

EDUARDO BALSANELLI

Caracterização funcional dos produtos dos genes *rfbB* e *rfbC* na síntese de LPS de *Herbaspirillum seropedicae* e sua interação com milho (*Zea mays*)

Dissertação de mestrado apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Dra. Rose Adele Monteiro
Co-Orientadores: Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Wanderson Duarte da Rocha

CURITIBA

2010

“Nenhum homem realmente produtivo
pensa como se estivesse escrevendo uma dissertação.”

Albert Einstein

"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original."

Albert Einstein

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, de modo direto ou indireto, possibilitaram a construção de um projeto de pesquisador.

Agradeço profundamente aos meus orientadores, Rose Adele Monteiro e Emanuel Maltempo de Souza, pela formação intelectual e profissional.

À todos os professores e coordenadores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, pela manutenção e melhoria da ótima qualidade de pesquisa desenvolvida no grupo.

Aos colegas de laboratório, pela mão-de-obra que gera esta ótima qualidade, e pelo constante auxílio científico e pessoal.

Aos técnicos, pelo empenho em todas as pesquisas de todos os integrantes do grupo.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	02
1.2. INTERAÇÃO PLANTA – BACTÉRIA	04
1.3. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	08
1.4. LIPOPOLISSACARÍDEOS	10
1.4.1. Biossíntese de Lipopolissacarídeos	16
2. OBJETIVOS	21
3. METODOLOGIA	22
3.1. BACTÉRIAS	22
3.2. PLASMÍDEOS	22
3.3. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO	23
3.3.1. Antibióticos	24
3.3.2. Manutenção das estirpes bacterianas	25
3.4. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA	25
3.4.1. Purificação de DNA genômico de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	25
3.4.2. Purificação de DNA plasmidial	26
3.4.3. Extração de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão	27
3.4.4. Eletroforese de DNA	28
3.4.5. Clivagem de DNA por enzimas de restrição	28
3.4.6. Ligação de fragmentos de DNA aos vetores	29
3.4.7. Reação de transposição <i>in vitro</i>	29
3.4.8. Amplificação de DNA	30
3.4.9. Sequenciamento de DNA	30
3.5. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	31

3.5.1. Preparo de células eletrocompetentes	31
3.5.2. Transformação bacteriana	32
3.6. HIBRIDIZAÇÃO DE DNA	33
3.6.1. Transferência do DNA genômico do gel de agarose para a membrana de náilon	33
3.6.2. Marcação das sondas	33
3.6.3. Hibridização	34
3.6.4. Revelação	35
3.7. ESTUDO <i>in silico</i> DOS GENES <i>rfb</i> DE <i>H. seropedicae</i>	35
3.8. OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i>	36
3.9. PREPARAÇÃO DO LPS DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> PARA ANÁLISE POR SDS-PAGE	37
3.10. ENSAIOS <i>in planta</i>	38
3.10.1. Desinfecção da superfície das sementes de milho	38
3.10.2. Condições de cultivo das plantas e inoculação com as estirpes de <i>H. seropedicae</i>	38
3.10.3. Ensaio de adesão das estirpes de <i>H. seropedicae</i> às raízes de milho ...	39
3.10.4. Ensaio de colonização interna das raízes de milho pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i>	40
3.10.5. Ensaio de competição pela colonização de milho entre as estirpes de <i>H. seropedicae</i>	41
3.10.6. Ensaio de competição química pela adesão à superfície radicular de milho	41
3.11. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO	42
3.12. ENSAIOS DE RESISTÊNCIA A ESTRESSE QUÍMICO	43
3.13. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS PLEIOTRÓPICOS DAS MUTAÇÕES NOS GENES <i>rfb</i> EM <i>H. seropedicae</i>	43
3.13.1. Avaliação do crescimento das estirpes selvagem e mutantes RAMEB-B e RAMEB-C de <i>H. seropedicae</i>	44
3.13.2. Avaliação da motilidade das estirpes selvagem e mutantes RAMEB-B e RAMEB-C de <i>H. seropedicae</i>	44
3.13.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos das estirpes selvagem e mutantes RAMEB-B e RAMEB-C de <i>H. seropedicae</i>	45

3.14. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>rfbB</i> DE <i>H. seropedicae</i>	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. ANÁLISES <i>in silico</i> DA VIA DE BIOSÍNTESE DE RAMNOSE EM <i>H. seropedicae</i>	48
4.2. OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES <i>H. seropedicae</i> RAMEB-B E RAMEB-C	51
4.3. CARACTERIZAÇÃO DO LPS DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i>	55
4.4. FENÓTIPO DA COLONIZAÇÃO DE MILHO POR <i>H. seropedicae</i> RAMEB-B, RAMEB-C e SmR1	58
4.4.1. Adesão e colonização de raízes de milho pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i>	58
4.4.2. Competição pela colonização de raízes de milho entre as estirpes de <i>H. seropedicae</i>	61
4.4.3. Adesão das estirpes de <i>H. seropedicae</i> a uma matriz inerte	65
4.4.4. A adesão de <i>H. seropedicae</i> à superfície radicular de milho é inibida por glucosamina e LPS purificado	66
4.5. NOCAUTE DE <i>rfbB</i> OU <i>rfbC</i> DIMINUEM A RESISTÊNCIA DE <i>H. seropedicae</i> À SDS, POLIMIXINA B E À METABÓLITOS VEGETAIS	69
4.6. EFEITOS PLEIOTRÓPICOS DAS MUTAÇÕES EM <i>rfbB</i> OU <i>rfbC</i> DE <i>H. seropedicae</i>	72
4.6.1. Avaliação da motilidade das estirpes RAMEB-B, RAMEB-C e selvagem de <i>H. seropedicae</i>	72
4.6.2. Avaliação da taxa de crescimento das estirpes RAMEB-B, RAMEB-C e selvagem de <i>H. seropedicae</i>	75
4.6.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas estirpes RAMEB-B, RAMEB-C e selvagem de <i>H. seropedicae</i>	77
4.7. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>rfbB</i>	78
4.7.1. Obtenção da estirpe mutante <i>H. seropedicae</i> LPEB	78
4.7.2. Regulação da expressão do gene <i>rfbB</i> de <i>H. seropedicae</i>	80
4.7.3. Indutores da expressão de <i>rfbB</i> alteram perfil eletroforético do LPS de <i>H. seropedicae</i>	85
5. CONCLUSÕES	87

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Estrutura do envelope de bactérias gram-negativas	12
FIGURA 2 –	Estrutura do lipopolissacarídeo	13
FIGURA 3 –	Biossíntese e exportação do LPS	18
FIGURA 4 –	Biossíntese bacteriana de dTDP-L-ramnose à partir de glucose-1-fosfato	20
FIGURA 5 –	Cultivo das plântulas de milho e inoculação com as estirpes de <i>H. seropedicae</i>	39
FIGURA 6 –	Esquema do ensaio de adesão das estirpes de <i>H. seropedicae</i> em raiz de milho	40
FIGURA 7 –	Esquema do ensaio de colonização endofítica das estirpes de <i>H. seropedicae</i> em raiz de milho	41
FIGURA 8 –	Esquema do ensaio de motilidade das estirpes de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> em meio NFbHPN semi-sólido	45
FIGURA 9 –	Organização genômica dos genes <i>rfb</i> em <i>H. seropedicae</i>	50
FIGURA 10 –	Perfil de hibridização dos genes <i>rfbB</i> e <i>rfbC</i> nas estirpes selvagem e mutantes de <i>H. seropedicae</i>	54
FIGURA 11 –	Perfil eletroforético do LPS das estirpes de <i>H. seropedicae</i>	56
FIGURA 12 –	Colonização de raízes de milho pelas estirpes <i>H. seropedicae</i> selvagem (barras verde escuro), mutante <i>rfbB</i> (barras verde amarelado) e <i>rfbC</i> (barras verde claro)	60
FIGURA 13 –	Competição entre <i>H. seropedicae</i> RAM4 (barras verde escuro) e RAMEBB (barras verde amarelado) pela colonização de milho	63
FIGURA 14 –	Adesão das estirpes de <i>H. seropedicae</i> à matriz de fibra de vidro	66
FIGURA 15 –	LPS purificado de <i>H. seropedicae</i> inibe adesão à superfície radicular de milho	68
FIGURA 16 –	Sensibilidade das estirpes de <i>H. seropedicae</i> selvagem (quadrados pretos), <i>rfbB</i> (lozangos) e <i>rfbC</i> (triângulos) ao estresse químico	70

FIGURA 17 – Motilidade das estirpes de <i>H. seropedicae</i> em meio NFbHPN contendo 0,5% ágar	74
FIGURA 18 – Curva de crescimento das estirpes de <i>H. seropedicae</i> em meio NFbHPN	76
FIGURA 19 – Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i>	78
FIGURA 20 – Perfil de hibridização do gene <i>rfbB</i> nas estirpes selvagem e mutante de <i>H. seropedicae</i>	80
FIGURA 21 – Regulação da expressão do gene <i>rfbB</i> de <i>H. seropedicae</i>	82
FIGURA 22 – Perfil do LPS das estirpes de <i>H. seropedicae</i> crescidas em meio NFbHPN na ausência (linhas 1, 3 e 5) e na presença de 5mM de CaCl ₂ (linhas 2, 4 e 6)	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS	22
TABELA 2 –	CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS	23
TABELA 3 –	ANTIBIÓTICOS	24
TABELA 4 –	SIMILARIDADES DE SEQUENCIA ENTRE AS PROTEÍNAS Rfb PUTATIVAS DE <i>H. seropedicae</i> E OUTRAS ENZIMAS DA BIOSSÍNTESE DE dTDP-L-Rha	48
TABELA 5 –	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO LPS DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Graus Celcius

