transportado, a região de ligação e o domínio β .

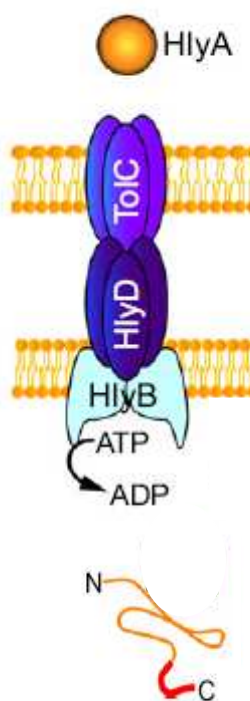
2.3.5 Sistemas Sec-independentes

Em contraste com os sistemas de secreção dos tipos II e V, os sistemas do tipo I, III, IV e VI exportam proteínas através das membranas internas e externas através de um processo contínuo sem a necessidade de um sistema acessório (HUECK, 1998).

2.3.5.1 Sistema de Secreção do Tipo I

O SST1 é um transportador do tipo ABC que forma um complexo heterotrimérico intermembranar constituído por uma proteína exportadora de membrana interna, uma proteína de fusão (entre as membranas) e uma terceira proteína formadora de poro na membrana externa. Este sistema permite a secreção de uma vasta gama de substratos que podem ser protéicos ou não, a partir do citoplasma para o espaço extracelular em uma única etapa, sem um passo intermediário periplasmático (FIGURA 6). A maioria das proteínas ou substratos descritos até agora possuem uma seqüência C-terminal altamente conservada que forma estruturas secundárias conservadas reconhecidas por este sistema e esta porção não é clivada durante o processo de secreção (GERLACH & HENSEL, 2007).

FIGURA 6 – EXEMPLO DE TRANSPORTE DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO I



Este sistema foi estudado em detalhes com base na secreção das α -hemolisinas (HlyA) de *Escherichia coli*. O sistema consiste na excreção de HlyA através do transportador do tipo ABC HlyB, da proteína intermembranar HlyD e da formadora de poro da membrana externa TolC. HlyB reconhece especificamente o substrato e dinamiza a translocação pela hidrólise de ATP. HlyD é responsável por fazer um canal até TolC, transportando HlyA através do periplasma. A proteína formadora de poro de membrana externa TolC age como um canal

trimérico hidrofílico exportador do sistema (GERLACH & HENSEL, 2007).

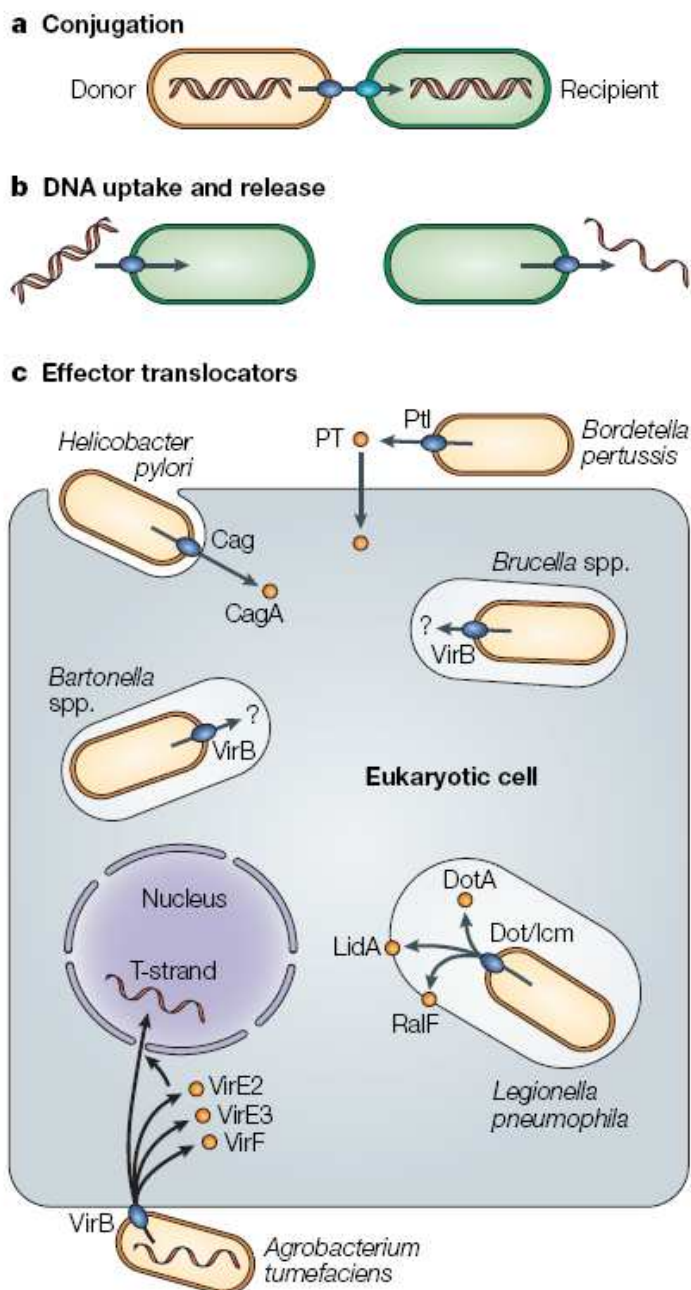
2.3.5.2 Sistema de Secreção do Tipo IV

Diferentemente dos modelos de secreção já descritos aqui o SST4, assim como o Sistema de Secreção do Tipo III (SST3), secretam as proteínas exportadas diretamente dentro da célula receptora e não no espaço extracelular.

O SST4 é caracterizado pela capacidade de transferir proteínas ou DNA de uma célula bacteriana para diferentes células alvo. A conjugação é um exemplo onde DNA é transferido de uma bactéria para outra. O SST4 consiste de um canal de translocação de substrato intermembranar e de um *pilus* que se ancora na membrana externa e faz contato com a célula alvo (DEHIO, 2008).

Para recrutar proteínas presentes no citoplasma o sistema conta com um homohexâmero VirD4 chamada de “coupling protein” (CP) ou proteína acopladora. A estabilidade da interação com CP faz com que o substrato efetor se ligue a proteína transmembranar VirB10, que forma um canal entre as membranas. Várias proteínas Vir fazem parte deste canal, cada uma com funções diferentes como formar o canal intermembranar, atuar como secretinas, ou ainda, formar o poro na membrana externa da bactéria. VirB4 e VirB11 atuam como ATPases energizando a translocação e a polimerização do *pilus*. O *pilus* extracelular é uma estrutura de forma alongada, composto principalmente por subunidades de VirB2, outras proteínas como VirB5 e VirB7 também podem contribuir para a formação do *pilus* como mostra a FIGURA 7 (GERLACH & HENSEL, 2007).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES MECANISMOS DE SECREÇÃO DO SST4



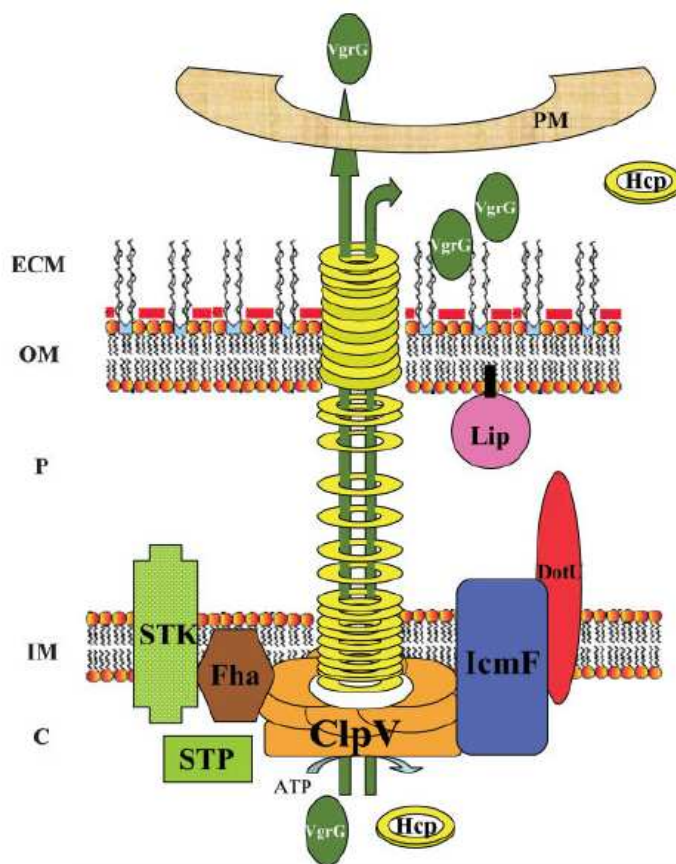
Em (a) a conjugação, processo que transfere DNA de uma célula bacteriana doadora para sua receptora. Em (b) um sistema de troca de DNA com o meio extracelular independente de contato com a célula alvo. Em (c) o SST4 entrega proteínas efetoras diretamente dentro de células eucarióticas (CHRISTIE, 2003).

2.3.5.3 Sistema de Secreção Do Tipo VI

Estudos de bioinformática identificaram um conjunto de genes altamente conservados em diversos patógenos gram-negativos, estes genes devido a homologia com o gene *icmF*, foram chamados IAHP do inglês IcmF-associated homologous protein. O gene *icmF* codifica para uma proteína associada ao SST4. As proteínas IAHP apesar da homologia com a IcmF não estão envolvidas com o SST4, indicando que elas formariam um sistema de secreção diferenciado (FIGURA 8).

Em 2006 PUZATZKI e colaboradores identificaram um conjunto de genes necessários para a citotoxicidade de *Vibrio cholerae* sobre o *Dictyostelium discoideum*. Estes genes foram chamados de *vas*, do inglês “virulence associated secretion”. As proteínas Vas juntamente com as IAHP formam um sistema que estaria envolvido na translocação extracelular de proteínas que não possuem uma sequência líder hidrofóbica, na região N-terminal e foi denominado Sistema de Secreção do Tipo VI. Como várias bactérias patogênicas gram-negativas possuem esse conjunto de genes foi sugerido que a função do SST6 seria o transporte extracelular de fatores de virulência e sua translocação para a célula eucariótica (PUKATZKI et al, 2006).

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SST6



ATPase ClpV em laranja ajuda a transportar Hcp (amarelo) e VgrG (verde escuro) através do envelope da célula. Lip (rosa) é uma lipoproteína putativa de membrana. O nível de fosforilação de Fha (marrom) regula a atividade do SST6. IM – Membrana Interna, P – periplasma, OM - Membrana externa, ECM – Meio Extracelular e PM – Membrana do Hospedeiro (FILLOUX, HACHANI & BLEVES, 2008).

2.3.5.4 Sistema de Secreção do Tipo III

Cerca de 25 espécies de bactérias gram-negativas com o genoma seqüenciado que interagem com outros organismos, tanto como patógenos quanto como simbioses e associativos, são equipadas com um aparato exportador de proteínas denominado Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) (CORNELIS, 2006). Este sistema permite a secreção de proteínas bacterianas diretamente para o interior das células hospedeiras do eucarioto. No interior dessas células, as proteínas bacterianas, também chamadas de efetores, modificam sinais celulares em benefício da bactéria.

O SST3 é formado por aproximadamente 20 proteínas, sendo que a maioria está localizada na membrana interna da bactéria (HUECK, 1998). Também fazem

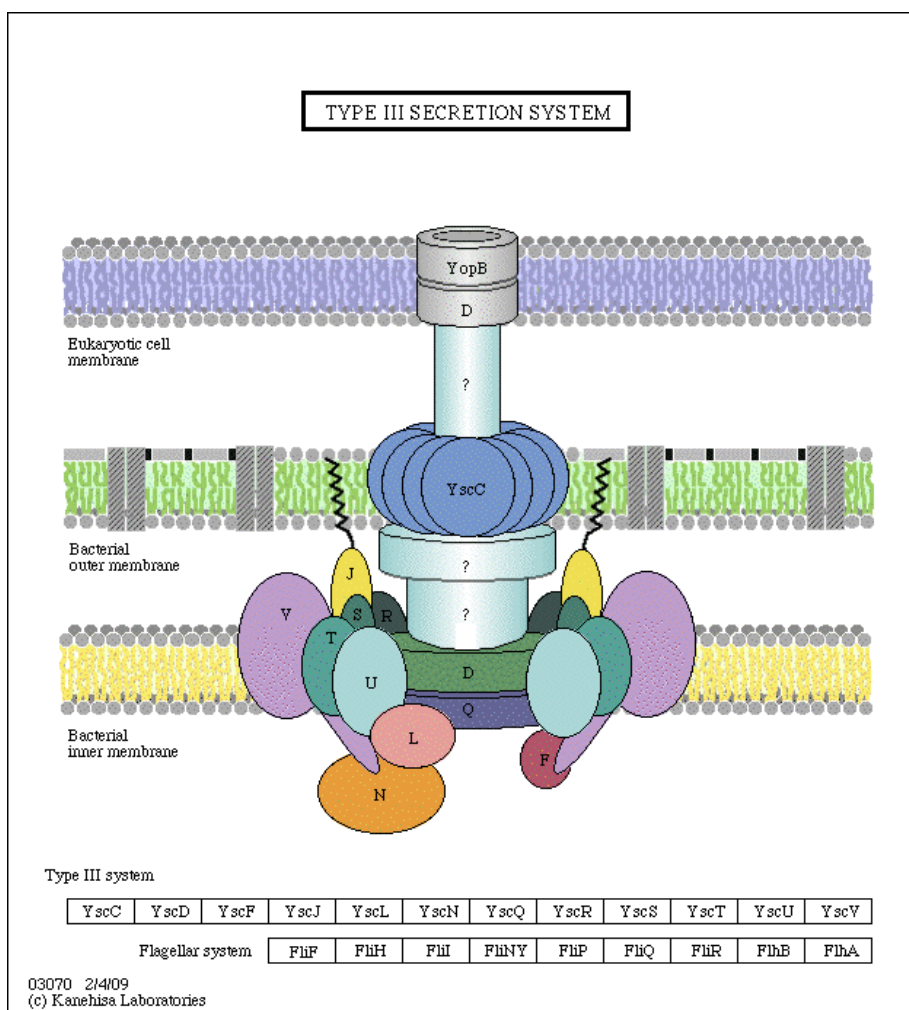
parte do sistema uma proteína formadora do poro da membrana externa e uma ATPase citoplasmática, provavelmente ancorada à membrana interna (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000). Essas proteínas associam-se em uma estrutura supramolecular que lembra uma seringa com uma agulha, denominada injectiossoma (FIGURA 9) (CORNELIS, 2006). A agulha do injectiossoma, denominada “pili Hrp” em fitopatógenos, atravessa as membranas interna e externa, fazendo contato com a membrana do hospedeiro (LI et al., 2002; HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; THANASSI & HULTGREN, 2000; BÜTTNER & BONAS, 2002).

Embora as proteínas estruturais do SST3 sejam conservadas entre os microrganismos que as apresentam, as proteínas secretadas variam bastante entre as espécies. Esses efetores apresentam diversas funções, tais como: reguladores da secreção, facilitadores de injeção de outras proteínas e modificadores de estrutura e função de proteínas do hospedeiro (GREENBERG & VINATZER, 2003). A expressão das proteínas do sistema de secreção e a secreção em si dos efetores parecem ser estimuladas pelo contato físico entre a bactéria e seu hospedeiro (HUECK, 1998).

A infecção de uma planta por um fitopatógeno pode desencadear uma reação de hipersensibilidade (HR), que nada mais é do que morte celular programada que limita o ataque dos patógenos, ou pode ainda levar ao desenvolvimento da doença (GOODMAN & NOVACKY, 1994). A compatibilidade e incompatibilidade entre a bactéria e a planta são controladas por um conjunto de genes bacterianos que codificam para proteínas efetoras secretadas pelo SST3 (GOODMAN & NOVACKY, 1994) e seus respectivos receptores vegetais (MUDGETT & STASKAWICZ, 1998; HUECK, 1998; GOODMAN & NOVACKY, 1994). As proteínas efetoras bacterianas são denominadas proteínas Avr (avirulentas) e as proteínas correspondentes nas plantas denominadas proteínas R (de resistência). Os genes bacterianos necessários para patogenicidade em plantas suscetíveis e para desencadear a reação de hipersensibilidade em plantas resistentes foram denominados *hrp* (de hypersensitive response and pathogenicity), sendo que aproximadamente nove deles são altamente conservados e foram chamados de *hrc* (HUECK, 1998; CORNELIS & van GIJSEGEM, 2000). Os genes *hrp/hrc* que codificam para as proteínas do SST3 estão agrupados em megaplasmídeos (*Ralstonia solanacearum*) ou no genoma (*Pseudomonas syringae*,

Erwinia amylovora e *Xanthomonas campestris*), nas “Ilhas de Patogenicidade” (HUECK, 1998). A expressão dos genes *hrp* é controlada por sinalizadores vegetais e fatores ambientais como pH, força osmótica e repressão metabólica (RAHME et al., 1992; XIAO et al., 1992; GOODMAN & NOVACKY, 1994).

FIGURA 9 – MODELO ESQUEMÁTICO DO SST3



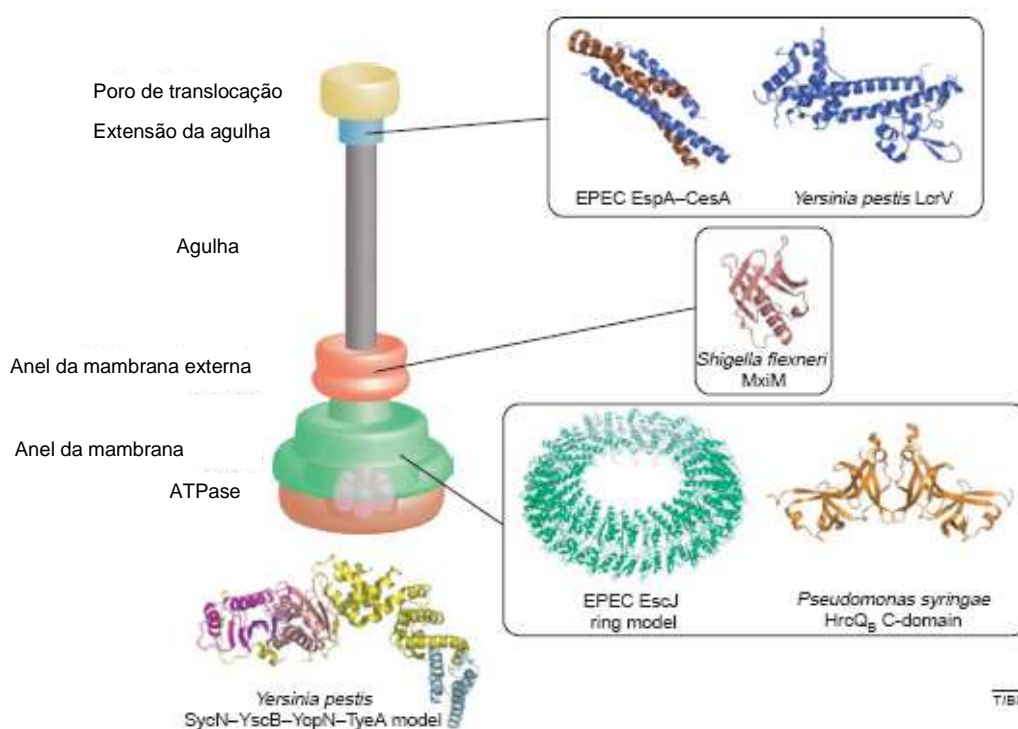
A maior parte das proteínas formadoras deste complexo se encontram nos anéis concêntricos da membrana interna e externa que formam o corpo basal do conjunto. Uma proteína periplasmática em forma de cilindro une os dois anéis e atravessa a proteína efetora para o poro da membrana externa. Virada para a fase citoplasmática da membrana interna se encontra a ATPase. O anel da membrana externa é constituído de proteínas da família das secretinas. A partir deste anel sai a agulha, que é um complexo rígido e oco que é capaz de injetar as proteínas efetoras na célula alvo (THANASSI & HULTGREN, 2000).