% - Percentagem

α – Alfa

β – Beta

μ_{\max} – Taxa máxima de crescimento

4-N-Ara – 4-amino-4desoxi- L-arabinose

Ac – Acetil

Amp - Ampicilina

CNA – Confederação Nacional de Agricultura

D – Série estereoquímica D

DNA – Ácido desoxiribonucléico

dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfatado

D.O.₆₀₀ – Absorbância em 600 nanometros

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPS – Exopolissacarídeo

Gal – D-galactose

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Glc – D-glucose

GlcNAc – N-acetil -D-glucosamina

Hep – L-glicero-D-mano-heptose

Kdo – Ácido D-glicero-D-talo-3-desoxi-cetooctulosônico

Km – Canamicina

KPS – Polissacarídeo capsular

L – Série estereoquímica L

LPS – Lipopolissacarídeo

Man – D-manose

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

P_i – Fosfato inorgânico

QuiNAc – N-acetil D-quinovosamina

Rha – L-ramnose

Sm – Streptomicina

Tc – Tetraciclina

TMS – Trimetilsilil

TRIS – Aminometilidenotrimetanol

UV – Ultra violeta

RESUMO

Os lipopolissacarídeos (LPS) estão envolvidos nas fases iniciais da colonização das plantas pelas bactérias. Uma vez que L-ramnose é um monossacarídeo normalmente encontrado no LPS, dois genes de *H. seropedicae*, *rfbB* e *rfbC*, responsáveis por sua biossíntese foram mutagenizados para verificar seu papel no processo de colonização. Análises prévias da cadeia de oligossacarídeos do LPS da estirpe selvagem de *H. seropedicae* mostraram que D-glucose, L-ramnose e N-acetil D-glucosamina são os monossacarídeos predominantes, enquanto ramnose e N-acetil glucosamina não foram encontrados nas estirpes mutantes *rfbB* e *rfbC*. O padrão eletroforético do LPS dos mutantes foi drasticamente alterado quando comparado com o tipo selvagem. A mutagênese de *rfbB* ou *rfbC* de *H. seropedicae* aumentou o sensibilidade para SDS, sulfato de polimixina B e ácido salicílico. A capacidade de adesão dos mutantes à superfície radicular de plântulas de milho foi de 100 vezes menor que o do tipo selvagem. Essa capacidade do tipo selvagem de adesão às raízes de milho foi reduzida a um nível semelhante ao dos mutantes quando o ensaio foi realizado na presença de LPS isolado do tipo selvagem, D-glucosamina ou N-acetil D-glucosamina. As estirpes mutantes também foram significativamente menos eficientes na colonização endofítica de milho. As análises de expressão gênica indicaram que *rfbB* é induzido por naringenina, apigenina e CaCl₂. Juntos, estes resultados sugerem que o LPS intacto é necessário para a adesão eficiente de *H. seropedicae* à raiz de milho e para a colonização interna dos tecidos vegetais.

ABSTRACT

Lipopolysaccharides (LPS) are involved in the early stages of plants colonization by bacteria. Since L-rhamnose is a monosaccharide commonly found in LPS, two genes of *H. seropedicae*, *rfbB* and *rfbC*, responsible for its biosynthesis pathway have been knocked out to verify their role in the colonization process. GC-MS analysis of the *H. seropedicae* wild type strain for LPS oligosaccharide chain showed that L-rhamnose, D-glucose and N-acetyl D-glucosamine are the predominant monosaccharides, whereas L-rhamnose and N-acetyl D-glucosamine were not found in the *rfbB* and *rfbC* strains. The LPS electrophoretic pattern of the mutants was drastically altered when compared with the wild type. Knock-out of *rfbB* or *rfbC* increased the sensitivity towards SDS, polymyxin B sulfate and salicylic acid treatments. The mutants attachment capacities to maize root surface plantlets were 100-fold lower than the wild type. The wild type capacity to attach to maize roots was reduced to a similar level of the mutants when the assay was performed in the presence of isolated wild type LPS, D-glucosamine or N-acetyl D-glucosamine. The mutant strains were also significantly less efficient in endophytic colonization of maize. Gene transcriptional analysis indicated that the *rfbB* gene is upregulated by naringenin, apigenin and CaCl₂. Together, these results suggest that intact LPS is required for *H. seropedicae* efficient attachment to maize root and internal colonization of plant tissues.

1. INTRODUÇÃO

Gramíneas como arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*) são os cereais mais importantes para consumo humano. Estima-se que o arroz alimenta cerca de 50% da população mundial (LADHA *et al.*, 1997). Entretanto, esta população está crescendo a uma alta taxa, portanto a produção de cereais também deve crescer para acompanhar o aumento do consumo humano e animal. Depois da água, o nitrogênio é o principal fator limitante da produtividade vegetal. Assim, ocorre intensa utilização de fertilizantes nitrogenados industriais para assegurar uma alta produtividade na agricultura moderna. A produção e uso destes fertilizantes, no entanto, causa grandes impactos ambientais. Sua produção requer um grande consumo de combustíveis fósseis, que além de ser um recurso não renovável, apresenta alto custo e produz gases responsáveis pelo efeito estufa. Quando aplicados no solo, mais da metade é perdido através de desnitrificação, volatilização da amônia e lixiviação, podendo inclusive contaminar lençóis freáticos, representando um risco à saúde humana (PEDROSA, 1987; STOLTZFUS, 1997). Além disso, o excesso de nitrogênio pode induzir a formação de óxido nitroso (N₂O), um gás estufa que também contribui para a destruição da camada de ozônio (LADHA & REDDY, 2003; STOLTZFUS, 1997).

Uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos é a exploração da fixação biológica de nitrogênio realizada por bactérias associadas às culturas de gramíneas (WU *et al.*, 1995; LADHA & REDDY, 2003).

1.1. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Aproximadamente 80% da atmosfera terrestre é composta por nitrogênio molecular (N₂). Entretanto, a maioria dos organismos não consegue captá-lo e utilizá-lo metabolicamente. Para tal, é necessário que o nitrogênio esteja disponível como, por exemplo, na forma de amônia (NH₄⁺), podendo assim ser utilizado na biossíntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e demais compostos nitrogenados.

A fixação biológica de nitrogênio é o processo pelo qual o N₂ é reduzido enzimaticamente à amônia, forma metabolicamente utilizável pela maior parte dos organismos. O catalisador biológico deste processo é o complexo enzimático da nitrogenase (BURRIS, 1991). Em condições ótimas, este complexo cataliza a reação estequiometricamente balanceada mostrada abaixo (SIMPSON & BURRIS, 1984):



A fixação biológica de nitrogênio é realizada apenas por procariotos denominados diazotrofos, distribuídos nos domínios Bacteria e Archaea (YOUNG, 1992). As bactérias fixadoras de nitrogênio são comumente classificadas em três grupos: (i) diazotrofos de vida livre, que fixam N₂ para seu próprio consumo; (ii) diazotrofos simbióticos, que estabelecem íntima relação com a planta hospedeira

formando estruturas especializadas na fixação de nitrogênio denominadas nódulos; (iii) diazotrofos associativos, que também colonizam plantas porém não formam estruturas especializadas.

As bactérias diazotróficas constituem a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema. Estima-se que sejam fixados por ano aproximadamente $1,8 \times 10^8$ toneladas de nitrogênio através do processo de fixação biológica no mundo, correspondente a pelo menos duas vezes mais do que o montante compreendido pela fixação química e industrial (PEOPLES & CRASWELL, 1992). Esses números demonstram a importância ambiental destes microrganismos, além de indicar o enorme potencial econômico de sua utilização na agricultura.

Segundo dados de 2008 da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, a utilização de inoculantes em culturas de leguminosas como soja proporciona uma economia em fertilizantes nitrogenados de aproximadamente R\$ 10 bilhões/ano. Esta relevância econômica seria ainda maior se tecnologias similares fossem utilizadas para as culturas de gramíneas. Experimentos de inoculação destas culturas com microrganismos diazotrofos demonstraram o fornecimento da ordem de 30% do nitrogênio necessário para planta (BALDANI *et al.*, 1995), implicando, portanto, que o uso destes na agricultura brasileira representará uma economia anual de R\$ 3 bilhões em fertilizantes nitrogenados (DEL VILLAR, GAMEIRO & DABAT, 2004; EMBRAPA, 2008; CNA, 2008).

A capacidade dos microrganismos diazotrofos de fixar o nitrogênio e fornecê-lo para a planta depende intimamente da sua interação com o hospedeiro.

Desta forma, a compreensão dos mecanismos de colonização é importante para esclarecer as etapas envolvidas na interação planta-bactéria visando a utilização da fixação biológica de nitrogênio na agricultura.

1.2. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Praticamente todas as plantas vivem em íntima associação com microrganismos, os quais podem colonizar sua superfície (colonização epifítica) ou ocupar espaços em tecidos internos (colonização endofítica) (BRENCIC & WINANS, 2005). As plantas podem estabelecer associações com várias bactérias diazotróficas, sendo que todas ou algumas destas bactérias podem ser responsáveis pelo suprimento de nitrogênio fixado à planta (DÖBEREINER *et al.*, 1992; BARRAQUIO *et al.*, 1982; LADHA & REDDY, 1995; MALIK *et al.*, 1997). Além dos microrganismos cultiváveis associados externamente e internamente às plantas, uma grande diversidade de fixadores de nitrogênio não cultiváveis pode ser encontrada, baseado em análise de sequências parciais dos genes *nif* (*nitrogen fixation genes*) obtidas de amplificação de DNA das raízes (UEDA *et al.*, 1995). Através do grau de expressão destes genes *nif* pelos diazotrofos na planta, Ladha e colaboradores (1998) propuseram que a contribuição de bactérias diazotróficas associadas externamente às plantas é insuficiente para sustentar o desenvolvimento das mesmas e sua alta produtividade. Portanto, é possível que as bactérias endofíticas estejam melhor protegidas das mudanças ambientais que sofrem as

bactérias da rizosfera, enfrentando uma competição diminuída e apresentando um maior potencial de fornecimento de nitrogênio para a planta hospedeira (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998).

Entre os microrganismos diazotróficos endofíticos encontram-se representantes dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* (GILLIS *et al.*, 1995; BALDANI *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998), além de cianobactérias e actinomicetos (POSTGATE *et al.*, 1982).

Os organismos endofíticos podem interagir intimamente com o hospedeiro, uma vez que sua localização facilita a captação de fontes de carbono produzidas pela planta e proporciona as condições ideais para a fixação biológica de nitrogênio. Essa associação em geral não causa danos aos hospedeiros, pelo contrário, pode trazer vantagens para a planta como, por exemplo, biocontrole de patógenos e repressão de doenças por indução de resistência sistêmica e localizada (KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992; BALDANI *et al.*, 1995; JAMES & OLIVARES, 1998; WELLER, 1988). Além disso, os endófitos estimulam o crescimento vegetal e sua produtividade através da produção e secreção de fitohormônios e pelo suprimento de nitrogênio fixado (BALDANI *et al.*, 1995; BASHAN & HOLGUIN, 1997).

O estímulo efetivo do crescimento vegetal, a fixação de nitrogênio *in planta* e a transferência deste nitrogênio fixado para a planta dependem de uma colonização eficiente. Entretanto, os mecanismos da colonização pelo endófito

associativo não são claramente compreendidos, devido em parte à dispersão da bactéria por toda a planta. Esta situação contrasta, por exemplo, com a colonização localizada que ocorre na simbiose rizóbio - legume, na qual a bactéria fica confinada em estruturas morfo-genéticas (nódulos) desenvolvidas com a finalidade específica de abrigar as células colonizadoras (PÜHLER *et al.*, 2004; HALVERSON & STACEY, 1986). Essa colonização de rizóbios em leguminosas aparentemente inicia-se pela quimiotaxia da bactéria em direção às raízes, decorrente da liberação de flavonóides na rizosfera. Estes flavonóides também induzem a expressão de fatores de nodulação (fatores Nod) pela bactéria, causando a secreção de lipoquitooligossacarídeos. Essas macromoléculas, por sua vez, são reconhecidas por receptores protéicos vegetais, que desencadeiam alterações celulares nas raízes em contato com as bactérias, levando à formação do pêlo de infecção. Após a internalização dos rizóbios, ocorre a formação do simbiossomo, com a diferenciação das bactérias em “organelas” dedicadas exclusivamente à fixação de nitrogênio, denominadas bacteróides. Durante todos esses passos do processo de colonização, a comunicação da bactéria com o hospedeiro depende de diversos fatores, dentre eles exopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares (KPS), sistemas de secreção de proteínas e lipopolissacarídeos (MARIE *et al.*, 2004; BROUGHTON *et al.*, 2006; LE QUÉRÉ *et al.*, 2006).

Para que um microrganismo associativo endofítico seja capaz de colonizar as raízes das plantas intercelularmente é necessário primeiramente que seja capaz de superar os mecanismos de defesa da planta (QUISPEL, 1992). Contudo, tanto

nas interações associativas como nas simbióticas, o evento chave parece ser a colonização da rizosfera (PÜHLER *et al.*, 2004). Dentre os estágios deste processo estão a percepção da planta pelo microrganismo, a quimiotaxia em direção à raiz, a aderência e a colonização da superfície da mesma. *Pseudomonas fluorescens* exibe quimiotaxia em resposta a exudatos de plantas, como flavonóides, que são considerados dirigentes da interação planta-microrganismo (DE WEERT *et al.*, 2002). A adesão e colonização de raízes de milho por *Azospirillum brasilense* exigem a presença do flagelo, biossíntese de lipopolissacarídeos e polissacarídeos fibrilares, além da secreção de exopolissacarídeos (BURDMAN, OKON & JURKEVITCH, 2000; JOFRÉ *et al.*, 2004).

Qualquer que seja o tipo da interação planta-bactéria, o crescimento competitivo e a sobrevivência do microrganismo em diversas partes do hospedeiro necessitam de respostas adaptativas por parte da bactéria. Esta e outras pressões seletivas parecem ter direcionado a evolução de sistemas especializados de regulação que controlam a expressão dos fatores de colonização (MILLER, MEKALANOS & FALKOW, 1989). O controle da colonização da planta por bactérias endofíticas provavelmente envolve a interação molecular de produtos gênicos de origem vegetal e bacteriana. Portanto, a identificação e análise dos genes envolvidos na colonização de diazotrofos endofíticos em plantas de interesse econômico são importantes para melhorar a utilização e aplicação da fixação biológica de nitrogênio nestas culturas.

1.3. *Herbaspirillum seropedicae*

O gênero *Herbaspirillum*, pertencente ao Grupo β do Filo Proteobacteria, compreende bactérias gram-negativas, em forma de espiral, geralmente vibrióides, algumas vezes helicoidais, 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 foi determinado de 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, fixam nitrogênio atmosférico sob condições de microaerofilia e crescem utilizando N_2 como única fonte de nitrogênio (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992).

Esses microrganismos diazotróficos endofíticos 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 (*Roystonea* sp.) 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. Ocorrem então rápida colonização e ocupação de espaços intercelulares da raiz, assim como de aerênquima, xilema e, finalmente, partes aéreas (JAMES, 1997; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2008).

Herbaspirillum seropedicae foi originalmente isolado de raízes lavadas e ou esterilizadas de milho, sorgo e arroz por Baldani e colaboradores (1986), mas não foi isolado de solo não cultivado (BALDANI *et al.*, 1992).

Gyaneshwar e colaboradores (2002) demonstraram que a colonização de *H. seropedicae* em variedades de arroz tolerante a alumínio aumentou significativamente o crescimento vegetal e o acúmulo de nitrogênio. Baldani e colaboradores (1995) inocularam diferentes estirpes desta bactéria em sementes de arroz e observaram aumento de pelo menos 30% do nitrogênio total acumulado pela planta. O uso de estirpes de *H. seropedicae* imuno-marcadas ou com genes repórteres revelou que este expressa os genes *nif* ao colonizar raízes e partes aéreas de arroz (JAMES *et al.*, 2002; RONCATO-MACARI *et al.*, 2003), indicando que este endófito é capaz de fixar nitrogênio *in planta*.

Em cana-de-açúcar, a fixação de nitrogênio tem sido atribuída às bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp, que são aquelas encontradas em número suficiente para responder às taxas de fixação observadas (URQUIAGA *et al.*, 1992; DÖBEREINER *et al.*, 1993; JAMES *et al.*, 1994; DONG *et al.*, 1994; BODDEY, 1995). Entretanto, somente *Herbaspirillum* parece colonizar rapidamente esta e outras gramíneas. Por essa razão, esta bactéria apresenta grande potencial para ser utilizada como biofertilizante em gramíneas (DÖBEREINER *et al.*, 1995; JAMES *et al.*, 1997; OLIVARES *et al.*, 1996).

Ao contrário dos organismos diazotróficos que habitam a rizosfera e que necessitam competir com a microflora do solo por fontes de carbono, os organismos

diazotróficos endofíticos, como *H. seropedicae*, podem ser encontrados no interior dos tecidos das plantas nos espaços intercelulares, ambientes mais uniformes e protegidos. Isto pode explicar a alta contribuição da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar e arroz associada a *H. seropedicae* (URQUIAGA *et al.*, 1992; BALDANI *et al.*, 1996; ELEBELTAGY *et al.*, 2001).

A associação *H. seropedicae* - gramínea em geral não causa prejuízos às plantas hospedeiras; pelo contrário, promove o crescimento vegetal e aumento da produtividade provavelmente pela secreção de fitohormônios e fornecimento de nitrogênio fixado, além de contribuir no controle de patógenos e repressão de doenças por indução de resistência sistêmica e localizada e antagonismo (DE WELLER, 1988; KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992; BALDANI *et al.*, 1993; FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1993; JAMES & OLIVARES, 1998).

Genes potencialmente envolvidos na interação planta-*H. seropedicae* foram identificados no banco de dados do projeto de sequenciamento genômico de *H. seropedicae* (GENOPAR <www.genopar.org>). Até o presente momento, foram encontrados genes envolvidos na biossíntese de ácido indol-acético e giberilinas, sistema de secreção do tipo 3, exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos.

1.4. LIPOPOLISSACARÍDEOS

Na maioria das células bacterianas a parede celular protege o protoplasma de choques mecânicos e osmóticos. A parede celular também atua como uma

barreira molecular, impedindo que muitos compostos atinjam a superfície da membrana plasmática, diminuindo o estresse químico sobre a célula (TORTORA *et al.*, 2005). Apesar da aparente função de proteção inerte, a parede celular possui papel ativo na regulação e captação de moléculas pela célula e no reconhecimento celular por outros organismos (SINGLETON, 1992). A estrutura básica da parede celular bacteriana é formada por moléculas de peptidoglicano, as quais recobrem toda superfície celular como uma rede de polissacarídeos ligados por pontes peptídicas, conferindo grande rigidez à estrutura (GLASER, 1973). As bactérias em que o peptidoglicano é o principal constituinte da parede celular são denominadas gram-positivas. A parede celular de bactérias gram-negativas apresenta uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa a esta camada (Fig. 1). Este conjunto, descrito como envelope celular, mantém-se unido por ligações não-covalentes. Esta membrana apresenta em sua composição proteínas, fosfolipídeos e lipoproteínas. Contudo, os responsáveis por aproximadamente 60% do peso seco desta camada são os lipopolissacarídeos (LPS) (COLLINS & FERRIER, 1995).



FIGURA 1 – ESTRUTURA DO ENVELOPE DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS. À esquerda, eletromicrografia de *E. coli* K30 marcada com ferritina cationizada, e à direita, esquema da organização do envelope bacteriano (modificado de WHITFIELD, 2006).

Os LPS são macromoléculas de estrutura extremamente complexa encontrados exclusivamente formando a monocamada da membrana externa de bactérias gram-negativas (COLLINS & FERRIER, 1995). Esses glicoconjugados são formados por três regiões estruturalmente distintas: a porção denominada lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico e o antígeno-O (Fig. 2) (SUTHERLAND, 1985).

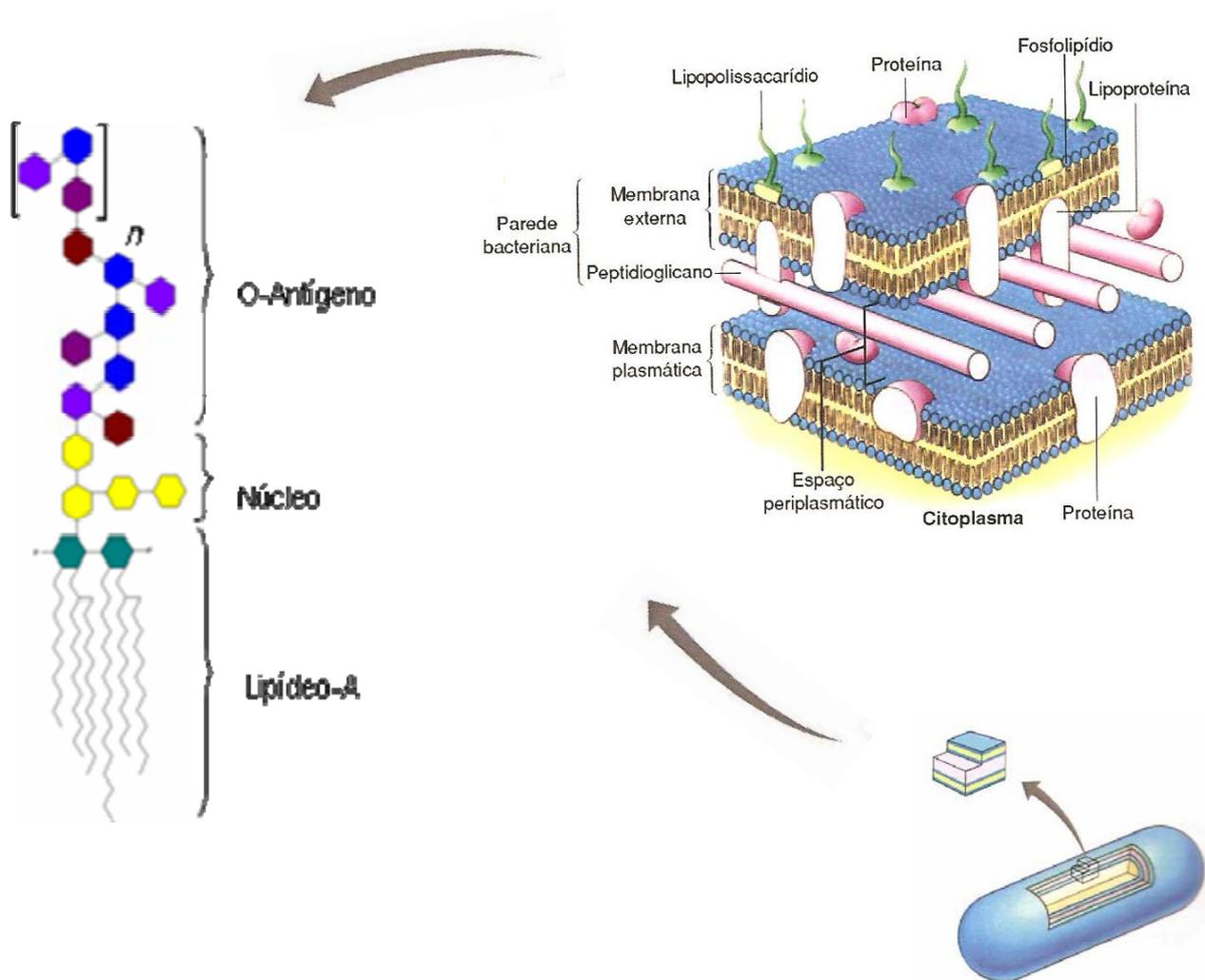


FIGURA 2 – ESTRUTURA DO LIPOPOLISSACARÍDEO. À direita, esquema do envelope bacteriano (modificado de TORTORA *et al.*, 2006) e posicionamento do LPS, e à esquerda, esquema da estrutura do LPS.