2.3.5.4.1 Estrutura do Complexo do SST3

O aparato do SST3 é uma estrutura complexa com várias subunidades ligadas a membrana. Consiste em mais de 20 proteínas sendo que aproximadamente nove delas são altamente conservadas e homólogas as proteínas do aparato flagelar (HUECK, 1998). As proteínas formam uma estrutura rígida e longa em formato de uma seringa com uma agulha, que é ancorada na base e atravessa a membrana interna, o espaço periplasmático e a membrana externa da bactéria (KUBORI et al, 1998).

O complexo da agulha é formado por três partes principais: componentes extracelulares, complexo da membrana externa bacteriana e o complexo da membrana interna bacteriana (FIGURA 10).

FIGURA 10 - ESTRUTURA DOS COMPONENTES DO SST3 E SUAS LOCALIZAÇÕES



Modelo construído com base em estruturas de cristais de alta resolução e empacotamento molecular (YIP & STRYNADKA, 2006).

2.3.5.4.1.1 Complexo da membrana interna

O complexo da membrana interna é estruturalmente e funcionalmente similar aos componentes do corpo basal flagelar. Seu complexo em forma de anel tem a função de servir como plataforma para a montagem das demais estruturas do complexo da agulha e promover a catalisação de translocação das proteínas efetoras (YIP et al, 2005). Outra parte proeminente da membrana interna é formada por proteínas da família YscQ de *Yersinia*. A proteína representante desta família em *P. syringae*, HrcQ teve sua estrutura determinada revelando formar um homotetrâmero que se liga pela porção N-terminal ao anel (YIP & STRYNADKA, 2006). Outra proteína essencial já descrita é uma ATPase altamente conservada que se localiza ancorada na membrana interna para o lado do citoplasma. Em fitopatógenos ela é denominada HrcN, e fornece a energia pela hidrólise do ATP favorecendo a passagem da proteína efetora pelo sistema (POZIDIS et al, 2003).

2.3.5.4.1.2 Complexo de membrana externa

O complexo da membrana externa é parte do corpo basal da agulha e é formado por subunidades concêntricas de proteínas da família das secretinas. Estas proteínas estão presentes não somente no SST3 como também participam de vários processos de transporte macromoleculares como nos SST2 e SST4 (THANASSI & HULTGREN, 2000). Estas proteínas não possuem homologia de seqüência nem de estrutura com os componentes da membrana externa de flagelos. A comparação de secretinas de diferentes sistemas mostra similaridades estruturais de 12 a 14 subunidades de secretinas que formam um poro homomultimerico que atravessa a membrana externa e se projeta no espaço periplasmático (MORAES, SPRETER & STRYNADKA, 2008). O domínio C-terminal destas proteínas está localizado na membrana externa e o domínio N-terminal está no espaço periplasmático e provavelmente interage com outros componentes periplasmáticos ou da membrana interna (CHAMI et al, 2005; GENIN & BOUCHER, 1994).

2.3.5.4.1.3 Componentes extracelulares

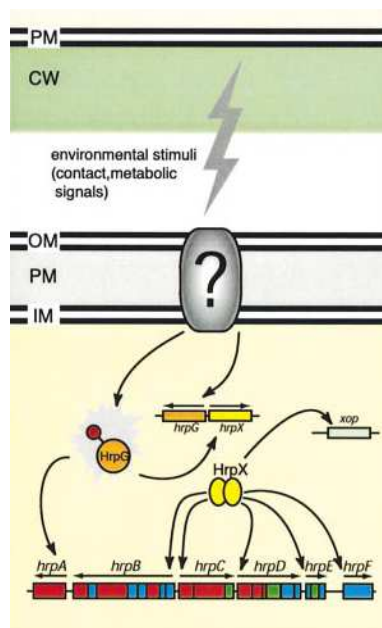
A porção extracelular do SST3 pode ser subdividida em três partes principais: a agulha, a ponta ou extensão da agulha e o poro de translocação (MORAES, SPRETER & STRYNADKA, 2008). A agulha consiste em um polímero helicoidal composto por aproximadamente cem cópias de proteínas de uma mesma família (YscF para *Yersinia enterocolitica*). Dados estruturais obtidos a partir da análise de RMN das proteínas monoméricas BsaL (*Burkholderia pseudomallei*) e PrgI (*S. typhimurium*) (WANG et al, 2007), a determinação da estrutura cristalográfica da proteína MixH de *S. flexineri* (DEANE et al, 2006) e a estrutura 3D desta porção obtidas por microscopia eletrônica (CORDES et al, 2003), permitiram a construção de modelos atômicos desta estrutura (DEANE et al, 2006; MORAES, SPRETER & STRYNADKA, 2008). As proteínas da ponta ou extensão da agulha parecem estar envolvidas no correto posicionamento do poro de translocação. Como representante dessas proteínas temos a LcrV (*Y. enterocolitica*) a IpaD (*S. flexineri*), a BipD (*B. pseudomallei*) e a EpsA (*E. coli*), que são translocadores hidrofílicos e podem agir como chaperonas extracelulares ou plataformas de montagem que auxiliam na formação de um poro funcional na membrana da célula eucariótica (DEREWENDA et al, 2004; YIP et al, 2005; JOHNSON et al, 2007; MULLER, BROZ & CORNELIS et al, 2008).

2.3.5.4.2 Regulação da expressão dos genes *hrp/hrc*

Com base em similaridades genéticas a organização e regulação dos genes *hrp/hrc* em bactérias fitopatógenas foram divididos em dois grupos: grupo I (Ex.: *E. amylovora* e *P. syringae*) e grupo II (Ex.: *R. solanacearum* e espécies de *Xanthomonas*). No grupo I os operons são ativados pela proteína HrpL, um membro da subfamília de fatores sigma de função extra citoplasmática (FREDERICK et al., 2001). Já no grupo II a expressão é controlada por HrpX, um ativador transcricional tipo AraC da família das OmpR. A análise do transcriptoma de *X. campestris* revelou que HrpG, através de HrpX, controla a regulação da transcrição dos genes *hrp/hrc* e os genes que codificam para as proteínas efetoras (FIGURA 11)

(CUNNAC, BOUCHER & GENIN, 2003). Muitos dos genes regulados por HrpX contêm um promotor PIP (promotor induzido por planta) - **TTCGC-N15-TTCGC** – esta seqüência pode estar diretamente envolvida na regulação gênica por HrpX. Porém, existem ainda promotores independentes de PIP, como por exemplo os controlados por HrpG com sua região promotora específica (BÜTTNER & BONAS, 2002). *R. solanacearum* possui um gene homólogo ao *hrpX* de *X. campestris* chamado *hrpB*, que também é ativado por HrpG. Já foi comprovado que a transcrição de *hrpG* é aumentada em resposta ao contato direto da bactéria com células da planta (ALDON et al., 2000). A proteína HrpG ativa a expressão do gene *hrpB*, um ativador transcricional da família AraC. HrpB ativa a transcrição dos genes *hrp/hrc* e de outros genes localizados fora deste grupo cujos produtos são secretados via maquinaria do SST3 (GENIN et al, 1992).

FIGURA 11 - MODELO DE REGULAÇÃO GÊNICA DO SST3 EM *X. campestris* pv. *Vesicatoria*



Sistema de captação de sinal do envelope bacteriano (indicado por um ponto de interrogação) devido aos estímulos ambientais causando a expressão de HrpG. HrpG ativa a expressão dos genes *hrp/hrc* via HrpX. CW, parede celular; IM, membrana interna; OM, membrana externa; PM, membrana plasmática.

2.3.5.5 SST3 EM *H. seropedicae*

Foram identificados 14 genes *hrp/hrc* a partir do Programa de Sequenciamento Genômico de *H. seropedicae* (GENOPAR). Além disso, 15 proteínas hipotéticas e dois genes similares a *pil* (do aparato de secreção de bactérias patogênicas) foram identificados na mesma região do genoma. Dois genes envolvidos na regulação da transcrição dos genes *hrp/hrc* foram identificados em *H. seropedicae*: *hrpL*, um fator sigma da RNA polimerase e *hrpG* que codifica para um provável regulador transcricional localizado fora do agrupamento *hrp/hrc* do genoma (DEDECEK, 2006). O grupo de genes *hrp/hrc* de *H. seropedicae* apresenta uma organização de genes e operons parcialmente conservada se comparada com fitopatógenos como *Pseudomonas syringae* e *Ralstonia solanacearum*. Esta semelhança aponta indícios de que estes genes formam uma unidade de transcrição e que podem estar envolvidos no processo de interação entre o *H. seropedicae* e a planta hospedeira (SILVA, 2008).

2.3.5.6 SST3 em *H. rubrisubalbicans*

Dados obtidos no Programa de Sequenciamento Genômico da bactéria endofítica *H. rubrisubalbicans* (Programa GENOPAR) mostraram a presença de genes homólogos aos que codificam as proteínas do SST3, sugerindo que este sistema esteja presente nesta bactéria (TABELA 1).

TABELA 1 - CLONES IDENTIFICADOS NA BIBLIOTECA GENÔMICA DE *H. rubrisubalbicans* RELACIONADOS AO SST3

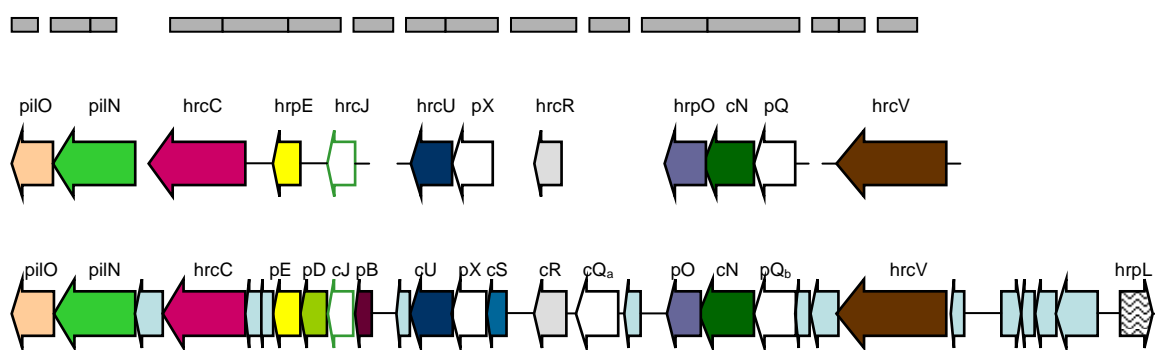
GENE	CLONE	LOCALIZAÇÃO CELULAR
<i>hrpO</i> / <i>hrpQ</i> / <i>hrcN</i>	HR02-MF-00-000-053.F11	ATPase membrana interna
<i>hrpE</i>	HR02-MF-00-000-057.H09	Membrana interna/Citoplasma
<i>hrcV</i>	HR03-FP-00-000-013.B07	Membrana interna/Periplasma
<i>hrpQ</i>	HR02-MF-00-000-052.A02	Agulha
<i>pilN</i>	HR03-FP-00-000-010.H02	Flagelar
<i>hrpV</i> / <i>hrcV</i>	HR03-FP-00-000-049.A08	Membrana interna
<i>pilN</i>	HR03-FP-00-000-010.H02	Flagelar
<i>hrpE</i> / <i>hrcJ</i>	HR02-MF-00-000-009.C05	Membrana interna/Citoplasma
<i>hrcU</i>	HR02-MF-0-000-052.H011	Membrana interna
<i>hrcT</i> / <i>hrpX</i>	HR03-FP-00-000-015.H11	Membrana interna
<i>hrcC</i>	HR02-MF-00-000-052.H10	Membrana externa
<i>hrpR</i>	HR03-FP-00-000-008.C01	Membrana interna
<i>hrpO</i>	HR02-MF-00-000-051.A02	

Em *H. rubrisubalbicans*, uma bactéria fitopatogena, o SST3 ainda não foi estudado, mas possivelmente possui uma função similar aos já descritos, introduzindo moléculas efetoras nas células eucarióticas, permitindo a comunicação entre as duas células e causando a patogenicidade em algumas variedades de plantas.

Resultados preliminares revelaram a presença de alguns genes *hrp* e *hrc*, aparentemente constituindo um cluster (FIGURA 12). A TABELA 2 mostra a nomenclatura das proteínas do SST3 de *H. rubrisubalbicans* comparada com outros gêneros de organismos patógenos bem como sua homologia com o sistema flagelar e localização dentro da célula. A presença desses genes indica que o *H. rubrisubalbicans* possivelmente possui um SST3. Nosso objetivo é demonstrar se este sistema é funcional em *H. rubrisubalbicans* e se está envolvido na

patogenicidade do *H. rubrisubalbicans* relacionado a algumas variedades de cana-de-açúcar e Vigna.

FIGURA 12 – DISPOSIÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *H. rubrisubalbicans* BASEADA NA SEQÜÊNCIA DE *H. seropedicae*



A: disposição dos *contigs* obtidos de *H. rubrisubalbicans*, com base na análise do programa CONSED e na comparação com a seqüência de *H. seropedicae*. **B:** Agrupamento *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans*. **C:** Agrupamento *hrp/hrc* de *H. seropedicae*. NOTA: escala 0,6cm=1Kb. (BALSANELLI, 2007).

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SST3 EM ORGANISMOS PATOGENICOS

<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Flagelares	<i>Yersinia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Ralstonia</i>	Localização
HrcV	FlhA	LcrD	HrcV	HrcV	HrcV	HrcV	MI
HrcN	FliI	YscN	HrcN	HrcN	HrcN	HrcN	C / MI
HrcQ	FliN	YscQ	HrcQ	HrcQ	HrcQ	HrcQ	C / MI
HrcR	FliP	YscR	HrcR	HrcR	HrcR	HrcR	MI
HrcS	FliQ	YscS	HrcS	HrcS	HrcS	HrcS	MI / P
HrpX	FliR	YscT	HrcT	HrcT	HrcT	HrcT	MI / P
HrcU	FlhB	YscU	HrcU	HrcU	HrcU	HrcU	MI
HrcJ	FliF	YscJ	HrcJ	HrcJ	HrcJ	HrcJ	P / ME
HrpE	FliH	YscL	HrpE	HrpE	HrpB5	FliH	C / MI
HrcC		YscC	HrcC	HrcC	HrcC	HrcC	ME
HrpJ		YopN	HrpJ	HrpJ			MI
HrpQ	FliG	YscD	HrpQ	HrpQ			MI / P
HrpB		YscI	HrpB	HrpB			C
HrpO	FliJ		HrpO	HrpO			C / MI
HrpD		YscK YscF	HrpD	HrpD			MI I

Proteínas da mesma linha possuem similaridade de seqüência. MI – Membrana interna, C – Citoplasma, P – Periplasma, ME – membrana externa e I – Injectissoma.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

A seqüência parcial do genoma de *H. rubrisubalbicans* permitiu a identificação de um grupo de genes *hrp*. As funções destes genes ainda não estão esclarecidas. Em outros organismos foi mostrado que os produtos dos genes *hrp* compõem a maquinaria do SST3, responsável por injetar proteínas efetoras produzidas pela bactéria dentro da célula hospedeira eucariótica e que está envolvido na patogenicidade.

Este trabalho tem como objetivo construir estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* nos genes *hrp/hrc* e determinar seu fenótipo na interação bactéria-planta entre o *H. rubrisubalbicans* e a variedade de cana-de-açúcar B-4362 e em folhas de *Vigna unguiculata*.

3.2 Objetivos específicos

- Obter uma estirpe mutante no gene *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* por inserção do transposon EZ::Tn5TM<TET1>;
- Obter uma estirpe mutante no gene *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* por inserção do transposon EZ::Tn5TM<TET1>;
- Confirmar a presença do transposon EZ::Tn5TM<TET1> nos genes alvos através de sequenciamento e hibridização do DNA cromossomal;
- Determinar o fenótipo de virulência da estirpe selvagem M1 e seus mutantes em plantas de *Vigna unguiculata* cv. Red caloona e cana-de-açúcar da variedade B-4362.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias

As bactérias utilizadas neste trabalho estão descritas na TABELA 3.

TABELA 3 - ESTIRPES DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* E *Escherichia coli* UTILIZADAS

Estirpe	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referências
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>		
M1	Estirpe selvagem	(BALDANI <i>et al.</i> , 1996)
TSE	M1 <i>hrpE</i> EZ::Tn5 TM <TET1>, Tc ^R , Km ^R	Este trabalho
TSN	M1 <i>hrcN</i> EZ::Tn5 TM <TET1>, Tc ^R	Este trabalho
<i>Echerichia coli</i>		
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mcr</i> - <i>hsdRMS-mcrBC</i>) φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacZX74</i> <i>doeR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ ⁻	INVITROGEN

4.2 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na TABELA 4.

TABELA 4 - PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Plasmídeos	Características	Fonte/ Referência
HR02-MF-00-000-009.CO5	pUC19 contendo uma região do genoma de <i>H. rubrisubalbicans</i> com o gene <i>hrpE</i> .	PROGRAMA GENOPAR
HR02-MF-00-000-009.C05.TET	HR02-MF-00-000-009 contendo um transposon que confere resistência a tetraciclina na região codificadora do gene <i>hrpE</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i>	MONTEIRO, não publicado
HR02-MF-00-000-009.C05.TET.Km	HR02-MF-00-000-009 contendo um transposon que confere resistência a tetraciclina na região codificadora do gene <i>hrpE</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> e contendo um gene que confere resistência a canamicina no sítio <i>StuI</i> do pUC19	MONTEIRO & PETRUZIELLO, não publicado
HR02-MF-00-000-053.F11	pUC19 contendo uma região do genoma de <i>H. rubrisubalbicans</i> com o gene <i>hrcN</i>	PROGRAMA GENOPAR
HR02-MF-00-000-053.F11.TET	HR02-MF-00-000-053 contendo um transposon que confere resistência a tetraciclina na região codificadora do gene <i>hrcN</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i>	MONTEIRO, não publicado
HR02-MF-00-000-053.F11.TET.Km	HR02-MF-00-000-053 contendo um transposon que confere resistência a tetraciclina na região codificadora do gene <i>hrcN</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> e contendo um gene que confere resistência a canamicina.	MONTEIRO & PETRUZIELLO, não publicado

4.3 Condições de Cultivo

4.3.1 Meios utilizados para o cultivo de *H. rubrisubalbicans*

As estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram cultivadas a 30°C em meio NFbHP-malato (KLASSEN *et al.*, 1997) contendo como fonte de nitrogênio 20 mmol/L ou 2 mmol/L de NH₄Cl ou 5 mmol/L de glutamato. As culturas foram crescidas sob agitação (120 rpm) por 18 a 24h.

O meio NFbHP-malato tem a seguinte composição:

	gramas/Litro
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Malato de potássio	5,0
CaCl ₂	0,02
Ácido nitrilo triacético	0,056
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Biotina	0,0001
Solução de Oligonutrientes	10mL
Solução de fosfatos	50mL

Solução de Oligonutrientes:

	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
Água destilada q.s.p.	1 Litro

Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C a 1 atm. No momento do uso foi misturado 20 mM cloreto de amônio (1 mol/L) e então o meio foi denominado NFbHPN-malato.

Para o preparo dos meios NFbHPN semi-sólido e sólido foram adicionados 0,175 e 1,5% (p/v) de ágar, respectivamente.

4.3.2 Meios utilizados para o cultivo de *E. coli*

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em meio líquido Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989), SOB ou SOC (SAMBROOK *et al.*, 1989) sob agitação (150 rpm) ou em meio sólido LA (LB contendo ágar) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

O meio LB (Luria Bertani) tem a seguinte composição (SAMBROOK *et al.*, 1989):

	gramas/Litro
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10

O pH do meio foi ajustado para 6,8. Para o preparo do meio sólido (LA) foi adicionado 1,5% (p/v) de ágar no meio LB. Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C a 1 atm.