O lipídeo-A é a porção lipídica do LPS, responsável por ancorar toda a estrutura na membrana externa das bactérias. Esta porção é estruturalmente conservada entre as classes de bactérias, sendo composta de duas unidades de 2-

amino-2-deoxi-D-glucose (GlcN) ligadas entre si por ligações do tipo β -(1→6) e fosforiladas nas posições 1 e 4', além de apresentarem substituições por ácidos graxos de cadeia longa nas demais posições (ZÄHRINGER *et al.*, 1999). A ligação entre o lipídeo-A e o núcleo oligossacarídico é realizada normalmente por uma unidade de ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (Kdo), ligado ao C-6 livre de uma das GlcN (RAETZ & WHITFIELD, 2002). O núcleo oligossacarídico pode ser dividido em núcleo interno, composto pelo Kdo e heptoses, e em núcleo externo, composto de hexoses piranosídicas (JANNSON *et al.*, 1981; RAETZ, 1990). O antígeno-O é geralmente constituído de unidades oligossacarídicas repetitivas. Diferentes níveis de polimerização produzem cadeias com massas moleculares diferentes, fenômeno constantemente observado pelo padrão de bandas na análise eletroforética de LPS (ERRIDGE *et al.*, 2002). Essas cadeias polissacarídicas formadas, de composição e estrutura espacial extremamente variáveis, projetam-se a partir da membrana externa da bactéria para o meio ambiente, constituindo a superfície molecular que realiza o primeiro contato com um possível hospedeiro. Devido a esta característica, os LPS exercem uma importante função nos processos de reconhecimento e comunicação celular (KANNENBERG *et al.*, 1998).

No caso de *Pseudomonas syringae*, a perda ou alteração da estrutura do antígeno-O está relacionada com a perda da virulência (SMITH *et al.*, 1994). Alterações nesta porção do LPS em *Pseudomas putida* diminuem drasticamente sua colonização em plantas de batata (WEGER *et al.*, 1989). Alguns trabalhos sugerem que os LPS estão envolvidos no processo de adesão de *Agrobacterium tumefaciens*

às células hospedeiras (PUEPPKE, 1984; MATHYSSE, 1986). Mutantes desta bactéria que produzem um LPS deficiente na região do núcleo, mas que sintetizam a porção antígeno-O sem defeitos, são capazes de aderir às células de cenoura normalmente (METTS *et al.*, 1991), mostrando que a estrutura total do LPS não é fundamental para o processo. O processo de nodulação em leguminosas realizado durante a simbiose com rizóbios parece ser alterado na ausência de LPS intactos (CARLSON *et al.*, 1995; MAAGD *et al.*, 1998). A própria expressão do LPS nessas bactérias parece ser modulada simbioticamente, sendo que vários polissacarídeos são modificados durante a transição de células de vida livre para bacteróides (BROUGHTON *et al.*, 2006). Estas mudanças podem ser induzidas por extratos de plantas, principalmente por flavonóides encontrados em tais extratos (DUELLI *et al.*, 1997). Rizóbios mutantes na produção de LPS permanecem nos cordões de infecção, sem diferenciarem-se em bacteróides fixadores de nitrogênio (NOEL *et al.*, 1986), não completando o desenvolvimento dos nódulos em diversos legumes (NOEL *et al.*, 1986; CAMPBELL *et al.*, 2002; BROUGHTON *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que alterações nos LPS de rizóbios não afetam os primeiros estágios da colonização, como o enrolamento do pêlo radicular e formação do cordão de infecção, mas afetam a manutenção das células viáveis no interior da planta (KANNENBERG *et al.*, 1998; NOEL *et al.*, 2000). Além disso, os bacterióides dentro dos nódulos apresentam variações drásticas na estrutura do LPS em relação às células antes da infecção, como demonstrado *in situ* para os LPS de *R. leguminosarum* durante a simbiose com *Pisum sativum*, *Vicia sativa* e *Phaseolus*

vulgaris (KANNENBERG *et al.*, 1994; GOOSEN-DEROO *et al.*, 1991). Bacteróides de *R. etli* retirados de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (TAO *et al.*, 1992), e de *Sinorhizobium meliloti* retirados de alfafa (REUHS *et al.*, 1999) apresentaram diferenças estruturais na porção antígeno-O do LPS similares às aquelas observadas quando essas bactérias são cultivadas em baixos níveis de oxigênio e baixo pH, indicando que mudanças estruturais na porção de antígeno-O do LPS podem ser uma consequência das condições fisiológicas a que as células estão expostas nos nódulos (KANNENBERG *et al.*, 1998). Mutantes de *R. etli* que produzem uma estrutura truncada de LPS formam nódulos defeituosos e não fixam nitrogênio (NOEL e DUELLI, 2000). Esses dados indicam que o grau de alteração estrutural do LPS influencia as chances de sobrevivência dos bacterióides e o efetivo desenvolvimento de um nódulo ativo (CARLSON *et al.*, 1995; RIDLEY, 2000).

1.4.1. Biossíntese de lipopolissacarídeos

A reação inicial da biossíntese do antígeno-O envolve uma ligação fosfodiéster entre NAcGlc ou Gal ao ácido graxo undecaprenil-PP (Fig. 3). Essa molécula serve de suporte inicial para a ligação de NTP-açúcares por glucosiltransferases ancoradas na face citosólica da membrana interna. Após formação de uma unidade oligossacarídica ligada ao Und-PP, a molécula é translocada para a face periplasmática da membrana interna com o auxílio da proteína Wzx (antígeno-O flipase) (Fig. 3.1). As unidades oligossacarídicas do

antígeno-O são então polimerizadas pelas proteínas Wzy e Wzz (antígeno-O polimerases), e o produto é transferido ao lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central por WaaL (antígeno-O ligase). A biossíntese desta porção de lipídeo-A ligada ao oligossacarídeo central ainda é incerta, porém sabe-se que a proteína MsbA é necessária para o deslocamento da molécula da face citosólica para a face periplasmática da membrana interna (Fig. 3.2). A proteína periplasmática LptA, juntamente com as proteínas YrbK e LptB, podem agir como auxiliadoras no direcionamento da molécula de LPS para o transportador Imp/RlpB, que desloca o LPS para a face externa da membrana externa (VALVANO, 2003; RAETZ *et al.*, 2007).

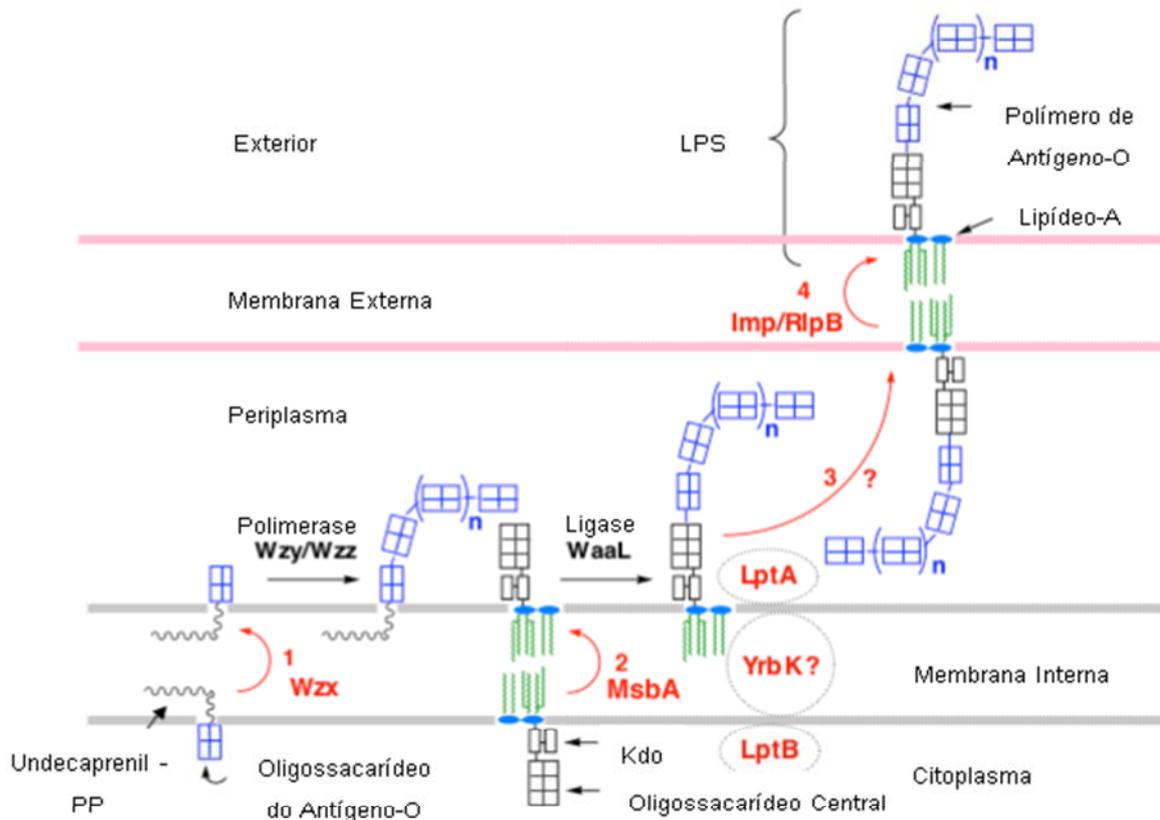


FIGURA 3 – BIOSÍNTESE E EXPORTAÇÃO DO LPS. Proteínas envolvidas na biossíntese do LPS são mostradas em preto, e as proteínas envolvidas no transporte do LPS são mostradas em vermelho. Modificado de RAETZ *et al.*, 2007.

As alterações estruturais no LPS podem ser ocasionadas pelo impedimento de sua exportação para a membrana externa, inibição da polimerização do antígeno-O ou mutagênese das vias de biossíntese dos monossacarídeos capsulares.

Alterações na biossíntese dos monossacarídeos constituintes do LPS geralmente modificam a interação da bactéria com o hospedeiro. Os genes *rfb* participam da biossíntese de L-ramnose (Fig. 4), um monossacarídeo frequentemente encontrado no antígeno-O. A via bacteriana de biossíntese de L-

ramnose requer o produto de quatro genes: *rfaA*, que codifica para glucose-1-fosfato timidililtransferase, *rfaB* (dTDP-D-glucose 4,6-dehidratase), *rfaC* (dTDP-4-keto-6-deoxi-D-glucose 3,5-epimerase) e *rfaD* (dTDP-4keto-L-ramnose redutase). Em várias bactérias, estes genes são encontrados agrupados com outros genes necessários para a biossíntese de antígeno-O (SAMUEL e REEVES, 2003), sugerindo que eles estão especificamente envolvidos na biossíntese de LPS. Em suporte a esta hipótese, uma estirpe mutante *rfaC* de *Pseudomonas aeruginosa* apresenta diferenças na composição do LPS (RAHIM *et al.*, 2000). A ruptura da biossíntese de ramnose modifica o LPS, aumenta a produção de exopolissacarídeos e diminui a colonização de milho por *Azospirillum brasilense* (JOFRÉ *et al.*, 2004). Mutantes de *Rhizobium* sp. NGR234 no gene *rfaB* não são capazes de completar a nodulação em diversas leguminosas (BROUGHTON *et al.*, 2006).

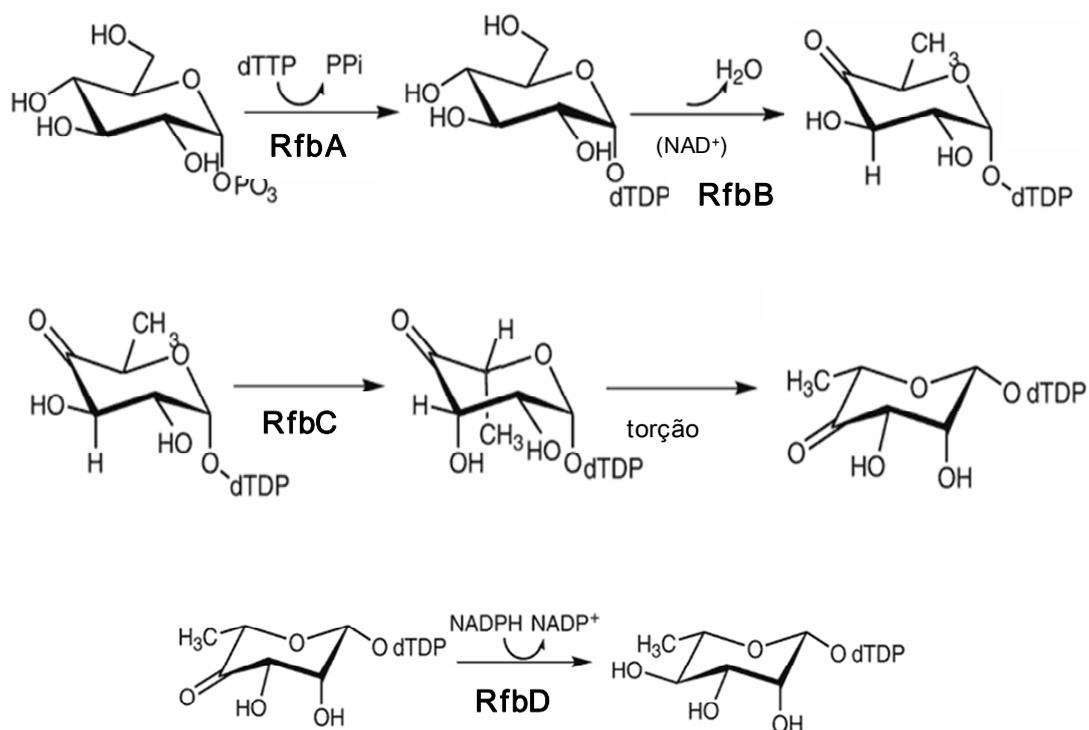


FIGURA 4 – BIOSÍNTESE BACTERIANA DE dTDP-L-RAMNOSE A PARTIR DE GLUCOSE-1-FOSFATO. A enzima RfbA promove a ativação da glucose-1-fosfato pela ligação do grupo dTTP, formando dTDP-D-glucose. Com o auxílio do co-fator NAD^+ , RfbB cataliza a oxidação do C4 de dTDP-glucose, e em seguida sua desidratação a dTDP-4-ceto-6-deoxiglucose. RfbC promove a epimerização deste substrato em C3 e C5, seguido de uma torção não enzimática do anel glicosídico que forma dTDP-L-lyxo-6-deoxi-4-hexulose. Finalmente, RfbD reduz o grupo ceto em C4 gerando dTDP-L-ramnose.

Desta forma, a identificação, isolamento e caracterização dos genes *rfb* de *H. seropedicae* permitirá determinar a importância destes na biossíntese do LPS, e consequentemente na colonização de gramíneas.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o envolvimento dos genes *rfbB* e *rfbC* na biossíntese do lipopolissacarídeo de *Herbaspirillum seropedicae*, determinando seu papel na interação deste organismo com vegetais.

Para isto, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- ✓ Estudo *in silico* dos genes *rfb* e respectivo operon;
- ✓ Obter de estirpes de *H. seropedicae* mutantes dos genes *rfbB* e *rfbC* por inserção de cassete contendo gene de resistência à tetraciclina ;
- ✓ Determinar alterações no perfil do lipopolissacarídeo das estirpes selvagem e mutantes *rfbB* e *rfbC* de *H. seropedicae*;
- ✓ Determinar o fenótipo da colonização endofítica de milho (*Zea mays*) pelas estirpes selvagem e mutantes *rfbB* e *rfbC* de *H. seropedicae*;
- ✓ Caracterizar o fenótipo de resistência das estirpes selvagem e mutantes *rfbB* e *rfbC* de *H. seropedicae* à estresse químico;
- ✓ Caracterizar os possíveis efeitos pleiotrópicos das mutações nos genes *rfbB* e *rfbC* de *H. seropedicae*;
- ✓ Obter fusão cromossomal do gene *rfbB* com o cassete *lacZ::nptI* em *H. seropedicae*;
- ✓ Determinar as condições de expressão destes genes no organismo de estudo.

3. METODOLOGIA

3.1. BACTÉRIAS

As estirpes bacterianas utilizadas estão listadas na Tabela 1.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS.

Estirpe	Características ^a	Referência
<i>Escherichia coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mcrR</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>) 7697 <i>galJ</i> <i>galK</i> λ^- <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ^-	INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	Estirpe tipo Z78 Sm ^r , Nif ⁺	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM4	<i>H. seropedicae</i> SmR1 expressando Ds-RED, Sm ^r , Km ^r	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2008
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAMEB-B	<i>H. seropedicae</i> SmR1 <i>rfbB</i> ⁻ , Sm ^r , Tc ^r	Este trabalho
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAMEB-C	<i>H. seropedicae</i> SmR1 <i>rfbC</i> ⁻ , Sm ^r , Tc ^r	Este trabalho
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> LPEB	<i>H. seropedicae</i> SmR1 <i>rfbB::lacZ</i> , Sm ^r , Km ^r	Este trabalho

^a Sm = estreptomicina; Km = canamicina; Tc = tetraciclina; e o sobrescrito r = resistente.

3.2. PLASMÍDEOS

Os plasmídeos utilizados estão listados na Tabela 2.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS.

Plasmídeos	Características ^a	Referência/Origem
pUC18/19	Amp ^r ; <i>lacZ</i>	INVITROGEN
HS06-FP-00-000-008.D02	Contem os genes <i>rfbB</i> e <i>rfbC</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1 em pUC19, Amp ^r	GENOPAR – Biblioteca Genômica
<i>prfbBTET1</i>	Contem o gene <i>rfbB</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1, com a inserção do transposon TnEZ<TET> em pUC19. Ap ^r , Tc ^r	Este trabalho
<i>prfbCTET1</i>	Contem o gene <i>rfbC</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1, com a inserção do transposon TnEZ<TET> em pUC19. Ap ^r , Tc ^r	Este trabalho
pHSRAMEBB	Contem o gene <i>rfbB</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1, com a inserção do transposon TnEZ<TET> e cassete <i>nptI</i> em pUC19. Ap ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabalho
pHSRAMEBC	Contem o gene <i>rfbC</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1, com a inserção do transposon TnEZ<TET> e cassete <i>nptI</i> em pUC19. Ap ^r , Km ^r , Tc ^r	Este trabalho
pKOK 6.1	Ap ^r , Cm ^r , cassete <i>lacZ</i> ::Km ^r sem promotor	Kokotek and Lotz, 1989
pLPEB	Contem o gene <i>rfbB</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1, fusionado com o cassete <i>lacZ</i> :: <i>nptI</i> em pUC19. Ap ^r , Km ^r	Este trabalho

^a Ap = ampicilina; Km = canamicina; Tc = tetraciclina; e o sobrescrito r = resistente.

3.3. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFb-malato (ANEXO 1) (KLASSEN *et al.*, 1997), a 30°C, sob agitação a 120 rpm, por 24 horas. No momento do inóculo foram adicionados 50 mmol/L de solução de fosfatos (K₂HPO₄ 17,8 g/L; KH₂PO₄ 159,5 g/L), e 20mmol/L de cloreto de amônio. Os meios

NFb-malato sólido e semi-sólido contém 15g/L e 1,75 g/L de ágar, respectivamente. O meio de cultivo contendo 20 mM de NH₄Cl e 50 mM de fosfatos foi denominado NFbHPN .

O meio utilizado para o cultivo de *Escherichia coli* foi o Luria-Bertani (LB) (ANEXO 2) (SAMBROOK *et al.*, 1989), ou Terrific Broth (TB) (ANEXO 3) (SAMBROOK *et al.*, 1989), sob agitação a 120 rpm, à 37° C. O meio LA, utilizado para o cultivo de *E. coli* em meio sólido, é composto pelo meio LB acrescido de 15 g/L de ágar.

Todos os meios foram autoclavados a 120°C, 1,2 atm, por 20 minutos após a preparação.