O meio SOB tem a seguinte composição (SAMBROOK *et al.*, 1989):

	gramas/Litro
Triptona	20
Extrato de levedura	5
NaCl	0,5
KCl	0,186
MgCl ₂	0,95

O meio SOC é feito utilizando o meio SOB como base suplementado com 20 mmol/L de glucose estéril.

4.3.3 Antibióticos

Os antibióticos foram utilizados nas concentrações descritas na TABELA 5.

TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>E. coli</i>	Concentração final para culturas de <i>H. rubrisubalbicans</i>
Tetraciclina (Tc)	10 µg/mL	10 µg/mL
Canamicina (Km)	100 µg/mL	500 µg/mL
Ampicilina (Amp)	200 µg/mL	-

As soluções estoque dos antibióticos ampicilina e canamicina foram preparadas em água destilada autoclavada, esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,22 µm) e mantidas a -20°C. As soluções estoque de tetraciclina foram preparadas com etanol e igualmente armazenadas a -20°C.

4.3.4 Condições de armazenamento das estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50%. Os estoques foram mantidos a -20°C e repicados uma vez ao ano.

As estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram estocadas a temperatura ambiente em meio NFbHPN-malato semi-sólido.

4.4 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A purificação de plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

As células de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas sob agitação a 37°C por aproximadamente 16 horas em meio LB contendo os

antibióticos adequados. As células foram coletadas (1 mL de cultura) por centrifugação a 13.400 rpm por 1 minuto, ressuspensas em solução 150 µL GET (Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glucose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L) e lisadas com uma solução contendo NaOH 0,2 mmol/L e SDS 1% (p/v). As proteínas, o DNA cromossomal desnaturado, os restos celulares e o SDS foram precipitados pela adição de 150 µL da solução de acetato de potássio 3 mol/L e ácido fórmico 1,8 mol/L, pH 4,8 seguida da incubação em gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm por 5 minutos e o sobrenadante extraído com um volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto por 30 minutos e centrifugado por 10 minutos a 13.400 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em água ultra pura estéril.

4.5 PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *H. rubrisubalbicans*

O DNA genômico de *H. rubrisubalbicans* foi purificado como descrito por SOUZA (1990).

Dez mililitros de cultura de *H. rubrisubalbicans* ($D.O_{600} \approx 2,0$), crescida em meio NFbHPN-malato contendo os antibióticos necessários, foi centrifugada por 1 min a 13.400 rpm. As células foram lavadas com tampão TES (50 mmol/L Tris-HCl pH8,0; 20 mmol/L EDTA pH 8,0, 200 mmol/L NaCl), ressuspensas em 200µl de TES, incubadas com lisozima (100 µg/mL) a 30°C durante 1 hora e lisadas pela adição de SDS 1% (p/v). A solução foi incubada com proteinase K (50 µg/mL) a 50°C por 16 horas, para a degradação das proteínas. A mistura foi extraída com 1 volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) centrifugada e seguida de nova extração com 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em água destilada.

4.6 ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose (0,7 a 1%) em tampão TAE ou TBE (SAMBROOK et al, 1989) em sistema horizontal da Hoeffer. As amostras foram diluídas em Fsuds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, Ficoll[®]10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,02%) e foram aplicadas no gel.

O DNA foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) sob luz UV em um transiluminador (302 nm) acoplado a um sistema de fotodocumentação (UVP).

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES

Tris-borato-EDTA 10X (TBE):

Tris base	108 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 ml
Ácido Bórico	55 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Tris-acetato-EDTA 10X (TAE):

Tris base	48,4 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 ml
Ácido Acético glacial	11,42 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

4.7 DIGESTÃO DE DNA POR ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

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

4.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

4.8.1 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Para o preparo de células eletrocompetentes, a estirpe TOP10 de *E. coli* foi crescida em meio SOB a 37°C sob agitação (150rpm) até atingir uma D.O.₆₀₀ de 0,6. A cultura foi resfriada em banho de gelo por 30 minutos, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, lavada por 2 vezes em água ultra pura estéril gelada. Finalmente as células foram lavadas uma vez em glicerol 15% aliqüotadas e estocadas a -70°C em glicerol 15%.

Trinta e cinco microlitros da suspensão de células eletrocompetentes foram eletroporadas com cerca de 50ng de DNA plasmidial. A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação, e submetida a um pulso elétrico de 330-400 µF, 200 Ω e 4 kV/cm por cerca de 6-10 ms em eletroporador GIBCO BRL (Cat Series 1600). Após o pulso elétrico as células foram ressuspensas em 1 mL de meio SOC sem antibiótico, incubadas a 37°C por 1 hora e plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos adequados.

4.8.2 Preparo de células eletrocompetentes de *H. rubrisubalbicans*

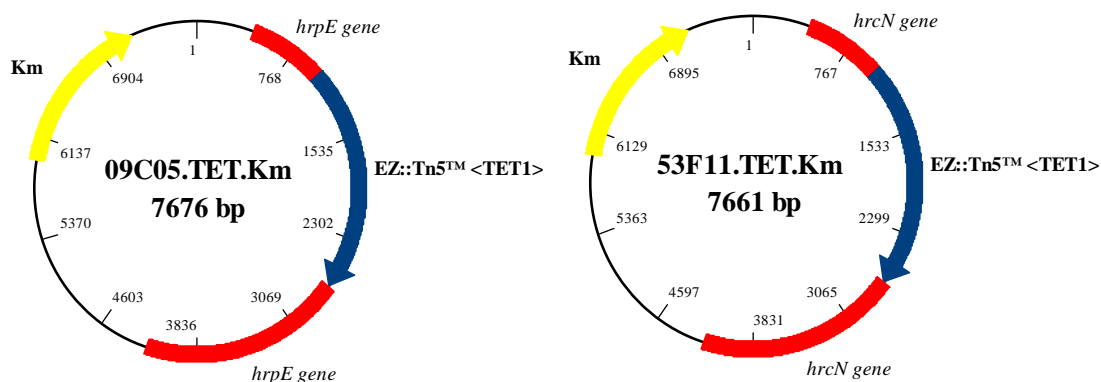
As células de *H. rubrisubalbicans* foram crescidas a 30°C em meio Nfb-malato contendo 1/10 da concentração normal de fosfato (5mmol/L de tampão fosfato de potássio) e 20mmol/L de cloreto de amônia até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,5 a 1,0. A cultura foi resfriada a 4°C em banho de gelo por 30 minutos, centrifugada a 4000rpm por 10 minutos, lavada 2 vezes em água ultra pura estéril gelada, e uma vez em glicerol 15% gelado. Após isto, as células foram ressuspensas em 400 µL de glicerol 15% e aliqüotadas.

Foram eletroporadas 35 µL da suspensão de células com cerca de 100ng de DNA plasmidial. A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação, e submetida a um pulso elétrico de 330-400 µF, 200 Ω e 4 kV/cm por cerca de 6-10 ms. Após o pulso elétrico as células foram recuperadas, em meio NFbHPN-malato sem antibiótico, incubadas a 30°C por 4 horas e plaqueadas em meio NFbHPN-malato sólido contendo os antibióticos adequados.

4.9 OBTENÇÃO DOS MUTANTES NOS GENES *hrpE* E *hrcN* DE *H. rubrisubalbicans*.

A estratégia utilizada para a obtenção dos mutantes *hrpE* e *hrcN* foi a recombinação homóloga. Os plasmídeos HR02-MF-00-000-009-C05.TET.Km e HR02-MF-00-000-053-F11.TET.Km (MONTEIRO & PETRUZIELLO, não publicado) contendo os genes *hrpE* e *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* interrompidos pelo transposon EZ::Tn5TM<TET1> (FIGURA 13), foram eletrotransformados na estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* (M1). As colônias resistentes a tetraciclina foram testadas para resistência em canamicina separadamente, para identificação de recombinantes resultantes de dupla troca.

FIGURA 13 - ESQUEMA GERAL DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES



Plasmídeos referentes aos mutantes nos genes *hrpE* e *hrcN*, HR02-MF-00-000-009-C05.TET.Km e HR02-MF-00-000-053-F11.TET.Km, respectivamente.

4.10 HIBRIDIZAÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL DOS MUTANTES TSE E TSN DE *H. rubrisubalbicans*

O DNA cromossomal da estirpe M1 e dos prováveis mutantes foi extraído, digerido com as enzimas adequadas e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,7%. Antes da transferência o gel foi tratado com 4 soluções: solução de depurinação (HCl 125 mmol/L) por 7 minutos; solução de

desnaturação (NaOH 5 mol/L, NaCl 5 mol/L) por 30 minutos; solução de neutralização (Tris-HCl pH 7,5 1mol/L, NaCl 5 mol/L) por 20 minutos; e com solução de transferência (SSC 20X) por 10 minutos. Entre estes tratamentos o gel foi lavado com água destilada. A transferência do DNA foi feita por capilaridade, através do sistema de Southern Blotting, para uma membrana (Hybond-N⁺ GE Health Core). Após a transferência a membrana foi seca em câmara de fluxo laminar, e o DNA fixado por luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador por 3 minutos.

4.10.1 Preparo da sonda

Os plasmídeos HR02-MF-00-000-009.C05.TET.Km e HR02-MF-00-000-053.F11.TET.Km digeridos com a enzima de restrição EcoRI foram utilizados para o preparo da sonda. Cerca de 50 ng desse DNA foi fervido por 5 minutos e colocado em gelo. Então foram adicionados tampão OLB (1X), 1 µL de BSA (10 mg/mL), 2 unidades de Klenow, água para 25 µL, e α [³²P]dCTP. O sistema foi incubado por 24 horas a temperatura ambiente.

4.10.2 Hibridização

As membranas contendo os fragmentos de DNA preparados conforme o item 4.10, foram pré-hibridizadas em 10mL de solução de pré-hibridização (tampão fosfato pH 8,0, 2% SDS e 20µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado) por 4 horas a 65°C em forno de hibridização Hybaid sob agitação rotatória. A sonda marcada foi diluída em 100µl de água e desnaturada em banho fervente por 5 minutos, resfriada rapidamente em banho de gelo e em seguida, foi adicionada para a solução de pré-hibridização. A hibridização foi realizada por 24 horas a 65°C. Após este período as membranas foram lavadas uma vez com solução SSC 20X contendo SDS 1% por 15 minutos a 65°C. Para a detecção dos sinais de hibridização foi utilizado o sistema Phosphorimager (Storm densitometer – GE Health Core).

4.11 ENSAIOS DE INOCULAÇÃO DAS ESTIRPES M1 E MUTANTES DE *H. rubrisubalbicans* EM CANA-DE-AÇUCAR E VIGNA

4.11.1 Cultivares vegetais

Neste trabalho foram utilizados colmos de cana-de-açúcar do cultivar B-4362 e sementes de *Vigna unguiculata* cultivar *Red caloona*, conhecida como feijão-fradinho.

4.11.2 Desinfecção das gemas e sementes

Os toletes de cana-de-açúcar foram enviadas pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar – CECA/UFAL. Os toletes foram previamente desinfetados superficialmente por um tratamento químico (Karatê 100mL/10L água, Derosal 10MI/10 L de água por 2 minutos) e por um tratamento térmico (submersão em água a 52°C por 30 minutos).

As sementes de *Vigna* foram esterilizadas com ácido sulfúrico 97% por 10 minutos, seguido de quatro lavagens com água estéril (SKORPIL et al, 2005).

4.11.3 Condições de cultivo

Após a desinfecção superficial, as sementes foram pré-germinadas em vasos com terra autoclavada, vasos contendo vermiculita autoclavada ou ainda em blocos contendo envelopes individuais de papel filtro, contendo solução nutritiva BD para plantas (BROUGHTON & DILLWORTH, 1971): (TABELA 7)

TABELA 7 - SOLUÇÃO NUTRIENTE BD PARA PLANTAS

Componente	gramas/litro
CaCl ₂ .2H ₂ O	294,1
KH ₂ PO ₄	136,1
Fe-citrato	6,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	123,3
K ₂ SO ₄	87,0
MnSO ₄ .H ₂ O	0,338
H ₃ BO ₄	0,247
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,228
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,100
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,056
NaMoO ₂ .2H ₂ O	0,048

A solução nutritiva para plantas foi autoclavada por 20 minutos a 120°C e 1 atmosfera de pressão e então foi adicionado 0,05% de KNO₃ autoclavado.

4.11.4 Preparo dos inóculos de *H. rubrisubalbicans*

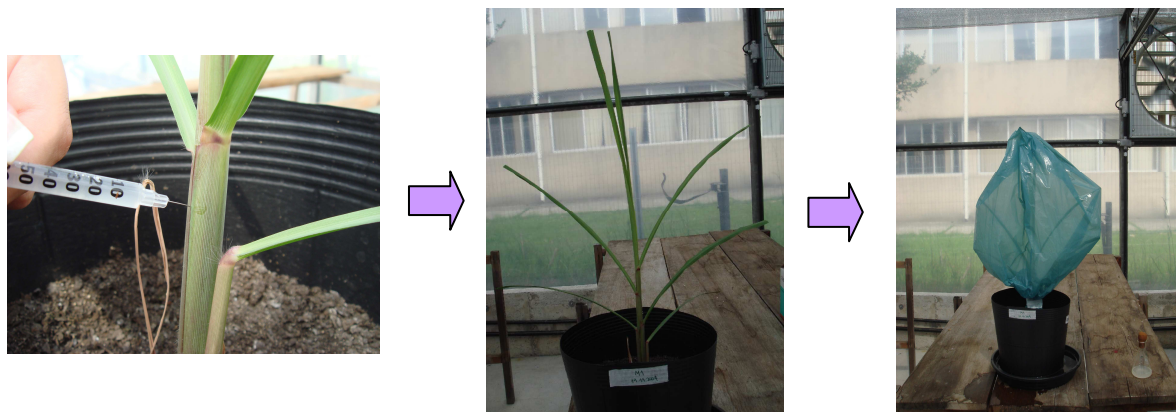
As estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram crescidas por 24 horas ou até atingir D.O. ₆₀₀ de 1,0 em meio NFbHPN-malato e antibiótico. As células a serem inoculadas foram centrifugadas, o meio descartado e as células ressuspendidas em solução indicada para cada experimento.

4.11.5 Inoculação das plantas com *H. rubrisubalbicans*

Setenta dias após a germinação dos colmos de cana-de-açúcar as estirpes M1 e TSE foram inoculadas (10⁸ células por mL) com seringa hipodérmica e agulha fina (volume de 0,5 a 1 mL) no cartucho foliar, 2 a 3 centímetros abaixo da primeira folha. Após a inoculação as folhas foram podadas até a metade incentivando a passagem de seiva pelos vasos do xilema que contribui no espalhamento da bactéria pelos

tecidos e a parte aérea foi envolvida com saco plástico (câmara úmida) para evitar a ação de agentes externos na formação do fenótipo (FIGURA 14).

FIGURA 14 – PROCEDIMENTO DE INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR B-4362 COM ESTIRPES DE *H. rubrisubalbicans*.



No primeiro quadro a injeção de aproximadamente 10^8 bactéria no colmo da planta. No segundo quadro as folhas cortadas ao meio e no último quadro a câmara úmida.

As plantas de *Vigna* foram inoculadas pelo processo de infiltração (FIGURA 15). Após a germinação das plântulas, elas foram transferidas para vasos de Leonard. Vinte dias depois as folhas foram infiltradas com uma suspensão de 10^8 bactérias ($DO_{600}=1$) ressuspedidas em 10mM de $MgSO_4$. Aproximadamente 1mL desta suspensão foi infiltrada nos tecidos foliares com auxílio de uma seringa sem agulha, encostada na parte basal da folha.

FIGURA 15 – PROCESSO DE INFILTRAÇÃO NAS FOLHAS DE *Vigna unguiculata*.



Uma suspensão de 10^8 de bactéria em solução de MgSO_4 10mM foi infiltrada na folha com ajuda de uma seringa na face basal da folha. De três a cinco pontos da mesma folha foram infiltrados.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura ($30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$) e umidade ($70\% \pm 10\%$) controladas, iluminadas pela luz solar e irrigadas de três em três dias.

4.11.6 Determinação dos fenótipos de patogenicidade e colonização

Para determinação dos fenótipos das estirpes de *H. rubrisubalbicans* as folhas das plantas de cana-de-açúcar foram inspecionadas 15 dias após a inoculação e então fotografadas. As folhas de *Vigna* foram fotografadas dez dias após a infiltração.

Para determinar o número de bactérias endofíticas as folhas foram desinfetadas superficialmente com etanol 70% por cinco minutos e maceradas em 1 mL de solução salina esteril. Com os macerados foram feitas diluições seriadas

em salina e plaqueados em forma de gota (10µl) em NFbHP-malato sólido. Trinta horas depois as microcolônias foram contadas e o número de bactérias por grama de folha determinado.

4.12 CURVA DE CRESCIMENTO

Os pré-inoculos de *H. rubrisubalbicans* foram feitos conforme item 4.11.4. Duzentos mililitros de meio NFbHPN foi inoculado com 4mL do pré inóculo e a DO₆₀₀ da cultura foi medida (hora zero). A DO₆₀₀ da cultura foi lida de hora e hora até completarem 15 horas de crescimento.

Para determinação do tempo de geração de cada bactéria, primeiramente o log de valores dos DO₆₀₀ foram plotados em função do tempo (h) em um gráfico. Na faixa linear do gráfico, correspondente ao crescimento exponencial, a inclinação foi determinada e corresponde a taxa de crescimento (μ). O tempo de geração (g) é dado por:

$$g = \ln 2 / \mu$$

4.13 SEQUÊNCIAMENTO DE DNA

Para completar o seqüenciamento do grupo de genes *hrp* de *H. rubrisubalbicans* foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas regiões conhecidas do genoma, para amplificar as falhas utilizando DNA total de *H. rubrisubalbicans*. Para a reação de PCR, Foi coletado 1 mL de cultura crescida de *H. rubrisubalbicans* estirpe M1, por centrifugação, o meio foi descartado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de água pura ultra estéril. Essa suspensão foi aquecida a 95°C por 10 minutos para lise das células e liberação do DNA genômico, após centrifugação a 13400rpm por 1 minuto. O sistema de amplificação continha 5µL de tampão para Taq polimerase, 0,5µL de cada oligonucleotídeo iniciador (estocado a 10 pmol), 2µL de dNTP (5mM), 1,5µL de MgCl₂ (50mMol), 1µL de Taq polimerase e 38µL de água ultra pura estéril. A reação de amplificação foi feita em

termociclador Applied Biosystem 9700 programado com 30 ciclos das seguintes etapas:

Etapa 1: 94°C 30seg

Etapa 2: 50°C 45seg

Etapa 3: 72°C 2 minutos

O amplificado foi precipitado adicionando 26,6µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 133µL de etanol absoluto, centrifugado a 13400rpm por 15 minutos, lavado com 200µL de etanol 70% e dissolvido em 10µL de água ultra pura estéril. Dois microlitros desta solução foram adicionados a 3µL de mistura para seqüenciamento ET mix (Amersham Biosciences) e 10 pmol de oligonucleotídeo específico para cada amplificado num volume final de 7,5µL. Esta solução então foi submetida a uma reação de amplificação do DNA para seqüenciamento utilizando termociclador Applied Biosystem 9700 com a seguinte programação (30 ciclos):

Etapa 1: 96°C 30seg

Etapa 2: 60°C 2minutos

O produto da reação de amplificação de DNA para seqüenciamento foi transferido para um tubo do tipo Eppendorf de 500µL e foram adicionados 12,5µL de H₂O, 2µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 60µL de etanol absoluto. O sistema foi centrifugado (13400 rpm, 15 minutos), o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 450µL de etanol 70%. Após centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado e o DNA seco a vácuo. O DNA foi ressuspendido em 25mM de EDTA (pH 8,0) e formamida deionizada, Blue Dextran 50mg/mL em uma proporção de 5:1. Este produto foi desnaturado por 2 minutos a uma temperatura de 96°C e submetido à eletroforese em seqüenciador automático ABI377 (Applied Biosystems).