3.3.1. Antibióticos

Os antibióticos foram utilizados de acordo com a Tabela 3.

TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>E. coli</i>	Concentração final para culturas de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .
Ampicilina (Amp)	250 µg/mL	-
Tetraciclina (Tc)	10 µg/mL	10 µg/mL
Canamicina (Km)	50 µg/mL	500 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	20 µg/mL	80 µg/mL

As soluções estoques de antibióticos, exceto tetraciclina, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP

0,45 μ m). A solução estoque de tetraciclina foi preparada em etanol 70%. Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -4°C .

3.3.2. Manutenção das estirpes bacterianas

As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C . As estirpes de *H. seropedicae* foram estocadas em frascos de vidros de 5mL contendo 4mL de meio NFbHPN semi-sólido, a temperatura ambiente, sem agitação e devidamente lacrado com fita de silicone.

Os estoques de *E. coli* foram repicados uma vez ao ano, e os estoques de *H. seropedicae* a cada seis meses.

3.4. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.

3.4.1. Purificação de DNA genômico de *Herbaspirillum seropedicae*

A purificação do DNA total de *H. seropedicae* foi realizada segundo Souza (1990). Dez mililitros de cultura de *H. seropedicae* (D.O.₆₀₀ \cong 1,5) crescida em meio NFbHPN na presença dos antibióticos adequados foram centrifugados a 5000 g por

10 minutos, a 4 °C. As células foram lavadas com 500 µL de solução salina (NaCl 0,9m/v) e ressuspensas em 500 µL do mesmo. A lise celular foi obtida com adição da enzima lisozima (100 µg/mL) e incubação a 30 °C, durante 1 hora. Para completar a lise das células, foi adicionado o detergente SDS 1% (m/v), e a mistura incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. A degradação das proteínas foi realizada adicionando-se pronase (50 µg/mL) seguida de incubação a 37 °C por 16 horas. A mistura foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e duas vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspensão em 100 µL de água MilliQ autoclavada. O DNA foi quantificado com o kit QBit (INVITROGEN), conforme instruções do fabricante, ou por densitometria em gel de agarose.

3.4.2. Purificação de DNA plasmidial

A extração dos plasmídeos das células de *E. coli* Top10 foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), com algumas modificações. Brevemente, as células de *E.coli* Top10 contendo o plasmídeo de interesse foram isoladas de 1,5mL de cultura por centrifugação por 45 s a 12.000 x g. As células foram então lavadas em 200µl de tampão GET (glucose 50 mM, EDTA 1 mM, Tris 25 mM pH 8), e ressuspensas em 150 µL do mesmo tampão. O mesmo volume de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,2 M) foi adicionado e misturado por

inversão. Após homogeneização da mistura, a lise foi interrompida pela adição de 150 µL de solução de acetato de sódio 3 M (pH 4,8 ajustado com ácido acético). Essa mistura foi então incubada em gelo por 10min, e o precipitado separado por centrifugação por 10 min a 12.000 x g. Ao sobrenadante foi adicionado 150µl de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para precipitação de proteínas residuais. Após centrifugação por 5min a 12000g, o DNA plasmidial do sobrenadante coletado foi precipitado com etanol absoluto (3 volumes) ou isopropanol (0,6 volumes), e lavado com 1mL de etanol 70%. Após centrifugação por 5 min a 12.000 x g, o DNA foi seco à vácuo e ressuspenso em 30 µL de água MilliQ. Depois da purificação, os plasmídeos foram analisados por eletroforese (agarose 1% em TBE1X).

3.4.3. Extração de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão

Bandas de gel LMP 0,8%, contendo fragmentos de DNA de interesse, foram recortadas e submetidas a uma segunda eletroforese em gel LMP (0,8%), para eliminar contaminações de fragmentos de tamanhos diferentes daqueles de interesse. Após a segunda corrida, o DNA presente nas bandas de LMP foi purificado utilizando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE HealthCare). Depois da purificação, o tamanho dos fragmentos foi confirmado por eletroforese (agarose 1% em TBE1X) através de comparação com um padrão de tamanho molecular.

3.4.4. Eletroforese de DNA

As amostras de DNA foram diluídas em tampão de amostra Fsuds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75mmol/L, Ficoll ® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,025) e aplicadas em gel de agarose (1%) ou agarose LMP (0,7%), em tampão TAE (Tris base 40mmol/L, ácido acético 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0) ou TBE (Tris base 40mmol/L, ácido bórico 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0), em sistema horizontal da HOEFFER. A voltagem e o tempo de corrida variaram conforme a amostra.

Após a eletroforese, o DNA presente nos géis foi visualizado, após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), sob luz ultravioleta 320 nm utilizando o sistema UVP (BioImagin Systems).

3.4.5. Digestão de DNA por enzimas de restrição

A digestão de DNA foi realizada segundo protocolo recomendado pelo fabricante das enzimas de restrição (FERMENTAS ou INVITROGEN). Sistemas de reação de 20 µL foram utilizados para confirmação de tamanho de fragmentos. Sistemas de reação de 100 µL foram utilizados para purificação dos fragmentos gerados. A clivagem foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TBE 1X).

3.4.6. Ligação de fragmentos de DNA aos vetores

O vetor linearizado e o fragmento de DNA de interesse, devidamente clivado com as enzimas de restrição adequadas, foram quantificados através de densitometria em sistema UVP (BioImagin Systems) após eletroforese, usando o padrão de peso molecular 1Kb Ladder (FERMENTAS) com referência. O sistema de reação de ligação continha vetor linearizado e DNA inserto em uma razão molar de aproximadamente 1:5mol; T4 DNA ligase; e tampão de ligação, perfazendo o volume final de 10 μ L. A reação foi incubada a 16°C durante a noite. O produto da reação foi eletrotransformado em *E. coli* Top 10.

3.4.7. Reação de transposição *in vitro*

Os plasmídeos contendo genes a serem mutagenizados foram utilizados para reações de transposição *in vitro*, segundo recomendações do fabricante do EZ:TN<TET-1> (Epicentre Laboratories). O sistema de reação de transposição continha DNA de interesse e transposon em uma razão molar de aproximadamente 3:1 mol; transposase; e tampão de ligação, perfazendo o volume final de 10 μ L. O produto da reação foi utilizado para a transformação bacteriana.

3.4.8. Amplificação de DNA

A amplificação do gene 16S rDNA, para confirmação da espécie bacteriana utilizada, foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), como descrito por Koshier e Wilson (1991).

Foram utilizados 10 pmol dos *primers* Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') e Y3 (5'-CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3'), aproximadamente 10ng de DNA gênomico das estirpes de interesse, 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl₂ e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase em um volume final de reação de 50µL, nos seguintes parâmetros: 1 ciclo de 95°C por 1 min e 30 ciclos com uma etapa de 94°C por 45 s, outra de 60°C por 45 s e outra de 72°C por 1 min e 30 s, e extensão final de 72°C por 10 min.

3.4.9. Sequenciamento de DNA

Fragmentos de DNA de interesse foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13F (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3')/ M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') do vetor pUC19, e/ou TET1-FP (5'-GGGTGCGCATGATCCTCTAGAGT-3')/ TET1-RP (5'-TAAATTGCACTGAAATCTAGAAATA-3') do transposon EZ::Tn5™ <TET1>, ou Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3')/ Y3 (5'-

CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT -3'), pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxynucleotídeos marcados com fluoróforos (SANGER, NICKLEN & COULSON, 1977). As reações de sequenciamento continham 200-400 ng de DNA plasmidial, 3µL de pré-mix (ET *terminator*), 5 pmol de oligonucleotídeos iniciadores e água MilliQ para completar o volume para 7,5 µL. Como parâmetros da reação de sequenciamento foram utilizados 1 ciclo de 95°C por 1 min, 35 ciclos com uma etapa de 94°C por 20 seg e outra de 60°C por 1min e 30 seg.

Os amplicons foram purificados por precipitação com acetato de amônia 200 mM e dois volumes de etanol absoluto e centrifugação, em seguida lavada com 150 µL de etanol 70% e seca a vácuo.

O sequenciamento de bases foi realizado no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 (Amersham Bioscience).

3.5. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.5.1. Preparo de células eletrocompetentes

As células de *E. coli* foram crescidas em meio SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989) até a cultura atingir DO_{600nm} 0,7, e então foram incubadas em gelo por 30 min. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 5 min e lavadas 2 vezes com água destilada estéril a 4°C e uma vez com solução de glicerol 15%

estéril a 4°C. Após estas lavagens, as células foram ressuspensas em glicerol 15% e estocadas a -70°C.

As células eletrocompetentes de *H. seropedicae* foram preparadas através de um processo similar, porém as células foram crescidas em meio NFbN com 5mM de solução de fosfatos, e as centrifugações foram realizadas por 8 min a 4.000 x g.

3.5.2. Transformação bacteriana

O método utilizado para transformação bacteriana foi o descrito pelo fabricante do Cell Porator (Life Technologies). O DNA plasmidial (5 ng) foi adicionado a 100µL da suspensão de células eletrocompetentes, e incubado em gelo por 1 minuto. Em seguida, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um pulso de campo elétrico (4KΩ, 330µF para *E. coli* e 2,8KΩ, 330µF para *H. seropedicae*) para permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1mL do meio de cultura correspondente (SOC para *E. coli* e NFbHPN para *H. seropedicae*) e incubadas sob agitação por 1 hora, na temperatura adequada (37°C para *E. coli* e 30°C para *H. seropedicae*). Em seguida, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio sólido correspondente contendo o antibiótico adequado à seleção dos transformantes de interesse.

3.6. HIBRIDIZAÇÃO DE DNA

3.6.1. Transferência do DNA genômico do gel de agarose para a membrana de náilon

O DNA genômico purificado das estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae* foi digerido com as endonucleases de restrição *Bgl*II, *Sal*I, *Sma*I e *Sac*I (Fermentas). Os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1X). Esses fragmentos foram então transferidos para membranas de náilon Hybond N+ (Amersham Bioscience) por capilaridade, segundo Sambrook (1989). A membrana foi seca a temperatura ambiente, e o DNA fixado através da exposição à luz ultravioleta (312 nm) durante 3 minutos.

3.6.2. Marcação das sondas

Para marcação da sonda utilizada na confirmação da mutagênese de *rfbB* e *rfbC*, o plasmídeo HS06-FP-00-000-008.D02 foi digerido com as endonucleases *Bam*HI e *Sac*I, liberando os genes *rfbB* e *rfbC*. aos fragmentos de DNA foram submetidos a eletroforese em gel de agarose LMP e a banda de 1,8Kb, referente aos genes, foi purificada pelo kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE HealthCare), e utilizada como molde para sonda. A marcação desta sonda foi

realizada com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (GE HealthCare) com o sistema Megaprimer DNA Labelling (GE Healthcare) conforme recomendação do fabricante.

Para marcação da sonda utilizada na confirmação da inserção do cassete repórter *lacZ::nptI*, o plasmídeo pLPEB foi digerido com a endonuclease *Pst*I, liberando o cassete *lacZ::nptI* e o gene *rffB*. Os fragmentos de restrição foram utilizados como molde para sonda. A marcação desta sonda com fluoresceína-dUTP foi realizada com o kit “Gene Images Random Prime DNA Labeling Kit” (GE HealthCare), conforme instruções do fabricante.

3.6.3. Hibridização

As membranas de náilon contendo o DNA genômico foram pré hibridizadas em tampão fosfato 0,5 mol/L, pH 8,0 contendo 2% de SDS, a 60 °C, por 4 horas. Após esse período foi adicionado a solução 1 mg.mL⁻¹ de DNA de timo e as sondas desnaturadas, a hibridização foi feita durante 24 horas a 60°C. Após incubação, as membranas foram lavadas com SSC 2X (0,3M NaCl e 0,03 M de citrato de sódio) contendo 0,1% de SDS a 60°C por 15 minutos, e com SSC 0,1X (0,015M NaCl e 0,0015M de citrato de sódio) contendo 0,1% de SDS a 60°C por mais 15 minutos e reveladas como descrito abaixo.

3.6.4. Revelação

A detecção da hibridização foi realizada por exposição da membrana a filme fotográfico ou com o kit “Gene Images CDP-Star Detection Kit” (GE HealthCare), conforme instruções do fabricante. A captura e visualização da emissão da fluorescência foram realizadas no sistema UVP (BioImagin Systems). A captura dos sinais de hibridização radioativos no filme fotográfico foi realizada com scanner STORM 820 (Molecular Dynamics) e visualizada com o software ImageQuantII (Amersham Bioscience).

3.7. ESTUDO *in silico* DOS GENES *rfb* DE *H. seropedicae*

A partir do banco de dados do Programa GENOPAR, foram encontradas no organismo de estudo as sequencias com similaridade aos genes *rfb* de outras bactérias, utilizando o programa PSI-Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Uma vez identificados os genes, a região genômica e operon em que se encontram foram caracterizados *in silico*, através de comparações da organização, estrutura e similaridade com outros microrganismos, utilizando o programa STRING 8.0 (SNEL *et al.*, 2000).

Os clones da biblioteca genômica de *H. seropedicae* que apresentaram como inserto os genes *rfb* foram selecionados no banco de dados do Programa GENOPAR e utilizados para análises moleculares subsequentes.

3.8. OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*

O plasmídeo HS06-FP-00-000-008.D02 proveniente da biblioteca genômica de *H. seropedicae*, contendo os genes *rfbB* e *rfbC*, foi mutagenizado por inserção do cassete transposon EZ:Tn<TET-1> (Epicentre Laboratories), o qual confere resistência à tetraciclina, e então eletrotransformados na estirpe selvagem *H. seropedicae* SmR1. Os mutantes cromossomais que sofreram recombinação homóloga dupla foram obtidos por seleção negativa, e nomeados *H. seropedicae* RAMEB-B (*rfbB*⁻) e RAMEB-C (*rfbC*⁻). A inserção do cassete no genoma foi confirmada por hibridização (*Southern blot*).

O mesmo plasmídeo foi utilizado para construção de uma fusão do gene repórter *lacZ* ao gene *rfbB*. Para isto, o cassete *lacZ::nptI* foi extraído do vetor pKOK 6.1 por digestão com *Bam*HI e purificação por LMP. O cassete purificado foi ligado ao plasmídeo HS06-FP-00-000-008.D02 previamente digerido com *Bam*HI. Esta construção, em que o cassete interrompe o gene *rfbB* na base 553, foi então eletrotransformada na estirpe selvagem. Os mutantes cromossomais que sofreram recombinação homóloga foram selecionados e nomeados *H. seropedicae* LPEB, e a inserção do cassete no genoma foi confirmada por hibridização (*Southern blot*).

A espécie de todos os microrganismos foi confirmada por amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA.

3.9. PREPARAÇÃO DO LPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* PARA ANÁLISE POR SDS-PAGE

A extração do LPS total para análise eletroforética foi realizada segundo Broughton e colaboradores (2006), com algumas modificações. As células bacterianas obtidas pela centrifugação de 2mL de culturas das estirpes de *H. seropedicae* ($DO_{600} = 1.5$) foram lisadas em 80 μ l de tampão de lise [1M Tris pH6,8; 4% β -mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,005% bromofenol azul] à 100°C por 10 min. Depois de resfriado a temperatura ambiente, foram adicionados ao sistema 2% de SDS (m/v) e 0.08 mg.mL⁻¹ de proteinase K, misturados e incubados à 60°C por 16 horas. Após incubação, 2 volumes de tampão de amostra [120mM Tris pH6,8; 3% SDS; 9% β -mercaptoetanol; 30% glicerol; 0,03% bromofenol azul] foram adicionados, e 5 μ l da mistura final foram aplicados em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 16% m/v), submetido a um campo elétrico de 100 V por 2 h e 30 min, e finalmente visualizada por oxidação com periodato e coloração com prata (TSAI e FRISCH, 1982).

Para verificar o efeito do flavonóide naringenina e de CaCl₂ sobre o perfil eletroforético do LPS das estirpes de *H. seropedicae*, estas foram cultivadas por 16h em NFbHPN contendo 5mM de CaCl₂ ou (50 μ g.mL⁻¹) de naringenina, e o LPS total foi extraído de 10⁷ células como descrito anteriormente. Quantidades iguais de amostra foram então separadas por SDS-PAGE (16% m/v) e visualizadas por oxidação com periodato e coloração com prata (TSAI e FRISH, 1982). As imagens

dos géis foram analisadas por densitometria ótica utilizando o programa “LabWorks Imaging and Analysis Software” (UVP Ltd.)

3.10. ENSAIOS *in planta*

3.10.1. Desinfecção da superfície das sementes de milho

As sementes de *Zea mays* cv. SHS-3031 foram esterilizadas com uma solução de hipoclorito de sódio 6% (v/v) e Tween 20 0,01% (v/v) por 20 minutos e, em seguida, em etanol 70% (v/v) por 5 minutos. As sementes foram então lavadas quatro vezes com água destilada estéril.

3.10.2. Condições de cultivo das plantas e inoculação com as estirpes de *H. seropedicae*

Após esterilização as sementes de milho foram transferidas para blocos de 96 poços tipo *deep-well* (Greiner Bio-One) contendo suportes de papel filtro (3M®) e 3 mL de meio para gramíneas (EGENER *et al.*, 1999) e crescidas a 25°C com período de luz de 12h e 1250 lux (Fig. 05). Após três dias de crescimento, cada plântula foi inoculada com 10⁵ unidades formadoras de colônias (UFC) das estirpes de *H. seropedicae* por 30 min a 30°C e 50rpm.

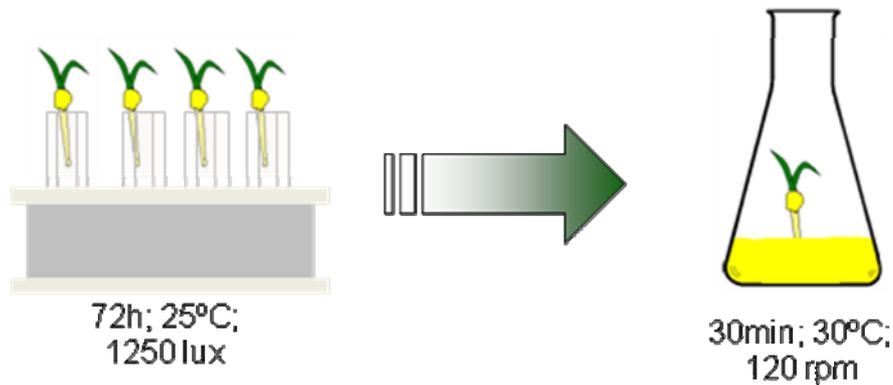


FIGURA 05 – CULTIVO DAS PLÂNTULAS DE MILHO E INOCULAÇÃO COM AS ESTIRPES DE *H. seropedicae*.

3.10.3. Ensaios de adesão das estirpes de *H. seropedicae* às raízes de milho

Imediatamente após a inoculação, as amostras de raiz (aproximadamente 0,05 g de raiz úmida) foram cortadas, pesadas e lavadas duas vezes por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e então vortexadas vigorosamente por 20 segundos em 1 mL da mesma solução (Fig. 06). O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz de milho úmida através de diluição seriada e contagem em meio sólido. Os resultados reportados representam a média de pelo menos quatro experimentos independentes.

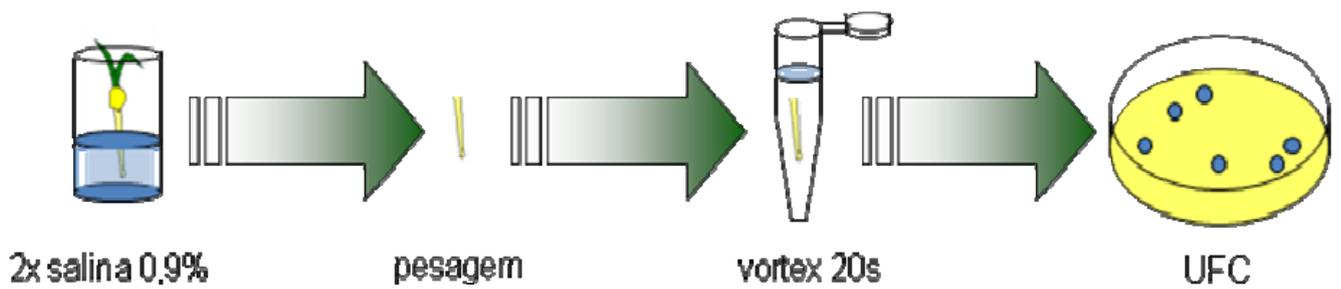


FIGURA 06 – ESQUEMA DO ENSAIO DE ADESÃO DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* EM RAIZ DE MILHO.

3.10.4. Ensaios de colonização interna das raízes de milho pelas estirpes de *H. seropedicae*

A determinação do número de bactérias endofíticas foi realizada 1, 4, 7 e 10 dias após inoculação. As raízes foram cortadas, pesadas e tiveram sua superfície desinfetada por uma lavagem de 2 minutos em hipoclorito de sódio 1% (v/v), seguido de 2 minutos em etanol 70% (v/v), e então lavadas duas vezes com água destilada estéril por 2 minutos. As amostras foram então maceradas em grau estéril em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Os extratos foram utilizados para determinar o número de bactérias endofíticas colonizando os tecidos radiculares internos de milho, através de diluição seriada e contagem em meio sólido (Fig. 07). Os resultados reportados representam a média de pelo menos quatro experimentos independentes.