4.14 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO AGRUPAMENTO DE GENES *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans*

Os eletroforetogramas correspondentes às seqüências obtidas neste trabalho, juntamente com as seqüências de BALSANELI (2007) foram processados pelo programa PHRED (EWING *et al.*, 1998a; EWING *et al.*, 1998b). Este programa faz a identificação das bases nucleotídicas considerando a intensidade do sinal, espaçamento entre picos e o espectro de emissão de cada fluoróforo, além de atribuir um valor de qualidade para cada base da seqüência. Em seguida, estas seqüências de bases foram alinhadas com um banco de seqüências de vetores, através do programa Cross_Match (desenvolvido por Phil Green). Este programa mascara seqüências do vetor presentes nas seqüências de interesse, substituindo o nucleotídeo pela letra "X". As seqüências filtradas pelo programa Cross_Match foram utilizadas para a montagem das seqüências consenso, pelo programa PHRAP.

O programa PHRAP realiza a montagem das seqüências em *contigs*. A montagem das seqüências nas direções 5' e 3' sobrepostas utiliza os valores de qualidade produzidos pelo programa PHRED (EWING *et al.*, 1998a; EWING *et al.*, 1998b) para a construção do alinhamento das seqüências e para a criação da seqüência consenso. Essa montagem apresenta três fases. Na primeira, as regiões das leituras nas direções 5' e 3' de baixa qualidade são identificadas e removidas, e as regiões restantes são alinhadas. Regiões de sobreposição parcial são removidas. Na segunda fase, as seqüências 5' e 3' são reunidas para a formação de *contigs*. Na terceira fase, o alinhamento das seqüências é construído e a seqüência consenso resultante tem seu valor de qualidade computado, tanto para cada base quanto para cada *contig*.

A montagem foi visualizada através do programa CONSED (GORDON, ABAJIAN & GREEN, 1998). Este programa também indica *contigs* fisicamente ligados, quando as seqüências 5' e 3' de um mesmo clone encontram-se em *contigs* diferentes. Os *contigs* obtidos foram analisados pelo programa BLASTx (YE, MCGINNIS & MADDEN, 2006; ALTSCHUL *et al.*, 1990), para identificar proteínas similares no GenBank.

As comparações de seqüência de proteínas foram feitas utilizando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). As prováveis ORFS foram identificadas pelo Programa Frameplot (<http://www0.nih.gov/~jun/cgi->

[bin/frameplot.pl](#)).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

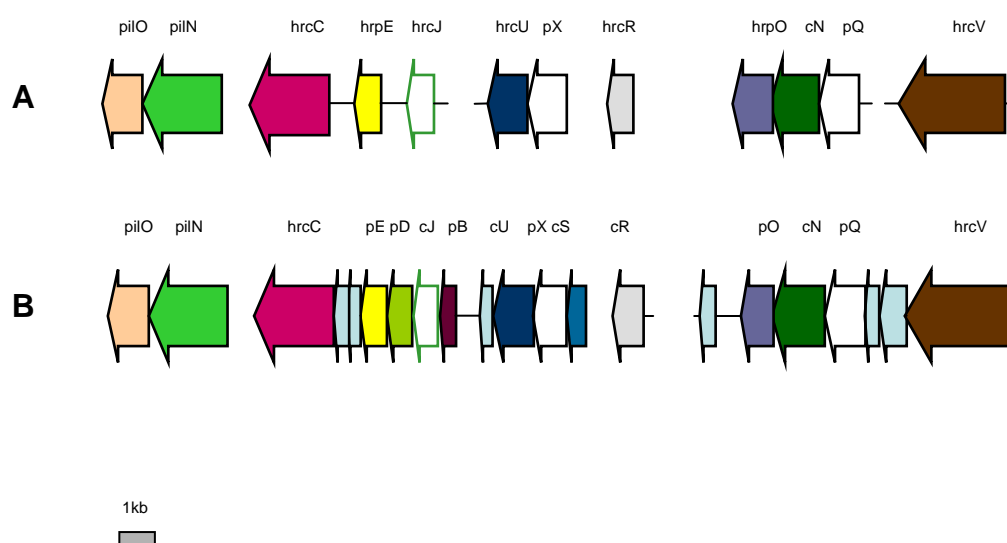
5.1 SEQUÊNCIAMENTO E ANÁLISE *in silico* DO GRUPO DE GENES *hrp/hrc* DE *H. rubrisubalbicans*

A partir da montagem dos genes correspondentes ao grupo *hrp/hrc* feita por BALSANELLI (2007) e acrescentando as sequências obtidas neste trabalho foi possível obter uma nova montagem do agrupamento *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* através dos programas PRHED, PHRAP e CONSED. As sequências obtidas neste trabalho foram resultado de ampliações feitas com primers construídos a partir de regiões conhecidas para fechamento de regiões não conhecidas.

As sequências consenso obtidas foram analisadas utilizando o programa BLASTx (YE, MCGINNIS & MADDEN, 2006; ALTSCHUL et al, 1990), para busca de produtos gênicos similares e identificação da função destas regiões. Desta forma, foram selecionados 14 *contigs*, os quais apresentaram genes homólogos aos genes *hrp/hrc*, assim como prováveis genes codificadores de proteínas secretadas.

Como já demonstrado por BALSANELLI (2007) esta região apresenta os genes *pilN*, *pilO*, *hrcC*, *hrpE*, *hrcJ*, *hrcU*, *hrpX*, *hrpQ*, *hrcN*, *hrcV* e *hrpR*, todos codificadores de proteínas estruturais do SST3. A partir das novas sequências foi possível identificar na montagem os genes *hrpD*, *hrpB*, *hrpO*. Além disso, sete proteínas hipotéticas conservadas foram sequenciadas e identificadas (FIGURA 16).

FIGURA 16 – COMPARAÇÃO DAS REGIÕES SEQÜENCIADAS DOS GENES *hrp/hrc* FEITAS NESTE TRABALHO



Em **A** o agrupamento descrito por BALSANELLI 2007. Em **B** as regiões seqüenciadas neste trabalho. Em azul claro as proteínas hipotéticas; encontrados a jusante dos genes *hrpE* e *hrcJ* os genes *hrpD* e *hrpB* respectivamente.

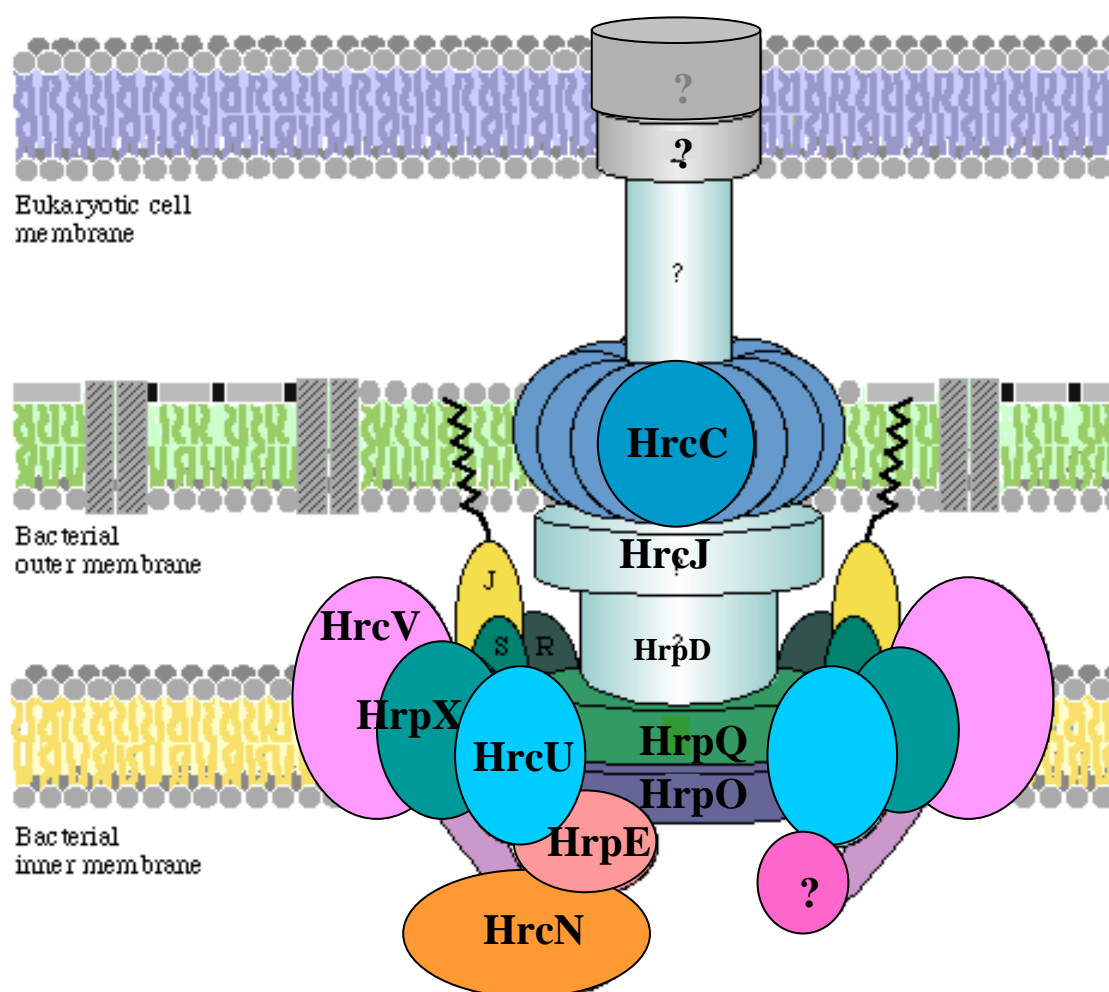
As proteínas que fazem parte do SST3 são divididas em três grupos, as citoplasmáticas, as transmembranares e as extracelulares (DEANE et al, 2006).

As proteínas PilO e PilN são componentes do SST4 (ROINE et al, 1996) e as demais mostrados na FIGURA 16 correspondem ao SST3.

HrcN é uma ATPase do sistema, responsável pela transdução de energia através da hidrólise de ATP e pela separação da proteína efetora e chaperona (AKEDA & GALAN, 2005). A proteína HrpE se ancora na ATPase do sistema que faz conexão com a membrana interna, agindo como uma região não catalítica da ATPase (PALLEN, BAILEY & BEATSON, 2005). HrcU, HrcV, HrpD, HrpX e HrpQ compoem a estrutura basal do sistema (HUECK, 1998). HrcU atua no controle da secreção de efetores (ALLAOUI et al., 1994). HrpX atua na montagem do *pili hrp* (VAN GIJSEGEM et al., 2002). HrcV interage com chaperonas e facilita a entrada de efetores no SST3 (ALEGRIA et al., 2004). HrpR, outra proteína localizada na membrana interna, provavelmente participa da exportação do *pili hrp* (HUECK, 1998; ALFANO & COLLMER, 1997). Já a proteína HrpO está envolvida no reconhecimento e translocação das proteínas efetoras pelo anel da membrana interna (FRASER et

al, 2003). HrcJ forma a estrutura central do sistema no periplasma (DENG & HUANG, 1999). A proteína HrcC é responsável pela formação do complexo multimérico em forma de anel na membrana externa (DENG & HUANG, 1999). As proteínas formadoras do injectissoma não foram localizadas nesta sequência assim como as formadoras do poro da célula eucariótica. Baseando-se na função de cada proteína, um esquema pode ser montado para a disposição delas nas membranas interna e externa de *H. rubrisubalbicans* como mostra a FIGURA 17. A comparação e identidade destas proteínas com outro organismo estão descritos na TABELA 8.

FIGURA 17 – ESQUEMA GERAL DA DISPOSIÇÃO DO APARATO DO SST3 EM *H. rubrisubalbicans*



Esquema adaptado de Thanassi & Hultgren (2000). Onde J corresponde a HrcJ, S a HrpS e R é HrpR.

TABELA 8 - Proteínas relacionadas a sistemas de secreção de *H. rubrisubalbicans*, função e identidade com outros organismos

Proteína	Função	Organismo com identidade de sequência	Identidade
HrcV	Componente da estrutura basal	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	56%
HrcN	ATPase	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	60%
HrcR	Componente da estrutura basal	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	52%
HrcS	Componente da estrutura basal	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	37%
HrcT	Componente da estrutura basal	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	35%
HrpX	Montagem do pili	<i>Pseudomonas cichorii</i>	27%
HrcU	Controle de secreção	<i>Janthinobacterium sp</i>	46%
HrcJ	Estrutura central no periplasma	<i>Pseudomonas cichorii</i>	54%
HrpE	Ancora e regula a ATPase	<i>Pseudomonas cichorii</i>	30%
HrcC	Forma o poro da membrana externa	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	35%
HrpQ	Componente da estrutura basal	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	27%
HrpO	Reconhecimento e translocação de proteínas efetoras	<i>Erwinia amylovora</i>	24%
HrpD	Componente da estrutura basal	<i>Azotobacter vinelandii</i>	29%
PilO	Componente do SST4	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	38%
PilN	Componente do SST4	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	42%

5.1.1 Proteína HrpE

O gene *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* foi completamente seqüenciado e possui 609 pb, e codifica para uma proteína de 202 aminoácidos. HrpE é uma proteína membrana citoplasmática homóloga às proteínas ligadoras de proteínas citoplasmáticas com a membrana interna FliH (de *E. coli*) e YscL (de *Y. enterocolitica*),

que por sua vez são homólogas a subunidade b da F₀ da ATPase F₀F₁ (PALLEN, 2006). FliH regula a atividade da ATPase FliI que é homóloga a HrcN de *H. rubrisubalbicans* (LANE, O'TOOLE & MOORE, 2006). Além disso FliH interage com FliJ, homóloga a HrpO. A proteína HrpE de *P. syringae* interage fortemente com HrpO, na fração citoplasmática da célula, com isso HrpE possui também um importante papel na formação da estrutura do complexo (GAZI et al, 2008). A FIGURA 18 mostra o alinhamento de seqüências das proteínas HrpE e FliH de organismos patogênicos, além de HrpE de *H. seropedicae*.

FIGURA 18 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrpE e FliH

HrubriHrpE	-----MSDFAVQRVTLDPDHLRPANG-----	20
HseropedicaeHrpE	-----VAPATSSFLAAELCLPPSLRPRHG-----	24
PcichoriiHrpE	-----MLTSRSLTTSNRSTVNEPLLRRREV-----	25
PviridilavaHrpE	-----MKETLMLTRRSINLPADRITLIEPLLRRRET-----	30
PsyringaeHrpE	-----MLAKRSITLTAT-ALLPEPVLRRRED-----	24
BubonensisFliH	MSDPASDRAGSLT---AYQRWEMASFDPPPPPPDDTAAAAA---AALAE-----	45
BpertussisFliH	MSEALAREPVALPRSAAWRRWQMSLDFEPAEAETPEPAALEPEPEPADPDEE-----	52
RalstoniaFliH	MARPPIIPRDTLV---DFQPWEPDFERQAALAAAAAAPPPEPEPEPEE-----	49
ErwiniaFliH	MSDNA-----SLPQRWQPNDLAQ-PKPQ--PTEEPVQPEVSEEPLEQ-----Q	41
EcoliFliH	MSDN-----LPWKTWTDDLPAP-PQAEFVPMVESEE-TIIEEAEP-----L	40
YenteroliticaFliH	MSDRIN-----TLPWQPWSLNDFASQPEPTAVTAPPDISMLFTDEPREDGEPTEGDK	52
EamylovoraHrpE	-----MLTRRRITLLNAEADLAPVVSQAQL-----	25
PputidaFliH	---MPTKEHHPSDLIRARDLEGVVWTLPSFDPEPEPEPEPEPEPEPEVEE-----	48
XanthomonasFliH	-----MNEVVTRWLPADLQLVLPALPEPDYEEP-----	27
SentericaHrpE	-----MSFTSLPLTEINHKLPARNIIESQWITLQLTLFAQEQ-----	37
HrubriHrpE	----VLR-LTGLTVTSDAEQLAAQMLAAREEAAQVRKQ-----AEEEAGHVVMRQQQ	68
HseropedicaeHrpE	----VVS-SVDFRVTTEDARLAAQLVQQAQAEAGIREQ-----ARADALAALHDEER	72
PcichoriiHrpE	----LEQSLLAEEELLEDDARARAREILDTAEEAEALRQR-----CEQTRAEVWQQAQ	74
PviridilavaHrpE	----LEDCLLADEVLHDARTQAEAILAEAHAEADVLRQS-----WEEQARAEVWEEAR	79
PsyringaeHrpE	----IANSLLARDVLADARQAQMLVLEQQKADLVHQ-----QALASFWENAN	69
BubonensisFliH	--LQVRV-----DAAHAEGLTSGHVEGQALGYQAGYEQ-----GRQQGFAGQAEVR	90
BpertussisFliH	--LLREWRATAERAGHAAGHQGEQQRREGYAGHAQGLAAGRAEGHAEGLAGREDAR	110
RalstoniaFliH	--PISEE---EWHAMLEAELANARDEGRRDGFAGGFQD-----GFEQGRRQGE	92
Erwinia	QFQLEEWQTQVRNEAQQGGYAEQQRQGFSEGGKAGYDAG-----FQQGLAESQQQQA	93
EcoliFliH	EQQLAQQLMQAHEQQGYAGIAERQQGHKQGYQEGLAQG-----LEQGLAEAKSQQQA	92
YenteroliticaFliH	QQILMNLQLEAEKQGRQQGFAKGLQEGLDKGYQTGLEEG-----HQQALADAQKQLA	104
EamylovoraHrpE	----CIQQGQDILEQARQQAQAMLEEAERQAEVEMLN-----AQQRAEQAFWQQAD	73
PputidaFliH	----EEVPLEEVQPLTLEELEAIRQEAYNEGFATGEREG----FHSTQLKVRQEAEEALK	100
XanthomonasFliH	----AMLEPVLRPPTLEEIQAIEDAAQHEGFARGHAE-----FAQQGSEVR	70
SentericaHrpE	----QAKSVSHAIVSSAYRKAEKIIRDAYRYQREQKVE-----QQQELACLKRNKLTLEK	86
HrubriHrpE	EVAQQGAVLLEGLRQAQDDMLERIEEVVVDLAQEVMERLLELTPRE--RITAMLRRIQ	126
HseropedicaeHrpE	RIAHEAGQLLARLRERERASMLEGVAGLAVDLAHSIFDRLLVDTTARE--RVMAACRRVRE	130
PcichoriiHrpE	-----SLLDDLREQERTTLATVVEAAEDLVQQALQLVLGELSDDGQ--KVSAVLRQLTS	125
PviridilavaHrpE	-----ALLEDLRTQREQALETLVETAAQLVSQLGSLLEKIPDK--KVRSVIRQLAL	130
PsyringaeHrpE	-----AFLAELQVQREVLQQQAMAAVEELLESESLRHLLDDTTLAE--RARALVKNLAA	120
BubonensisFliH	EQAQQLAALAASFREALAAAEHDLAADVAQLALDIAQQVVRQHVKHDPALVAADRDLVA	150
BpertussisFliH	QQAERLHALAQACAASVARLEDNMGQSLTLALDIAQQVLRITLAEHPEAMVAAVREVLQ	170
RalstoniaFliH	EDSRQIAALMQSVREAIQDMNGSIAEELVGLALQLAQQFLRGALHAQPERILPLVREVLG	152
Erwinia	PVQARMQQLVSEFHNALRGLDSVIASRLMQLALEAARRVIGQAPHVDGTALLRQIQEMLQ	153
EcoliFliH	PIHARMQQLVSEFQTTLDALDSVIASRLMQMALEAARQVIGQPTVDNSALIKIQIQLLQ	152
YenteroliticaFliH	PTTAHWQTLVDFQNTLDALDSVIASRLMQMALAAAKQILGQPAICDGTALLAQIQQMIQ	164
EamylovoraHrpE	-----TLLQSWQQQYQQLAQVLEVMDSVLTQALDQLLTDVPQTQ--RLAAILRQLLR	124
PputidaFliH	TKLDSLERLMANLMPEIAEQDTIQIEKSLVHLIAHMSRQVIGRELNRNDSQITQVLRALK	160
XanthomonasFliH	RLTAQIDGILDNFTRLPARLENEVVGALGELAVRIAGQLVGRAYQADPQLLADLVGEAVD	130
SentericaHrpE	MEVEWLEQHVKHLQDDENQFRSLVDHAAHIKNSIEQVLLAWFDQQSVD SVMCHRRLARQA	146

HrubriHrpE	EAPPKLEHAVLWVHPDDQPLLP-----ASSWEMQTDALAPGSCRLAASGEWRSD	178
HseropedicaeHrpE	EAPPKLTFAVAVLHPEDAASLAQ-----EDALPWELRTDARLAQGSCRLAASGEWRADF	185
PcichoriiHrpE	ASP-NEESALIYCHPDRITLLAQSLLEEQQLG-WTLRGDPNLEPDALISLRTHEGDFSLSW	183
PviridilavaHrpE	ASS-NQETALLFCHPDQLDAVALNLETHDQPG-WTLRTDASLDPDAISLRTENGDFSLSW	188
PsyringaeHrpE	SQI-NEAVATLSVHPDMAEPVTEWLADSRFAQYVQLKRDAASLTERLRLSDANGAFDIDW	179
BubonensisFliH	AEPALSGAPHLTVHPADLPVVEAYLQEELDALGWSVRTDATIERGGCRAHAATGEVDATL	210
BpertussisFliH	INPATGAAMRLWVHPDDLELVRTHLADELNEANWRLQADESITRGGCRTETAYGDVVDATL	230
RalstoniaFliH	DAPTAPAPAMLRVHVDDAELIRQTLGTELAAGWTLVVDAIERGGCRVQTRFGETDATL	212
Erwinia	QEPMFSGKPTLRVHPDDLPRVESTLGATLSLHGWRLLGDSTLHPGGCKVSAEDGDLDAI	213
EcoliFliH	QEPPLFSGKPKQLRVHPDDLQVDDMLGATLSLHGWRLLGDPPTLHPGGCKVSADEGDLDAV	212
YenteroliticaFliH	QEPMFAGKPKQLRVNPNDLAVVEQRLGSTLSLHGWRLLGDSQIHPGGCKVSAEEGDLDAI	224
EamylovoraHrpE	AKTLTEQGS-LYCHPAQHLEIADWLR-SHDHLAWQLQPDSELAQDSLKLVTANGELSLDW	182
PputidaFliH	LLPMGADNIRIHLNPQDFELAKALR--ERHEENWRLLLEDSTLLPGGCRIETAHSRIDATM	218
XanthomonasFliH	AVGGAGREVEVRLHPDDITALLPHLAP---SSTFRVAPDMSLSRGDLRVHAESVRIDGTL	187
SentericaHrpE	TAAEEGALYLRIHPEKALMRETFG----KRFTLIIIEPGFSPDQAELSSTRYAVEFSL	201
	:	:
HrubriHrpE	ALAVQALR-----DGLAGASARLKEQAPS-	202
HseropedicaeHrpE	SLAAEALRATVQQWNPAGGGATEDACGVGDDELDDDPDQEEEDGEQS	233
PcichoriiHrpE	NALQRHVWP-----	192
PviridilavaHrpE	SGLQQQIWP-----	197
PsyringaeHrpE	ATLRNGLAGRDSA-----	193
BubonensisFliH	PTRWQRVAAAIGKVSAAW-----	227
BpertussisFliH	QTRWRRVAASLGRSAWEEETA-----	251
RalstoniaFliH	QTRWAELTRALGRDTAWIASERIETERVAGGALHVA-----	248
Erwinia	ATRWHELCRLAAPGEL-----	229
EcoliFliH	ATRWQELCRLAAPGVV-----	228
YenteroliticaFliH	ATRWHELCRLAAPGEL-----	240
EamylovoraHrpE	QQAVRQLLPPQTAS-----	196
PputidaFliH	ETRIEKAVTQLFDQLHDHSLHPAAPDMSIDLDAPAERAVDSPDAP---	263
XanthomonasFliH	DARLRAALETVMRKSGAGL-----	206
SentericaHrpE	SRHFNALLKWLNRNGEDKRGDEY-----	224

O símbolo ":" indica aminoácidos conservados entre as sequências. O símbolo "." indica aminoácidos semi-conservados. As letras representadas pela cor vermelha são aminoácidos hidrofóbicos, os azuis são ácidos, os de cor magenta são os básicos. Os aminoácidos representados pela cor verde tem características hidroxil – amino – básico, outros tipos estão representados pela cor cinza.

Proteínas similares a HrpE:

HrubriHrpE – HrpE de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1
HseropedicaeHrpE – HrpE de *Herbaspirillum seropedicae* Smrl (PROGRAMA GENOPAR)
PcichoriiHrpE – HrpE de *Pseudomonas cichorii* (ABA47306)
PviridilavaHrpE – HrpE de *Pseudomonas viridiflava* (AAT96357)
PsyringaeHrpE – HrpE de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (YP_234289)
BubonensisFliH - FliH de *Burkholderia ubonensis* Bu (ZP_02382352)
BpertussisFliH – FliH de *Bordetella pertussis* Tohama I (NP_880144)
RalstoniaFliH – FliH de *Ralstonia solanacearum* UW551 (ZP_00944662)
ErwiniaFliH – FliH de *Erwinia tasmaniensis* Et1/99 (YP_001907919)
EcoliFliH – FliH de *Escherichia coli* O157:H7 str. EC4115 (ZP_02771611)
YenteroliticaFliH – FliH de *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 (CAL12580)
EamylovoraHrpE – HrpE de *Erwinia amylovora* (AAB49176)
PputidaFliH – FliH de *Pseudomonas putida* W619 (YP_001750543)
XanthomonasFliH – FliH de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10 (CAJ23673)
SentericaHrpE – HrpE de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg str. SL476 (ACF66423)

Através do alinhamento da proteína HrpE de *H. rubrisubalbicans* com suas homólogas, que em alguns organismos se compara com HrpE do SST3 e em outros com FliH do sistema flagelar. Observa-se que esta proteína é pouco conservada entre as espécies. O alinhamento realizado com o programa ClustalW mostrou baixa similaridade na sequência de aminoácidos desta proteína. A identidade de HrpE de *H. rubrisubalbicans* comparada com *H. seropedicae*, que são organismos do mesmo gênero, é de 44%, indicando que esta proteína é pouco conservada, mesmo entre bactérias altamente relacionadas.

5.1.2 Proteína HrcN

A proteína HrcN é uma ATPase do SST3. Durante o processo de exportação a ATPase, juntamente com outros componentes citoplasmáticos, se associa com o complexo de exportação na membrana interna aonde esta proteína forma um anel dodecamérico. O mecanismo de translocação ainda não é conhecido, mas a ATPase parece causar dissociação das proteínas que serão exportadas de suas respectivas chaperonas (MULLER et al, 2006). As proteínas que interagem com a ATPase do SST3 tem um papel importante no mecanismo e na regulação da secreção (JHONSON & BLOCKER, 2008).

A proteína HrcN é homóloga a proteína YscN de *Y. enterocolitica*, e como descrito por STONE et al (2008), possui três domínios catalíticos. Possui uma região não conservada N-terminal que possivelmente é importante para a oligomerização, um domínio central catalítico com duas regiões de ligação de ATP e a região C-terminal de função desconhecida. Esta proteína possui duas regiões conservadas de ligação. A primeira região conservada, denominada motivo Walker A, é constituída pela sequência GXXXXGKT/S, onde X é comumente um aminoácido de menor massa molecular. A segunda região conservada é o motivo Walker B, constituída por uma sequência RX_nH_4D de resíduos hidrofóbicos, seguido por um aspartato, que é necessário para a atividade catalítica e provavelmente está envolvido na ligação de Mg^{2+} (WOESTYN et al, 2004).

O gene *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* possui 1329 pb, que codifica para uma proteína de 442 aminoácidos. Seu seqüenciamento foi completado neste trabalho, além do seqüenciamento dos genes adjacentes, HrpQ a montante e HrpO a jusante

na sequência gênica. A FIGURA 19 mostra o alinhamento da proteína HrcN de *H. rubrisubalbicans* com a de outros organismos evidenciando a região central catalítica e os motivos Walker A e B.

FIGURA 19 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrcN

Hrubri	-----MRRQLG-----AWRQSLNPRPG----FVSFGKVSQVLGTLVE	33
Hseropedicae	MVKRDDVFQAALEGGQLAALRARLP----AWQAALPLRPG----FSSQGRVAQVLGTLIE	51
Etasmaniensis	-----MVMSALRQSLT-----QWAQRQQRLEGYAPVSRYGRTGISGILIE	42
Eamylovora	-----MVMSALQRLT-----QWAQQHQRRLERYAPVSRYGRTGISGILIE	42
Pcichorii	-----MNSTMTPLD-----TWRQEHSERLQRCAVPEVMGRIAGVSGILLH	40
Pviridiflava	-----MVNAALD-----QWKAVQAARLSQYSAVRVSGRVSAVRGILLE	38
Psyringae	-----MNAALN-----LWKDAHARRLSEYCAVRVIGRVSAVRGILLE	37
Bpertussis	-----MRQYHYIT-----EMMRVALQDLSTLRKGRVVQVVGTIK	36
Yenterocolitica	-----MLSLDQIP-----HHIRHGIVGSRLIQIRGRVTQVTGTLK	36
Bubonensis	-----MSADEPLRTAEFSLADAIEREILAVSGVVRTGRVLEVIQTLLK	44
Xanthomonas	-----MLAETPL-----LETTLERELATLAVGRRYGKVVVEVGTMLK	37
Rsolanacearum	-----MSHLALL-----ESLESAARTAPLIRRFQKVVVEVTGTLR	35
Senterica	-----MKNELM-----QRLRLKYPPPDGVCRWGRIQDVSATLLN	34
Pputida	-----MRLDRTSFG-----KRLGGYAEAIKLPVQPVVEGRLLRMVGLTLE	40
Ecoli	-----MSDFSAFD-----NALR-SLESIPLAR---VAGRVLRLNGILLE	35
	:	*:: : . : .
Hrubri	AHMPPVQIGELCHLRDPHV-EGPPILAEVVGFTDKAAILSALSPLIEGVSSSTIIEPLRRA	92
Hseropedicae	AHMPPVQIGELCNLFNPEQ-PGKTMLAEEVVGFTDKASILSALSPLIEGVSTRVIEPLRRS	110
Etasmaniensis	CTLPGARIGDLCRIQRSD---GGSVLSEIVGFSPKILLSALGALDGISQGAIIPPLYL	99
Eamylovora	CILPGARIGDLCRIQRSD---GGSVLSEIVGFSPKILLSALGALDGISQGATIVPLYL	99
Pcichorii	SHMPQARIGDLCEIRRAD---GTEVMAEIVGFDRKHTLLAALGALDGAIGAPVPLFQP	97
Pviridiflava	CKLPAAKVGDLCVSKAD---GSLLLAEIVGFPTDCTLLSALGAPDGIQVGIAPPLGIA	95
Psyringae	CKIPSAKVGDLCVSKAD---GSLLLAEIVGFPTDCTLLSALGPPDGIQVGIAPPLGVA	94
Bpertussis	AVVPMVKIGEVCLLRNPG---EDFEMHGEVVGFRDAALLTPIGDMYGISSATEVITPGR	94
Yenterocolitica	AVVPGVRIGELCYLRNPD---NSLSLQAEVIGFAHQALLIPLGEMYGISSNTEVSPGTM	94
Bubonensis	VSGLDVALGELCELRTR---GRLLQRAEVVGFTRDVALLSPPFSQLEQISRTTQVIGLRP	102
Xanthomonas	VAGVQVSLGEVCELRQD---GTLLQRAEVVGFSDRLALLAPFGEIIGLSRETRVIGLRP	95
Rsolanacearum	VGGVDVRLGELCTLEAD---GTVMQEGEVVGFSEHFALVAPFSGVGLSRSTRVVP SGRA	93
Senterica	AWLPGVFMGELCCIKPGE-----ELAEVVGINGSKALLSPFTSTIGLHCGQVMALRRR	88
Pputida	AEGLRAPVGARCLVINDDSYHPVQVEAEVMGFAGSKIFLMPVGS IAGIAPGARVPLDDS	100
Ecoli	SVGCPLMTGQLCRIESAN---HTLIDAQAVGFNRDITYLMPFKQPVGLMAGARVFPPEKA	92
	* * :	. : :* : . . : :
Hrubri	HSIEVGDHLLFGCVLDGFRWMFR-APAAAENVATWRAMSPVMDAPKATDRPRI SVPLAT	151
Hseropedicae	HSIEVGDHLLFGCVLDGFRWMFR-APAAQENVATWRAMSPVIRDAPPATSRPRIATPLPT	169
Etasmaniensis	HSICVSERLGSLVDGFRALPEGGHSAFAKPGTKVRAVPVLNDAPPPTERPRIDTPLPT	159
Eamylovora	HSICVSEQLLGSVLDGFRALPEGGHSAFAEPGTQVRAVPVLNDAPPPTERPRITPLPT	159
Pcichorii	HSLVVEYLLGSVLDGFRSLSGDGFSAFALSG-AAGAQPVIRDAPPATERPRIEAPLST	156
Pviridiflava	HRIGVDDSLGCVLDGFRPLLDGALGAFAGPDDRRTTLPVIADALPPTQRPRI SRALPT	155
Psyringae	HRIGVDDSLGCVLDGFRPLMGDCLGAFAGPEDRRTTLPVIADALPPTQRPRI TRALPT	154
Bpertussis	HMVPVGPGLLGRVLDGLGRPLDAAESGPL----HAHKFYPVFADAPDPLTRRII HAPLEL	150
Yenterocolitica	HQVVGVEHLLGQVLDGLGQPFDDGHLPL----EPAAWYPVYQDAPAPMSRKLITPLSL	148
Bubonensis	LSIPVGDALLGRVIDGLGEPDLDG--GPPL----ASETLQPLIAAPP EPMSRRMIDAA MPT	156
Xanthomonas	LAVPVGPAALLGRVLDGLGEPDLDG--QGAI----ACDTWVPIQAQAPDMRRRLIEHPMPT	149
Rsolanacearum	LSVGI GPGLLGRVLDGLGEPDLDG--GPPL----DVVEHVVPFANAPDPMTRRLVEHPLAT	147
Senterica	HQVPVGEALLGRVIDGFRPLDGLCELP-----DVCWKDYDAMPPPAMVRQPI TQPLMT	141
Pputida	GRLPMGMSMLGRVLDGAGRALDGKGGMK-----AEDWVPMDGPIINPLNRDPI SQPLDV	154
Ecoli	HDILIGESWLGRRVNLGEPDLDGKRLN-----GNDLLPPLPSPVNLTRRSVDEPLDV	146
	: : . : * * : * * .	. * : . :


```

Hrubri          ELLIRLGEYKSGTDPVADRAVKLRAEQLAFLRQDTSTSAFFQPTLDKLMELQA----- 442
Hseropedicae   ELLIRLGEYKSGADPVADRAMELRPEQLSFLRQDTSGSADFQETLDTLLEMAQ----- 460
Etasmaniensis EMLIRLGEYQPGNDGLTDAAVNANDIINRFLRQSMRAPDPFEQTQYHLAEVSAHAPD--- 454
Eamylovora     EMLIRLGEYQPGNDSLTDAAVNANDIINRFLRQSMRAPDPFEQTQYQLAEVSAHAPD--- 454
Pcichorii      EMLIKLGEYQQGNDPLTDFAVQSRDQIMDFLQQSLRDPVSL EDTLDHLIQVTADVPR--- 451
Pviridiflava  EMLIRLGEYQAGSDPVTDCAVKLNEDINAFRLRQDLREPVPLEETLNALLRITSQLPE--- 450
Psyringae      EMLIRLGEYQAGADPVTDCAVQLNEAINAFRLRQDLREPVPLEETLDRLQLTSQLPE--- 449
Bpertussis     ELLVKIGEYKQGADASTDEAIQKIGQINAFRLRQLTDEREAFEDTVLRMAEIIIGPES---- 444
Yenterocolitica ELLIQIGEYKQGQKQADQAIERMGAIRGWLCQGTHELSHFNETLNLLLETLTQ----- 439
Bubonensis    EVLLQIGEYKAGANPLADEAIAKADAIRSFFSQRTDDYAAAEDTVARLYALSGAN----- 449
Xanthomonas   ETLVQVGEYRQGSDAVADEAIDRIDAIRDFLSQPTDQLSAYENTLELLTSVTDDA----- 442
Rsolanacearum ETLQMGEYKEGSDPVADAAVQWNDWMEGFLRQRTDEWCSPEDETRRLLEIALA----- 439
Senterica     ELLIRIGEYRQGVDTDTKAIDTYPDICTFLRQSKDEVCGPELLIEKLHQILTE----- 433
Pputida       RDLISVGAYVAGGDEPDTDLAIALQPKLVDFLRQGLDENVGMDQSRQQLGAIFTPPANG-- 452
Ecoli         KPLIPLGGYVAGADASVDKAVKMFPAIERFLRQEMREPASLELVQSLQILFPGVKKAEQ 445
. * : * * * : . * * : : * : : :

```

O símbolo “*” indica que os aminoácidos são idênticos em todas as seqüências, o símbolo “.” para os aminoácidos conservados. O símbolo “.” indica aminoácidos semi-conservados. As letras representadas pela cor vermelha são aminoácidos hidrofóbicos, os azuis são ácidos, os de cor magenta são os básicos. Os aminoácidos representados pela cor verde tem características hidroxil – amino – básico. A região realçada por cinza representa o domínio central catalítico de HrcN. Regiões realçadas por verde-água são sítios catalíticos, denominados domínios Walker A e B.

Proteínas similares a HrcN:

Hrubri – *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1
Hseropedicae – *Herbaspirillum seropedicae* Smrl (PROGRAMA GENOPAR)
Etasmaniensis - *Erwinia tasmaniensis* Et1/99 (YP_001906467)
Eamylovora - *Erwinia amylovora* (AAB06001)
Pcichorii - *Pseudomonas cichorii* (ABA47275)
Pviridiflava - *Pseudomonas viridiflava* (AAT96141)
Psyringae - *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (YP_234305)
Bpertussis - *Bordetella pertussis* Tohama I (NP_880888)
Yenterocolitica - *Yersinia enterocolitica* (NP_052401)
Bubonensis - *Burkholderia ubonensis* Bu (ZP_02382351)
Xanthomonas - *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (YP_198730)
Rsolanacearum - *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (NP_522431)
Senterica - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Agona* str. SL483 (ACH48861)
Pputida - *Pseudomonas putida* (AAR21344)
Ecoli - *Escherichia coli* O127:H6 str. E2348/69 (CAS09603)

5.2 OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE *H. rubrisubalbicans* M1

Os genes *hrpE* e *hrcN* foram mutagenizados para determinar a importância do SST3 no desenvolvimento de doenças em plantas. Esses genes são codificantes para as proteínas HrpE e HrcN, uma reguladora de ATPase que se liga a membrana interna pelo citoplasma, sendo a primeira e a última a própria ATPase.

5.2.1 Obtenção do mutante *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* M1

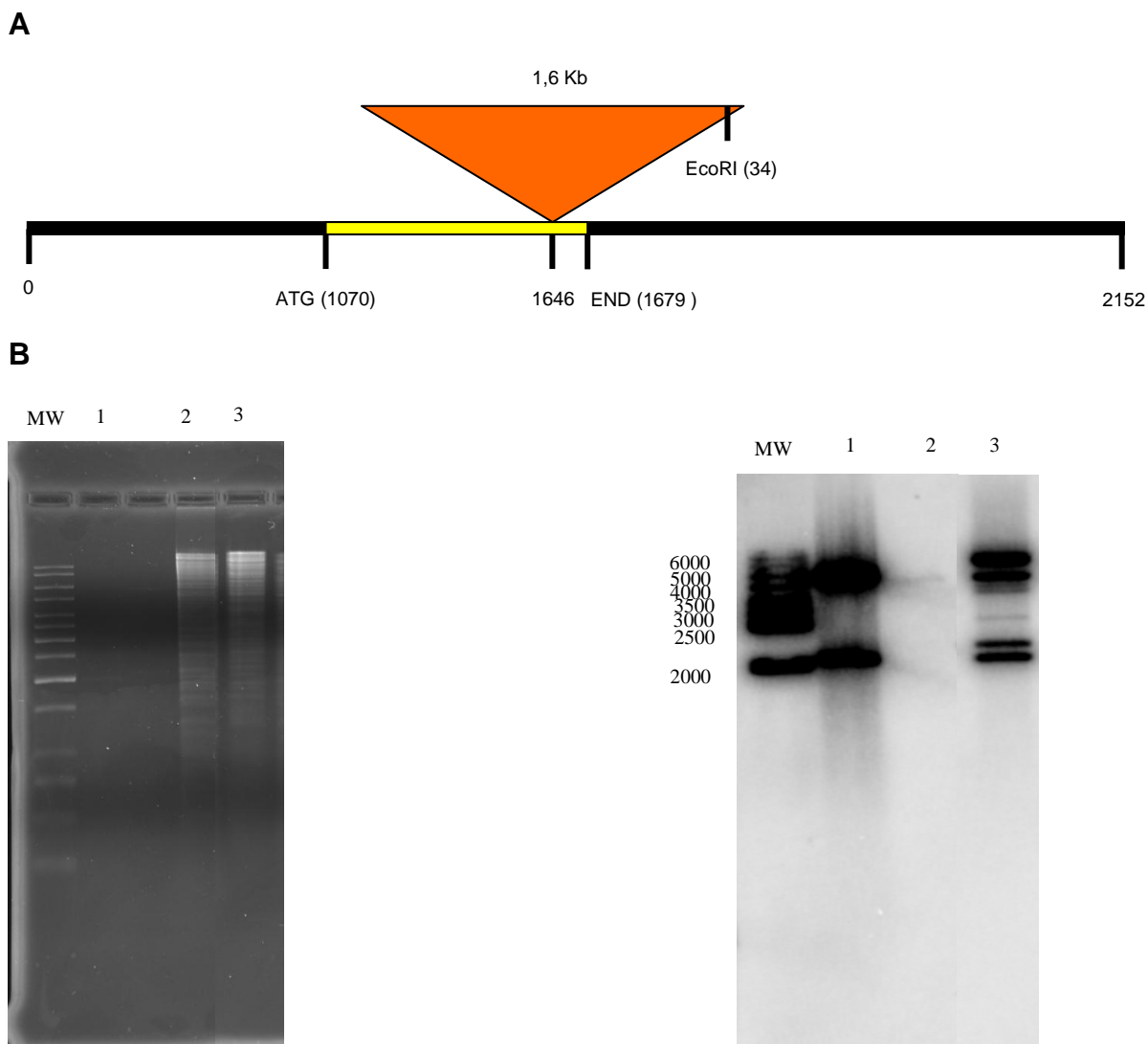
A estratégia utilizada para a obtenção da estirpe *hrpE* mutante foi a recombinação homóloga utilizando o plasmídeo HR02-MF-00-000-009.C05.TET.Km, que contém o gene *hrpE* interrompido pelo transposon EZ::Tn5TM <TET1>. Este plasmídeo foi introduzido na estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*.

Foram obtidas seis colônias resistentes a tetraciclina onde a integração do cassete no genoma da bactéria pode ter ocorrido por recombinação homóloga dupla ou simples. As colônias foram resistentes a Km, indicando que só haviam simples recombinantes. Um destes mutantes foi nomeado *H. rubrisubalbicans* TSE.

Para confirmar a inserção e localização do transposon na estirpe mutante TSE, o DNA cromossomal desta estirpe foi purificado, digerido com a enzima EcoRI e os fragmentos resultantes separados em eletroforese em gel de agarose. Em seguida o DNA foi transferido para uma membrana de náilon e hibridizado com o plasmídeo HR02-MF-00-000-057-H09.TET.Km digerido com a enzima EcoRI e marcado com ³²P. A FIGURA 20 mostra os perfis de hibridização das estirpes selvagem e mutante.

O DNA genômico da estirpe selvagem digerido com EcoRI apresentou um sinal de hibridização correspondente ao fragmento de 5Kb onde está localizado o gene *hrpE*. Já o DNA genômico da estirpe mutante TSE apresentou quatro sinais de hibridização, dois deles correspondem aos fragmentos da sonda, indicando que todo o plasmídeo se integrou ao genoma. A interpretação dos outros quatro fragmentos ficou comprometida, o que sabemos é que um deles corresponde ao gene com o transposon, provavelmente o fragmento maior que 6 Kb. A sequência do cluster e da região adjacente a este cluster no genoma é essencial para o entendimento desta hibridização.

FIGURA 20 – PERFIL DE HIBRIDIZAÇÃO DO GENE *hrpE* DE *H. rubrisubalbicans* ESTIRPES SELVAGEM M1 E MUTANTE TSE.



A – Esquema do perfil de restrição da região seqüenciada do gene *hrpE* de *H. rubrisubalbicans*. Em amarelo a o gene *hrpE*, em laranja o tranposon EZ::Tn5TM <TET1> e em preto o genoma. B - Hibridização do DNA cromossomal da estirpe selvagem M1 e do mutante *hrpE* TSE de *H. rubrisubalbicans*. Neste experimento foi utilizado como sonda o vetor HR02-MF-00-000-057.H09.TET.Km digerido com EcoRI. MW – marcador molecular. Linha 1 plasmídeo HR02-MF-00-000-057.H09.TET.Km digerido com *EcoRI*. Linhas 2 e 3 mostram o DNA cromossomal digeridos com *EcoRI* da estirpe selvagem M1 e o mutante TSE respectivamente.

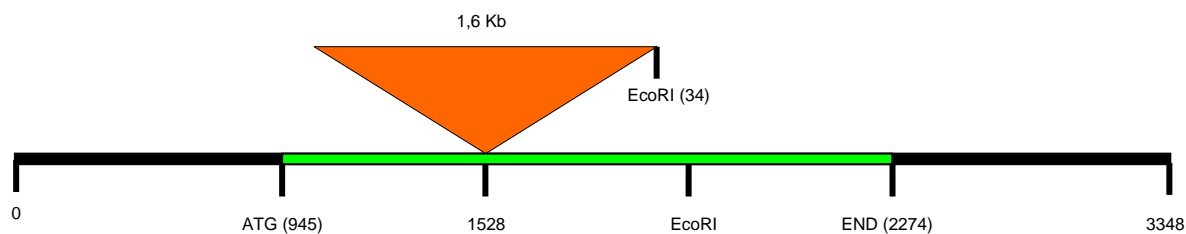
5.2.2 Obtenção do mutante *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* M1

O plasmídeo HR02-MF-00-000-053-F11.TET.Km contendo o gene *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* interrompido pelo transposon EZ::Tn5TM <TET1>, foi eletrotransformado na estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1, para a construção da estirpe mutante *hrcN*. Dez colônias resistentes a tetraciclina onde a integração do cassete no genoma da bactéria poderia ter ocorrido por recombinação homóloga dupla ou simples foram testadas em canamicina. Quatro foram resistentes a canamicina, indicando recombinação simples, e seis foram sensíveis a canamicina indicando recombinação dupla. Um dos mutantes duplos foi nomeado *H. rubrisubalbicans* TSN.

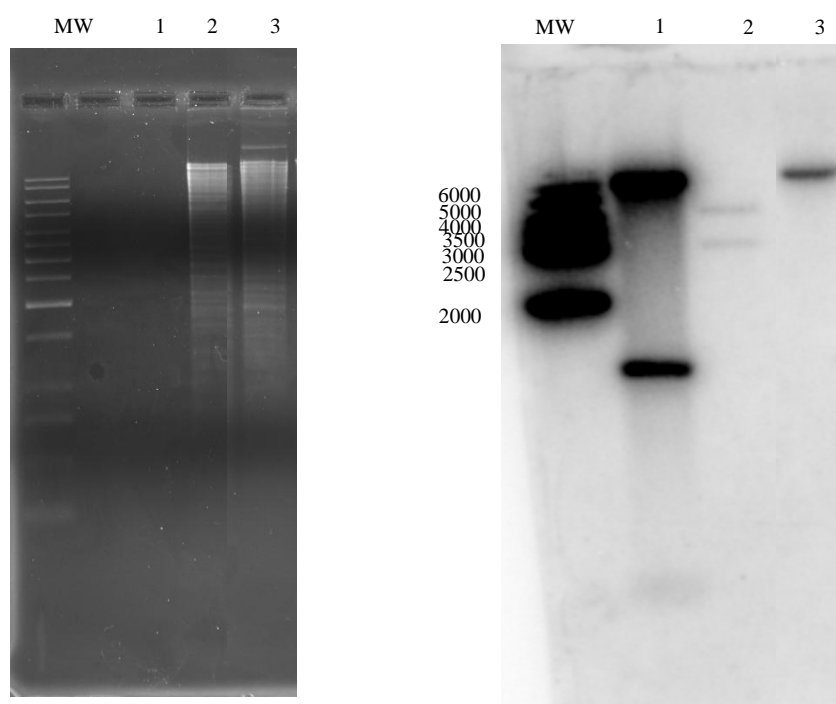
A confirmação da inserção e localização do transposon na estirpe mutante TSN foi feita por hibridização (FIGURA 21). O DNA cromossomal das estirpes mutante e selvagem foi isolado, digerido com a enzima EcoRI e os fragmentos resultantes separados em eletroforese em gel de agarose. Após a transferência para uma membrana de náilon os fragmentos de DNA foram hibridizados com o plasmídeo HR02-MF-00-000-053-F11.TET.Km digerido com a enzima EcoRI. O perfil de hibridização do DNA genômico da estirpe selvagem apresenta dois sinais de hibridização correspondente aos fragmentos de DNA contendo o gene *hrcN* (3,5 Kb e 5 Kb). O DNA genômico da estirpe mutante TSN apresentou um sinal de hibridização de 10 Kb correspondente ao fragmento contendo o gene *hrcN* e o transposon EZ::Tn5TM <TET1> (1,6 Kb).

FIGURA 21 - PERFIL DE HIBRIDIZAÇÃO DO GENE *hrcN* DE *H. rubrisubalbicans* ESTIRPES SELVAGEM M1 E MUTANTE TSN.

A



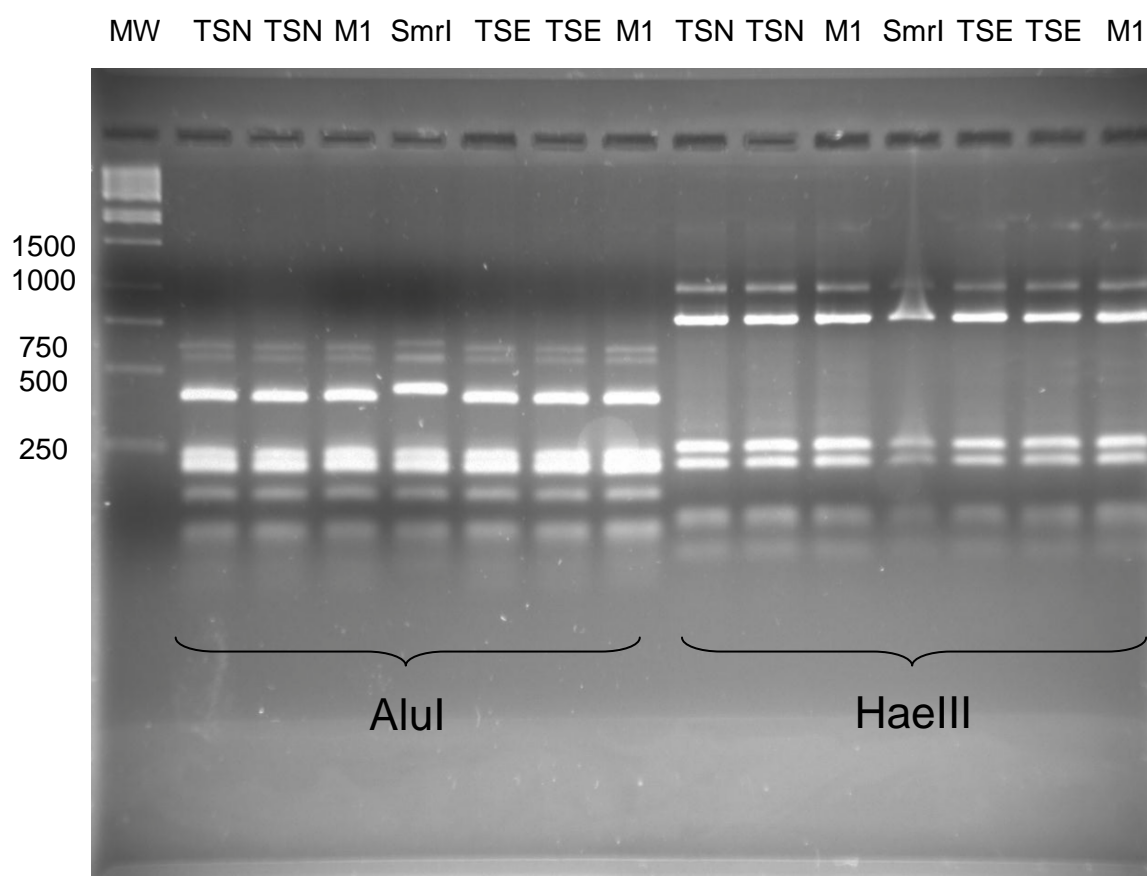
B



A – Esquema do perfil de restrição da região seqüenciada do gene *hrcN* de *H. rubrisubalbicans*. Em verde o gene *hrcN*, em laranja o transposon EZ::Tn5TM <TET1> e em preto a região adjacente do genoma. B - Hibridização do DNA cromossomal da estirpe selvagem M1 e o mutante *hrcN* TSN de *H. rubrisubalbicans*. Neste experimento foi utilizado o plasmídeo HR02-MF-00-000-053.F11.TET.Km digerido com EcoRI como sonda (linha 1). Linhas 2 e 3 mostram o DNA cromossomal digeridos com EcoRI da estirpe selvagem M1 o mutante TSN.

Os mutantes TSE e TSN foram analisados através de RFLP do gene 16sRNA e o padrão obtido (FIGURA 22) confirmam que as estirpes pertencem à espécie *H. rubrisubalbicans*. A partir do DNA genômico o 16sRNA foi seqüenciado com os primers Y1 e Y3. O produto de amplificação foi cortado com as enzimas AluI e HaeIII, mostrando um padrão de restrição específico para o *H. rubrisubalbicans* como mostra a FIGURA 22.

FIGURA 22 – PERFIL DE RESTRIÇÃO DO AMPLIFICADO DO 16sRNA DE DIFERENTES ESPÉCIES.



MW – Marcador de peso molecular. TSN – Restrição do fragmento correspondente ao 16sRNA do mutante no gene *hrcN* de *H. rubrisubalbicans*. M1 – Padrão de restrição do amplificado do 16sRNA do selvagem M1 de *H. rubrisubalbicans*. Smrl - Padrão do amplificado do 16sRNA cortado de *H. seropedicae* da estirpe Smrl. TSE - Restrição do fragmento correspondente ao 16sRNA do mutante no gene *hrpE* de *H. rubrisubalbicans*. Da segunda a oitava coluna amplificadores cortados com AluI. Da nona a décima quinta coluna amplificadores cortados com HaeIII.

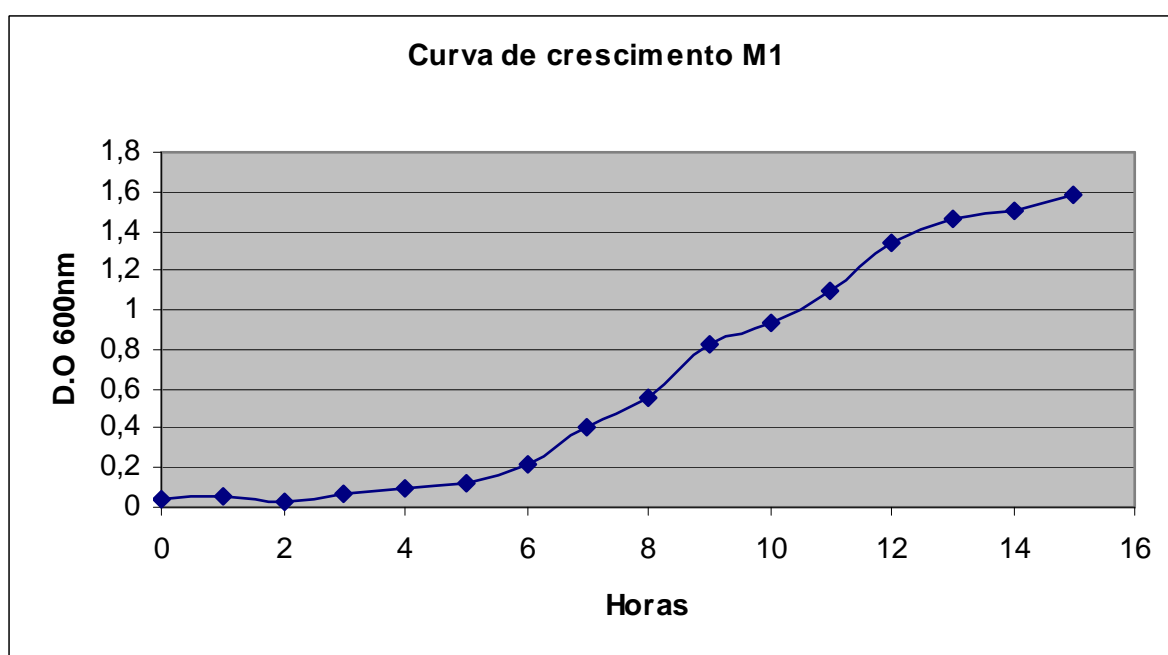
5.3 DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DOS MUTANTES TSE E TSN

5.3.1 Curva De Crescimento

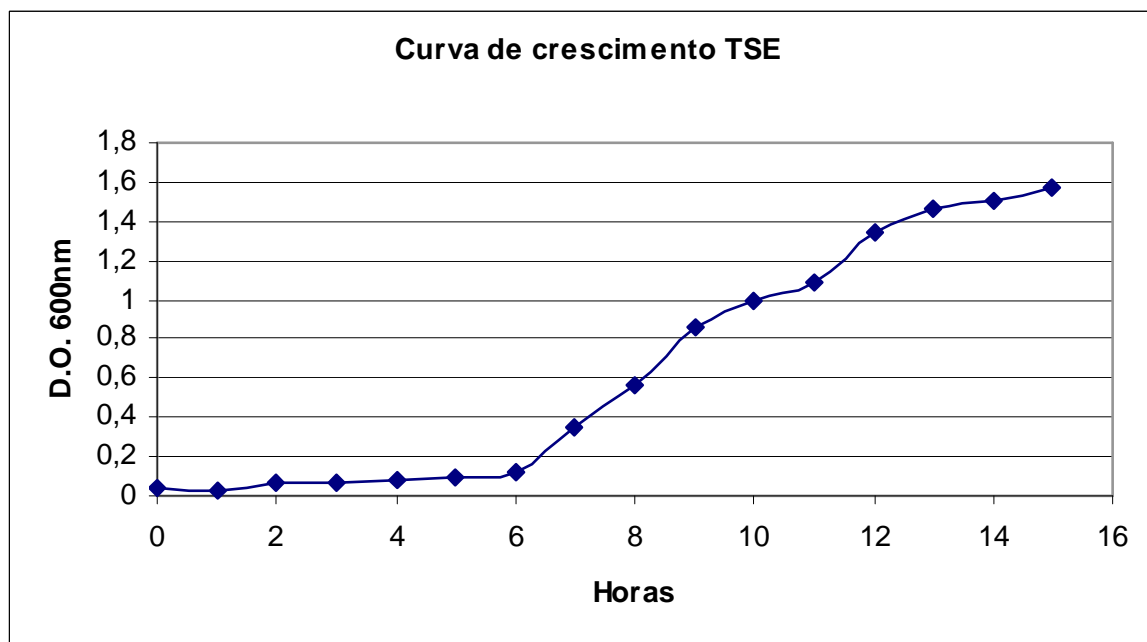
A curva de crescimento permite determinar qual é o tempo necessário para que o número de bactérias de uma determinada cultura duplique. Isso é calculado pelo tempo de geração de cada estirpe.

A estirpe selvagem M1 de *H. rubrisubalbicans*, e as mutantes TSE e TSN foram crescidas e a DO_{600} ajustada para 1. Quatro mililitros desta cultura foram adicionados em 200mL de meio novo. A DO_{600} foi medida em intervalos de uma hora durante o período de 15 horas (GRÁFICOS 1, 2 e 3). Os ensaios foram feitos em triplicata.

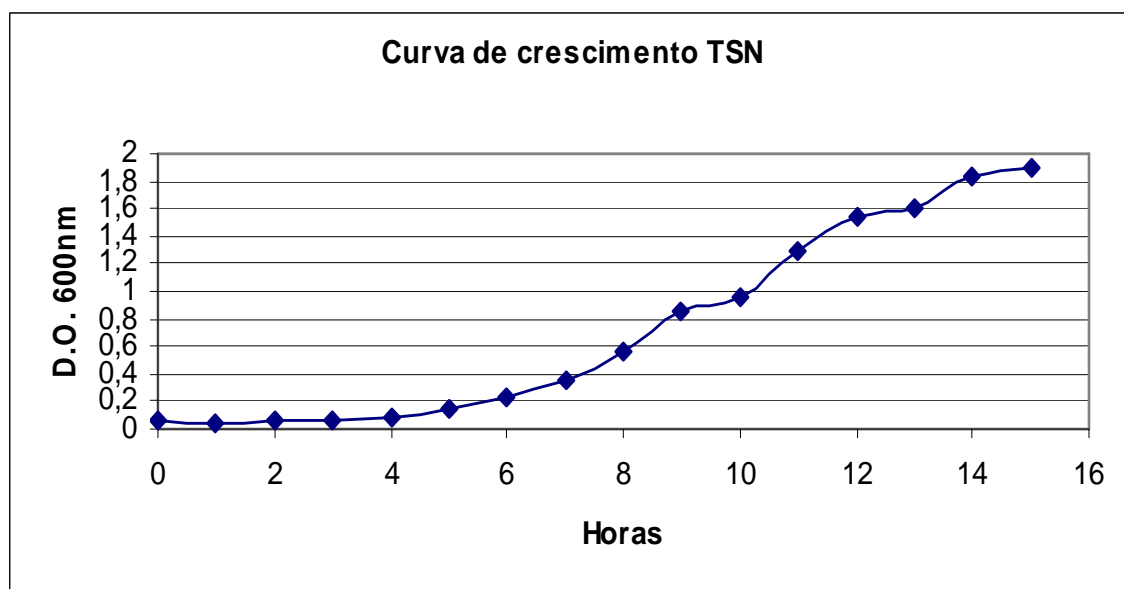
GRÁFICO 1 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE SELVAGEM M1



H. rubrisubalbicans M1 foi cultivado em meio NFbHPN e a DO_{600} da cultura foi determinada a de uma em uma hora.

GRAFICO 2 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE TSE

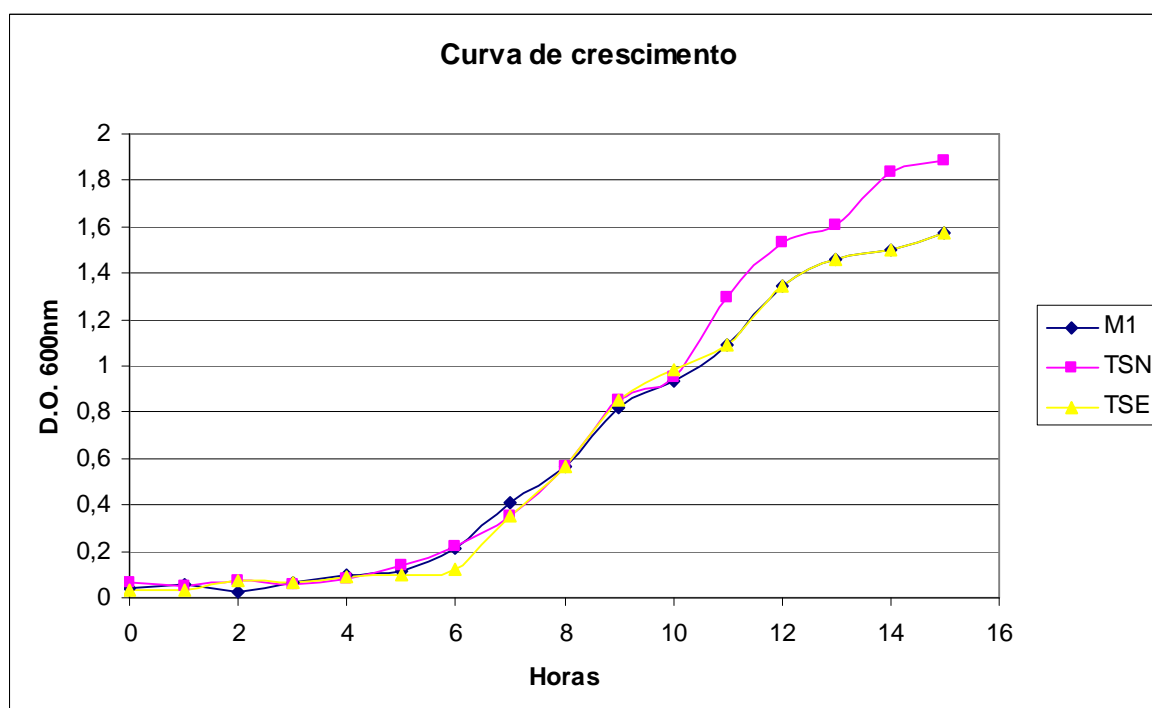
H. rubrisubalbicans TSE foi cultivado em meio NFbHPN e a DO_{600} da cultura foi determinada em intervalos de uma em uma hora.

GRAFICO 3 – CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE TSN

H. rubrisubalbicans TSN foi cultivado em meio NFbHPN e a DO_{600} da cultura foi determinada a cada hora.

A sobreposição destes gráficos (GRAFICO 4) e o tempo de geração (TABELA 9) de cada estirpe revela que não existe diferença no crescimento das estirpes mutantes nos genes *hrpE* e *hrcN* e a estirpe selvagem M1, indicando que a mutação destes genes envolvidos com o SST3 não altera a capacidade nem a velocidade de crescimento em *H. rubrisubalbicans*.

GRAFICO 4 – SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES M1, TSE E TSN DE *H. rubrisubalbicans*



Sobreposição das curvas de crescimento do selvagem M1 e seus mutantes TSE e TSN de *H. rubrisubalbicans*. Todas as amostras foram coletados de uma em uma hora e a DO_{600} medida. As culturas foram mantidas em agitador rotatório a 120rpm a 30°C.

TABELA 9 – Tempo e geração das estirpes M1, TSE e TSN de *H. rubrisubalbicans* em meio NFbHPN-Malato

Estirpe	Tempo de geração (h)
M1	1,6
TSE	1,6
TSN	1,5

Tempo de geração (g) calculado através da formula $g = \ln 2 / \mu$, onde μ é o coeficiente angular da faixa linear da curva $\log DO_{600}$ versus o tempo.

5.3.2 Inoculação das plantas de Vigna com mutantes TSE e TSN

As folhas de Vigna foram infiltradas com *H. rubrisubalbicans* das estirpes selvagem M1 e seus mutantes TSE e TSN, dez dias após a germinação.

O tratamento controle (infiltração de $MgSO_4$) mostra que a solução utilizada para ressuspender as bactérias não resulta em resposta hipersensitiva. Como se observa na FIGURA 23 aparece uma leve cicatriz, exatamente onde a infiltração foi feita, porém nenhum sinal apareceu na superfície da folha.

FIGURA 23 – FOLHAS DE VIGNA INFILTRADAS COM SOLUÇÃO DE $MgSO_4$ 10mM



Folhas de Vigna infiltrada com $MgSO_4$ 10mM vinte dias após germinação. Apenas no ponto de contato com a seringa formou-se uma leve cicatriz, devido ao choque mecânico. Fotos tiradas dez dias após infiltração.

Por outro lado plantas de Vigna inoculadas com a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 mostraram vários estágios de resposta hipersensitiva. Essa resposta se inicia no ponto de inoculação com a necrose das células. A bactéria continua invadindo os tecidos, formando uma ferida com diâmetro cada vez maior. O tecido foliar foi perdendo a pigmentação e a necrose expande-se até a morte da folha, quando ela cai. A FIGURA 24 mostra diferentes folhas inoculadas no mesmo

dia e fotografadas 10 dias após a infiltração, resultando em diferentes níveis de resposta. Desde a necrose localizada na região da infiltração até a invasão quase total da folha, fortes indícios de estarem causando doença. Pequenos sinais de sintomas já começaram a aparecer 48 horas após a infiltração. Sete dias depois sinais localizados de necrose na folha foram evidentes, dez dias depois já observam-se folhas totalmente doentes.

FIGURA 24 – FOLHAS DE *Vigna* INFILTRADAS COM A ESTIRPE SELVAGEM M1 DE *H. rubrisubalbicans*



Folhas de *Vigna* infiltradas com a estirpe selvagem M1 (10^8 células) de *H. rubrisubalbicans*. O efeito da inoculação de *H. rubrisubalbicans* M1 na planta com o mesmo tempo de infiltração (flechas). Nos pontos de inoculação há formação doença. Nas folhas indicadas com setas vermelhas, observa-se o espalhamento da bactéria e aparecimento de sintomas de doença e sinais de necrose, podendo ser interpretada como entupimento dos vasos pela bactéria. Esta resposta foi observada dez dias após a infiltração da bactéria na planta.

Plantas inoculadas com *H. rubrisubalbicans* TSE, mutante no gene *hrpE* não apresentaram fenótipo de doença nem de resposta hipersensitiva (FIGURA 25). Isso sugere que a mutação no gene *hrpE* torna a estirpe TSE incapaz de causar resposta hipersensitiva ou doença e portanto *hrpE* é essencial para a atividade do SST3

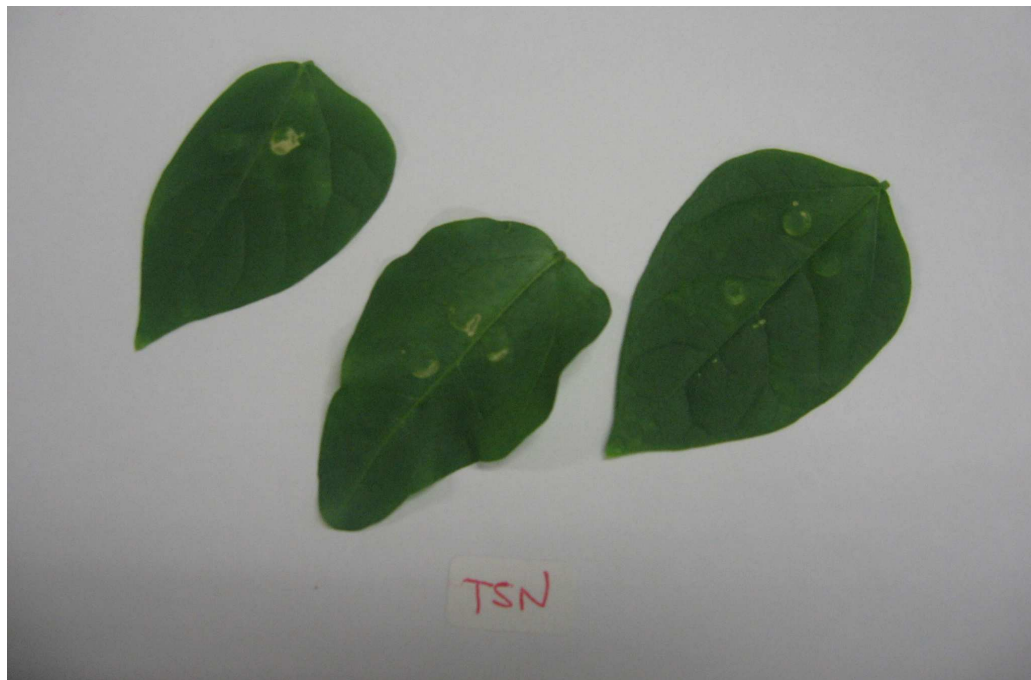
FIGURA 25 - FOLHAS de Vigna INOCULADAS COM MUTANTE TSE DE *H. rubrisubalbicans*.



Folhas de Vigna inoculadas com 10^8 bactérias *H. rubrisubalbicans* TSE. Fotos tiradas 10 dias após inoculação.

Mutantes no gene *hrcN*, assim como no *hrpE* não mostram sinais de doença. Sendo a proteína HrcN responsável pelo fornecimento de energia para a maquinaria do SST3, a ausência desta ATPase faz com que o sistema não funcione, e consequentemente, as proteínas efetoras não atravessam a membrana interna da bactéria, se acumulando no citoplasma e não causando uma resposta de defesa por parte da planta como mostra a FIGURA 26.

FIGURA 26 – FOLHAS DE *Vigna* INOCULADAS COM O MUTANTE TSN DE *H. rubrisubalbicans*



Folhas de *Vigna* infiltradas com mutante TSN de *H. rubrisubalbicans* (10^8 células).

O efeito da mutação no gene *hrpE* pode ser devido diretamente a perda da função deste gene ou pode ser devido a efeito polar, ou seja, genes a jusante de *hrpE* podem ter sido afetados. Por exemplo, o gene *hrcC*, formadora do poro da membrana externa localizado a jusante de *hrpE* e sem o poro externo e a agulha as proteínas efetoras permaneceriam no citoplasma ou periplasma da bactéria, assim a planta não responde a presença da bactéria.

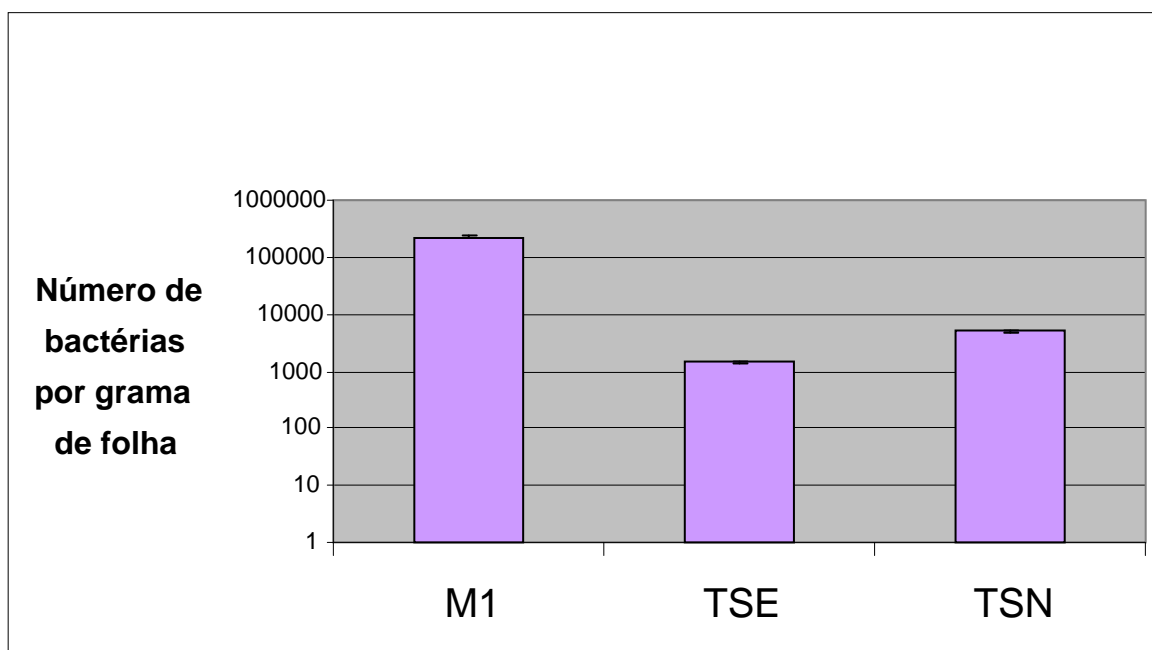
Este fenótipo já foi mostrado para *P. syringae*, onde a estirpe mutante no gene *hrpE* deixou de causar resposta hipersensitiva nas plantas de *Nicotina tabacum* (RAMOS et al, 2007).

5.3.3 Colonização interna das folhas de Vigna

As folhas de *Vigna* utilizadas como controle e aquelas inoculadas com as estirpes selvagem M1 e os mutantes TSE e TSN foram desinfetadas superficialmente, maceradas e diferentes diluições foram plaqueadas em meio NFbHP-Malato sólido. Após 24 horas as colônias foram contadas.

O GRAFICO 5 mostra que foram recuperadas 10^5 bactérias da estirpe selvagem M1 por grama de folha. Em contraste o número de bactérias das estirpes mutantes TSE e TSN foi cerca de 100 vezes menor que o selvagem M1. Estes resultados indicam que os genes *hrpE* e *hrcN* podem estar envolvidos no processo de colonização da bactéria na planta.

GRAFICO 5 – RECUPERAÇÃO DE BACTÉRIAS DOS TECIDOS INTERNOS DE FOLHA DE *Vigna* INOCULADA COM AS ESTIRPES M1, TSE E TSN DE *H. rubrisubalbicans*



Colonização interna de folhas de *Vigna* inoculadas com *H. rubrisubalbicans* M1, TSE e TSN. Plantas de *Vigna* foram infiltradas com as estirpes, dez dias depois foram desinfetadas superficialmente, maceradas, o macerado foi diluído e plaqueado. As placas foram mantidas a 30°C por 24 horas e as colônias contadas. Experimento feito em triplicatas de amostras.

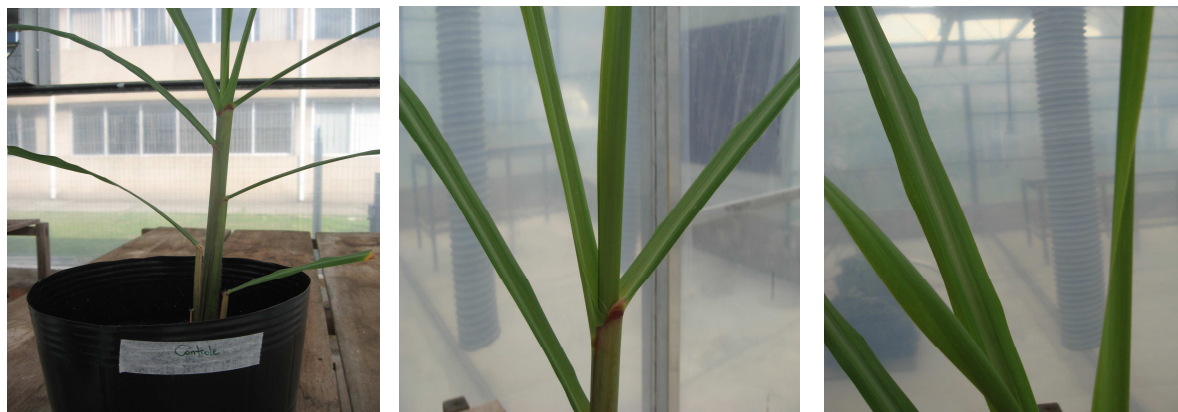
5.3.4 Inoculação das plantas de cana-de-açúcar da variedade B-4362 com TSE

As plantas de cana-de-açúcar, 125 dias após a germinação, foram inoculadas com a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante TSE. As plantas inoculadas com M1 começaram a desenvolver manchas brancas 10 dias após a inoculação, logo em seguida as estrias vermelhas foram aparecendo e com 15 dias foram observados sintomas de doença da estria mosqueada bem desenvolvida e sinais de necrose nas folhas invadidas pela bactéria (FIGURA 27).

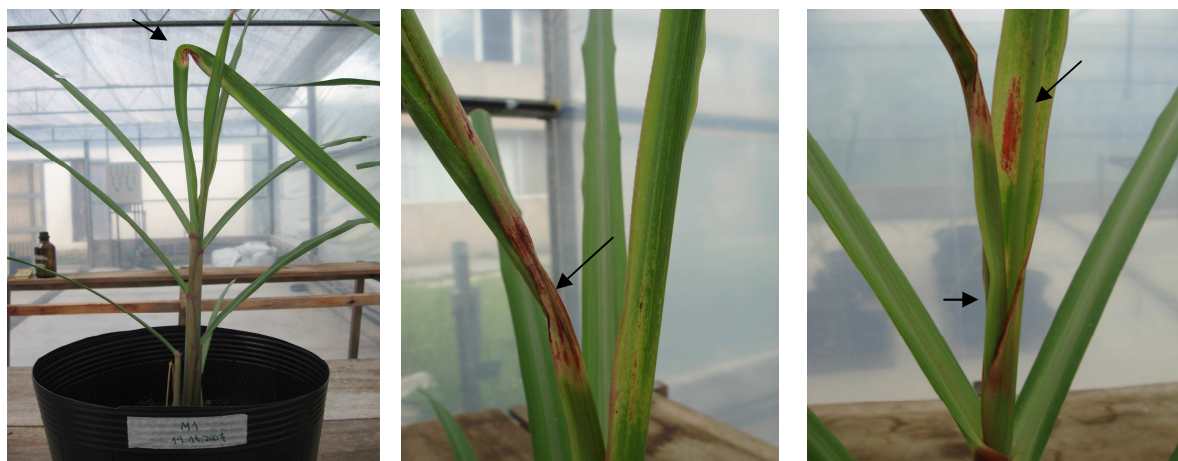
Em contraste, plantas inoculadas com o mutante TSE não apresentaram os sintomas observados nas plantas inoculadas com M1. Essas plantas apresentaram desenvolvimento comparável às plantas não inoculadas com bactérias. Estes resultados indicam que o produto do gene *hrpE* ou o produto de algum gene que está no mesmo operon pode estar envolvido com perda da capacidade de produzir a doença estria mosqueada na cana-de-açúcar da variedade B-4362.

FIGURA 27 – INOCULAÇÃO DO CULTIVAR B-4362 DE CANA-DE-AÇÚCAR COM DIFERENTES ESTIRPES DE *H. rubrisubalbicans*

A



B



C



A. Plantas de cana-de-açúcar da variedade B-4362 não inoculadas. As figuras mostram três plantas controle de cana-de-açúcar da variedade B-4362 inoculadas com meio sem bactérias. Os colmos foram germinados em terra autoclavada e regados com meio nutritivo para plantas. As fotos foram tiradas cinco meses após a germinação. **B. Canas-de-açúcar da variedade B-4362 inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe M1.** A figura mostra

três plantas de Cana-de-açúcar da variedade B-4362 inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe M1 (10^8 células). Os colmos foram germinados em terra autoclavada, quatro meses depois inoculados com *H. rubrisubalbicans* M1. Quinze dias depois da inoculação as fotos foram tiradas. As flechas indicam pontos de colonização da bactéria aonde se desenvolveu a doença da estria mosqueada. **C. Canas-de-açúcar da variedade B-4362 inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe mutante TSE.** Três diferentes plantas de cana-de-açúcar da variedade B-4362 germinadas em terra autoclavada e inoculadas com *H. rubrisubalbicans* TSE (10^8 células) quatro meses após germinação. As fotos foram tiradas quinze após a inoculação da bactéria. Os sintomas da doença da estria mosqueada não apareceram.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho mostram que o SST3 é importante para a patogenicidade do *H. rubrisubalbicans* M1, sendo os genes *hrpE* e *hrcN* componentes essenciais deste sistema.

6. CONCLUSÕES

- Em *H. rubrisubalbicans* foram sequenciados e identificados os genes *pilN*, *pilO*, *hrcC*, *hrpE*, *hrcJ*, *hrcU*, *hrpX*, *hrpQ*, *hrcN*, *hrcV*, *hrpR*, e *hrpD*. Além disso, sete genes, que codificam para proteínas hipotéticas conservadas, foram também sequenciadas e identificadas.
- As estirpes mutantes dos genes *hrpE* e *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* possuem taxa de duplicação semelhante a da estirpe selvagem M1.
- As estirpes mutantes nos genes *hrpE* e *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* não provocam sintomas de doença diferente do que ocorre com a estirpe selvagem M1 em folhas de *Vigna*.
- Os produtos dos genes *hrpE* e *hrcN* podem estar envolvidos no processo de proliferação nas folhas de *Vigna*, já que estirpes mutantes nesses genes se apresentam em menor número quando comparados com a estirpe selvagem.
- O mutante no gene *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* não é capaz de causar sintomas da doença da estria mosqueada em cana-de-açúcar B-4362, sugerindo que a proteína HrpE, ou o efeito polar da mutagênese tem participação no processo de patogenicidade.
- O SST3 em *H. rubrisubalbicans* é funcional e está relacionado com a capacidade deste organismo produzir doença em folhas de *Vigna* e da doença da estria mosqueada em cana-de-açúcar da variedade B-4362.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKEDA Y, GALÁN JE.** Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*. 437(7060):911-5; 2005.
- ALDON D., BRITO B., BOUCHER C., GENIN S.** A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J*. V. 19(10) P.2304-14, 2000.
- ALEGRIA MC, DOCENA C, KHATER L, RAMOS CH, DA SILVA AC, FARAH CS.** 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. *J Bacteriol*.186(18):6186-97; 2004.
- ALFANO JR, COLLMER A.** The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol*. 179(18):5655-62; 1997.
- ALLAOUI A, WOESTYN S, SLUITERS C, CORNELIS GR.** YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J Bacteriol*.176(15):4534-42; 1994.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. V 215(3). P 403-10. 1990.
- BALDANI B., POT G., KIRCHHOF E., FALSEN V. L. D., BALDANI F. L., OLIVARES, B. HOSTE, K. KERSTERS, A. HARTMANN, M. GILLIS, J. DÖBEREINER.** Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. *Int J Syst Bacteriol*, v. 46, p.802-810, 1996.

- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J.** Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J.** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.
- BALSANELLI E.** Análise genômica comparativa do sistema de secreção do tipo III de endófitos do gênero *Herbaspirillum*. **Monografia**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, 2008.
- BRITO B, ALDON D, BARBERIS P, BOUCHER C, GENIN S.** A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes. **Mol Plant Microbe Interact.**15(2):109-19; 2002.
- BROUGHTON W.J., DILWORTH M.J.** Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochem J.** ;125(4):1075-80. 1971
- DE BUCK E, LAMMERTYN E, ANNÉ J.** The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. **Trends Microbiol.**; 16(9):442-53, 2008
- BÜTTNER D.; BONAS U.** Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO J.** vol.15, n. 21:5313-22, 2002.
- CASCALES E., CHRISTIE P.J.** The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nat Rev Microbiol.** 1(2):137-49. 2003
- CHRISTOPHER, W.N.; EDGERTON, C.W.** Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **J. Agricult. Res.** v. 41, p. 259, 1992.

- CIANCIOTTO NP.** Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends Microbiol.**;13(12):581-8. Epub 2005.
- CLINE K, MCCAFFERY M.** Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. **EMBO J.** ;26(13):3039-49. 2007
- CORDES FS, KOMORIYA K, LARQUET E, YANG S, EGELMAN EH, BLOCKER A, LEA SM.** Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. **J Biol Chem.**;278(19):17103-7, 2003
- CORNELIS G. R.; van GIJSEGEM F.** Assembly and function of type III secretory systems. **Annu. Rev. Microbiol.**; 54:735-74, 2000.
- CORNELIS, G. R.** The type III secretion injectisome, **Nature**, vol. 2, p. 811-825, 2006.
- CRUZ, L.M., SOUZA, E.M., WEBER, O.B., BALDANI,J.I., DÖBEREINER,J. ; PEDROSA, F.O.** 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **App. Envir. Microbiol.** v. 67, p. 2375-2379, 2001.
- CUNNAC S., BOUCHER C., GENIN S.** Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. **J Bacteriol.** 186(8):2309-18. 2004.
- DEANE JE, ROVERSI P, CORDES FS, JOHNSON S, KENJALE R, DANIELL S, BOOY F, PICKING WD, PICKING WL, BLOCKER AJ, LEA SM.** Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing.**Proc Natl Acad Sci** 103(33):12529-33; 2006.
- DEDECEK A. S.,** Análise da ilha genômica hrp/hrc de *Herbaspirillum seropedicae* e caracterização parcial dos genes hrcC, hrcV e hrpG. **Tese de Doutorado**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR. 2006.

- DEHIO C.** Infection-associated type IV secretion systems of Bartonella and their diverse roles in host cell interaction. **Cell Microbiol.** 10(8):1591-8. 2008.
- DENG WL, HUANG HC.** Cellular locations of Pseudomonas syringae pv. syringae HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. **J Bacteriol.** 181(7):2298-301; 1999.
- DEREWENDA U, MATEJA A, DEVEDJIEV Y, ROUTZAHN KM, EVDOKIMOV AG, DEREWENDA ZS, WAUGH DS.** The structure of Yersinia pestis V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. **Structure.** (2):301-6. 2004.
- DING L, YOKOTA A.** Proposals of Curvibacter gracilis gen. nov., sp. nov. and Herbaspirillum putei sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [Pseudomonas] huttiensis, [Pseudomonas] lanceolata, [Aquaspirillum] delicatum and [Aquaspirillum] autotrophicum as Herbaspirillum huttiense comb. nov., Curvibacter lanceolatus comb. nov., Curvibacter delicatus comb. nov. and Herbaspirillum autotrophicum comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 54, n. 6, p. 2223-30. 2004.
- ESER M., EHRMANN M.** SecA-dependent quality control of intracellular protein localization. **Proc Natl Acad Sci USA.** V 100(23):p13231-4, 2003.
- EWING B., HILLIER L., WENDL M.C., GREEN P.** Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. **Accuracy assessment. Genome Res.** v. 8, n. 3, p.175-85, 1998.
- EWING B., GREEN P.** Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.** v. 8, p.186-94, 1998.
- FILLOUX A.** The underlying mechanisms of type II protein secretion. **Biochim Biophys Acta.** V 1694(1-3):163-79, 2004.

- FILLOUX A, HACHANI A, BLEVES S.** The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology.** 154(Pt 6):1570-83, 2008.
- FRASER GM, GONZÁLEZ-PEDRAJO B, TAME JR, MACNAB RM.** Interactions of FliJ with the Salmonella type III flagellar export apparatus. **J Bacteriol.**185(18):5546-54; 2003.
- FREDERICK R.D., AHMAD M., MAJERCZAK D.R., ARROYO-RODRÍGUEZ A.S., MANULIS S., COPLIN D.L.** Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* hrp gene cluster and sequence analysis of the hrpA, hrpC, hrpN, and wtsE operons. **Mol Plant Microbe Interact.** V 14(10):1213-22, 2001.
- GALÁN J. E.; COLLMER A.** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science.** V 284, p. 1322-1328, 1999.
- GAZI AD, BASTAKI M, CHAROVA SN, GKOUKOUKULIA EA, KAPELLIOS EA, PANOPOULOS NJ, KOKKINIDIS M.** Evidence for a Coiled-coil Interaction Mode of Disordered Proteins from Bacterial Type III Secretion Systems. **J Biol Chem.** 283(49):34062-8; 2008.
- 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*. **Mol Microbiol.** V 6(20):3065-76, 1992.
- GERLACH R. G., HENSEL M.** Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology.** V 297, p. 401-415, 2007.
- GHOSH, P.** Process of Protein Transport by the Type III Secretion System **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, vol.68, p. 771–795, 2004.

- GOODMAN R.N.; NOVACKY A.** The hypersensitive defense reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. **American Phytopathological Society Press.** p. 7–8, 1994.
- GORDON D., ABAJIAN C., GREEN P.** Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.** v. 8, p.195-202, 1998.
- GREENBERG JT, VINATZER BA.** Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. **Curr Opin Microbiol.** Feb;6(1):20-8; 2003.
- HENDERSON IR, NAVARRO-GARCIA F, DESVAUX M, FERNANDEZ RC, ALA'ALDEEN D** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story **Microbiol Mol Biol Rev.**;68(4):692-744. 2004
- HOICZYK E, ROGGENKAMP A, REICHENBECHER M, LUPAS A, HEESEMANN J.** Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. **EMBO J.** ;19(22):5989-99, 2000
- HUECK C. J.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v 62, p. 379-433, 1998.
- IM, W.T.; YOKOTA, A.; KIM, M.K.; LEE, S.T.** *Kaistia adipata* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium. **J Gen Appl Microbiol.**, v. 50, p. 249-254, 2004.
- JACOB-DUBUISSON F., FERNANDEZ R., COUTTE L.** Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. **Biochim Biophys Acta.** V 1694(1-3):235-57, 2004.
- JAMES E.K., OLIVARES F.L., BALDANI J.I., DOBEREINER, J.** *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, vol. 48, n 308, p. 785-797, 1997.

- JAMES, E. K.; OLIVARES, F.L.** Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.** v.17, p.77-119, 1998.
- JOHNSON S, BLOCKER A.** Characterization of soluble complexes of the *Shigella flexneri* type III secretion system ATPase. **FEMS Microbiol Lett.** 286(2):274-8; 2008.
- JOHNSON S, ROVERSI P, ESPINA M, OLIVE A, DEANE JE, BIRKET S, FIELD T, PICKING WD, BLOCKER AJ, GALYOV EE, PICKING WL, LEA SM.** Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. : **J Biol Chem.**;282(6):4035-44, 2007
- JUNG, S. Y., LEE, M. H., OH, T. K., & YOON, J. H.** *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 57, p. 2284-2288, 2007
- KIRCHHOF, G., ECKERT, B., STOFFELS, M., BALDANI, J. I., REIS, V. M., HARTMANN, A.** *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 157-168, 2001.
- KLASSEN G.; PEDROSA F.O.; SOUZA E.M.; FUNAYAMA S.; RIGO L.U.** Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 887-891, 1997.
- KUBORI T., SUKHAN A., AIZAWA S.I., GALÁN J.E.** Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v 97(18):10225-30, 2000.

LANE MC, O'TOOLE PW, MOORE SA. Molecular basis of the interaction between the flagellar export proteins FliI and FliH from *Helicobacter pylori*. **J Biol Chem.** 281(1):508-17; 2006.

LI C. M.; BROWN I.; MANSFIELD J.; STEVENS C.; BOUREAU T.; OMANTSCHUK M.; TAIRA S. The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. **EMBO J.** v. 21, p. 1909-1915, 2002.

MORAES TF, SPRETER T, STRYNADKA NC. Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. **Curr Opin Struct Biol.**;18(2):258-66. 2008.

MUDGETT M. B.; STASKAWICZ B. J. Protein signaling via type III secretion pathways in phytopathogenic bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.** vol. 1, p. 109-114, 1998.

MUELLER CA, BROZ P, CORNELIS GR. The type III secretion system tip complex and translocon. : **Mol Microbiol.**;68(5):1085-95. 2008.

MÜLLER SA, POZIDIS C, STONE R, MEESTERS C, CHAMI M, ENGEL A, ECONOMOU A, STAHLBERG H. Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. **Mol Microbiol.** 61(1):119-25; 2006.

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

PALLEN MJ, BAILEY CM, BEATSON SA. Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases. **Protein Sci.** (4):935-41; 2006.

PALMER T, SARGENT F, BERKS BC. Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. **Trends Microbiol.**;13(4):175-80. 2005.

- PAPANIKOU E., KARAMANOU S., ECONOMOU A.** Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. **Nat Rev Microbiol.** 5(11):839-51. 2007.
- 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. **J Biol Chem.** 278(28):25816-24, 2003.
- PUKATZKI S, MA AT, STURTEVANT D, KRASTINS B, SARRACINO D, NELSON WC, HEIDELBERG JF, MEKALANOS JJ** Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 31;103(5):1528-33. 2006.
- RAHME, L. G.; MINDRINOS, M. N.; PANOPOULOS, N. J.** Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 3499-3507, 1992.
- RAMOS AR, MORELLO JE, RAVINDRAN S, DENG WL, HUANG HC, COLLMER A.** Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. **J Bacteriol.** 189(15):5773-8; 2007.
- ROINE E, NUNN DN, PAULIN L, ROMANTSCHUK M.** Characterization of genes required for pilus expression in *Pseudomonas syringae* pathovar phaseolicola. **J Bacteriol.** 178(2):410-7; 1996.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A.** Characterization of *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov. isolated from surface sterilised wheat roots. **Int J Syst Evol Microbiol,** v. 56, p. 1341-1348, 2006.

- SAIER MH JR.** Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. **J Membr Biol.**214(2):75-90. 2007.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.** Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SARGENT F.** The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. **Biochem Soc Trans.**;35(Pt 5):835-47, 2007.
- SKORPIL P, SAAD MM, BOUKLI NM, KOBAYASHI H, ARES-ORPEL F, BROUGHTON WJ, DEAKIN WJ.** NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. **Mol Microbiol.**;57(5):1304-17. 2005
- SILVA V. C. H.,** Expressão e purificação de proteínas do sistema de secreção do tipo III de *Herbaspirillum seropedicae*. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR. 2008.
- SOUZA, E.M.** Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae* . p.264. Tese (Doutorado Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.
- STONE CB, JOHNSON DL, BULIR DC, GILCHRIST JD, MAHONY JB.** Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of *Chlamydomonas reinhardtii*. **J Bacteriol.** 190(20):6580-8; 2008.
- THANASSI D. G.; HULTGREN S. J.** Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 420-30, 2000.

- VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; GUTIERREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J.M.** *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.
- VAN GIJSEGEM F, VASSE J, DE RYCKE R, CASTELLO P, BOUCHER C.** Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. **Mol Microbiol.** 44(4):935-46; 2002.
- WANG Y, OUELLETTE AN, EGAN CW, RATHINAVELAN T, IM W, DE GUZMAN RN** Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL, and MxiH. **J Mol Biol.** 31;371(5):1304-14. 2007
- WOESTYN S, ALLAQUI A, WATTIAU P, CORNELIS GR.** YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. **J Bacteriol.** 176(6):1561-9; 1994.
- XIAO Y.; LU Y.; HEU S.; HUTCHESON S. W.** Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster. **J. Bacteriol.** vol.174, n. 6, p. 1734-1741, 1992.
- YE J., MCGINNIS S., MADDEN T.L.** BLAST: improvements for better sequence analysis. **Nucleic Acids Res.** 34(Web Server issue):W6-9. 2006
- YIP C.K., STRYNADKA N.C.** New structural insights into the bacterial type III secretion system. **Trends Biochem Sci.** p. 223-30, 2006
- YIP C.K., KIMBROUGH T.G., FELISE H.B., VUCKOVIC M., THOMAS N.A., PFUETZNER R.A., FREY E.A., FINLAY B.B., MILLER S.I., STRYNADKA N.C.** Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. **Nature.** 435(7042):702-7. 2005

YIP C. K., STRYNADKA N.C.J. New structural insights into the bacterial type III secretion system. **TRENDS in Biochemical Science**, v. 31, p. 223-230, 2006.