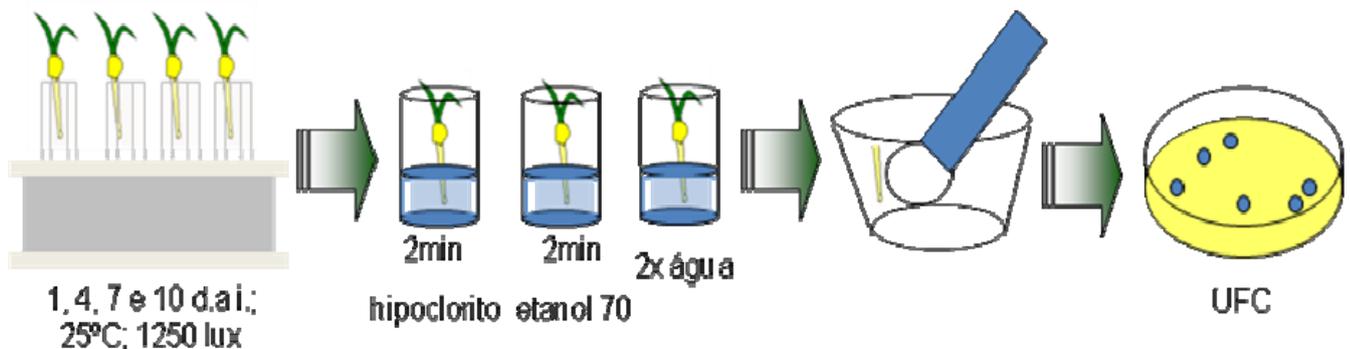


FIGURA 07 – ESQUEMA DO ENSAIO DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* EM RAIZ DE MILHO.

3.10.5. Ensaios de competição pela colonização de milho entre as estirpes de *H. seropedicae*.

Ensaios de competição pela colonização de milho foram realizados utilizando as estirpes *H. seropedicae* RAM4 (Ds-RED, Sm, Km) e RAMEB-B (*rfbB*:Tn5<TET1>, Sm, Tc), em proporção de 1:1 e 1:100, mantendo o total de 10^5 UFC.mL⁻¹ de inóculo por planta. A determinação das UFC foi realizada como descrito anteriormente, e a resistência a antibióticos e produção de Ds-RED foram utilizadas para identificar a estirpe. Os valores mostrados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

3.10.6. Ensaios de competição química pela adesão à superfície radicular de milho

Ensaio de competição química pela adesão à superfície radicular de milho foram realizados como descrito anteriormente, utilizando um excesso de LPS purificado das estirpes selvagem ou mutantes (1 mg de equivalentes em D-glucose.mL⁻¹), ou 1 mg.mL⁻¹ de solução monossacarídica (D-manose, D-glucose, L-ramnose, D-galactose, D-glucosamina ou N-acetil D-glucosamina) como competidores durante inoculação da planta com bactéria. Depois da seleção dos competidores, o ensaio foi repetido utilizando concentrações biologicamente relevantes destes competidores (10 µg.mL⁻¹).

Os LPS utilizados nestes ensaios foram purificados pelo método do fenol-água quente descrito por Westphal e Jann (1965). A concentração destes LPS foi determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico descrito por DuBois e colaboradores (1956), utilizando D-glucose como padrão.

Os resultados reportados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

3.11. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em 10 mL de meio NFbHPN com adição de 50 mg de fibra de vidro, a 30°C e 120rpm. Amostras da fibra de vidro foram coletadas a seis, doze e dezesseis horas após inoculação. As fibras de vidro foram coradas com 200 µL de violeta cristal 1% (m/v), e lavadas três vezes com

solução salina 0,9% (m/v). Então, 1 mL de etanol absoluto foi adicionado para remover o corante, e esta solução foi utilizada para determinar a absorbância em 550 nm. O controle negativo deste procedimento foi realizado sem inoculação bacteriana. Os dados são expressos como DO_{550} das amostras subtraída da DO_{550} do controle negativo. Os resultados reportados representam a média de pelo menos três experimentos independentes, cada um com amostras em duplicata.

3.12. ENSAIOS DE RESISTÊNCIA A ESTRESSE QUÍMICO.

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas a 30°C e 120 rpm em meio NFbHPN, por 16 horas, até $DO_{600} = 1$, e então 10^2 - 10^3 células foram plaqueadas em NFbHPN sólido na presença de concentrações variáveis de sulfato de polimixina B, ácido salicílico, narigenina, quercitina ou extrato de cana-de-açúcar. Após 24 horas de incubação a 30°C, o número de unidades formadoras de colônias foi determinado. Para os ensaios de resistência a SDS, as células foram plaqueadas em meio LA contendo diferentes concentrações deste detergente, e após 24-72 horas, o número de UFCs foi determinado. Os resultados reportados representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

3.13. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS PLEIOTRÓPICOS DAS MUTAÇÕES NOS GENES *rfb* EM *H. seropedicae*

3.13.1. Avaliação do crescimento das estirpes selvagem e mutantes RAMEB-B e RAMEB-C de *H. seropedicae*.

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas a 30°C e 120rpm em meio NFbHPN, por 16 horas, até $DO_{600} = 1$. As culturas foram ajustadas para $DO_{600} = 0,2$ em novo meio NFbHPN e incubadas a 30°C e 120rpm. Uma amostra foi retirada das culturas a cada hora para determinação da absorbância a 600nm e concentração de proteína (BRADFORD, 1976). A curva de crescimento gerada foi utilizada para o cálculo da taxa máxima de crescimento e tempo de geração das estirpes por regressão linear. A taxa máxima de crescimento corresponde à inclinação da reta multiplicada pelo fator 2,303, e o tempo de geração corresponde ao logaritmo neperiano de 2 dividido pela taxa máxima de crescimento. Os resultados reportados representam a média de dois experimentos independentes.

3.13.2. Avaliação da motilidade das estirpes selvagem e mutantes RAMEB-B e RAMEB-C de *H. seropedicae*

Alíquotas de 3 μ L contendo 10^5 células das estirpes de *H. seropedicae* foram inoculadas no centro de um cilindro de vidro parcialmente imerso em meio NFbHPN semi-sólido (0,5% de ágar). A cultura foi incubada a 30°C, e o movimento das células para baixo do tubo e a formação de biofilme na superfície do meio de cultura circundante foi monitorada visualmente ao longo do tempo (Fig. 08).

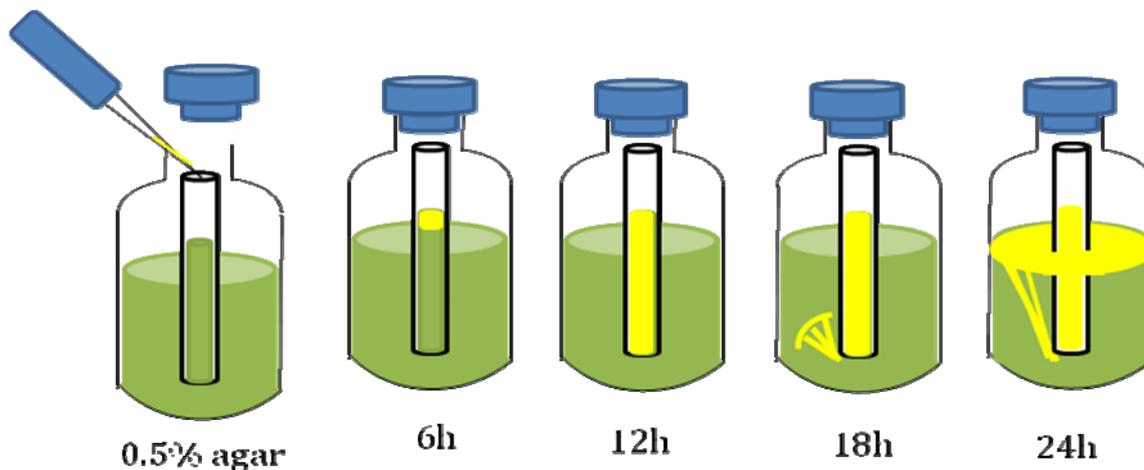


FIGURA 08 – ESQUEMA DO ENSAIO DE MOTILIDADE DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* EM MEIO NFbHPN SEMI-SÓLIDO.

3.13.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos das estirpes selvagem e mutantes RAMEB-B e RAMEB-C de *H. seropedicae*

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHPN sólido acrescido de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do corante epifluorescente calcofluor bright 28 (Sigma). A produção de EPS foi avaliada visualmente pela observação da produção de goma pelas estirpes, e pela intensidade de fluorescência quando irradiadas com luz UV de 365nm.

3.14. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *rfbB* DE *H. seropedicae*

As estirpes de *H. seropedicae* LPEB4 e LPEB10, contendo a fusão cromossomal *rfbB::lacZ::nptI*, foram utilizadas para definir a regulação da expressão dos genes *rfb*. Para avaliar o efeito da fonte de carbono, as estirpes foram incubadas a 30°C, 120rpm, em meio NFbHP suplementado com glutamato (5 mM) como fonte de nitrogênio por 16h. Em seguida, as células foram lavadas com solução salina estéril (NaCl 0,9%) e ressuspensas (DO₆₀₀ 1,0) em meio NFb-sem carbono HPG contendo malato (2% m/v), glucose (2% m/v), manose (2% m/v) ou ramnose (2% m/v) como única fonte de carbono. Estas células foram incubadas por 6 horas (até DO₆₀₀ 2,0), e então a atividade de β-galactosidase foi determinada segundo Miller (1972). Alíquotas de 100 μL da cultura de bactérias foram lisadas com 50 μL de clorofórmio, e em seguida adicionado 900 μL de tampão Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1mM, β-mercaptoetanol 50 mM, SDS 0,1%). A mistura foi incubada a 30°C por 10 min, e então foi adicionado 200 μL de ONPG (4 mg. mL⁻¹ em tampão Z). Após estabilização da coloração da reação, ela foi interrompida com 400 μL de Na₂CO₃ (1 M), centrifugada por 15 min a 12.000 x g e determinada a absorbância em 415 nm (o-nitrofenol) e 550 nm (turbidez da mistura). A atividade específica foi calculada como a DO₄₁₅ diminuída da DO₅₅₀ e normalizada pelo produto do tempo de reação, volume de cultura e concentração total de proteínas na amostra. A concentração de proteínas foi determinada segundo Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

A expressão de *rffB* também foi determinada na presença dos seguintes compostos: flavonóides - quercetina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), apigenina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou naringenina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CaCl_2 (5 mM), MgCl_2 (5 mM), NaCl (100 mM), extrato de cana-de-açúcar (5% v/v), uma plântula de milho (1 plântula.mL⁻¹, aproximadamente 50 mg de raízes), sulfato de polimixina B (2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ou ácido salicílico (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Após ajuste das culturas para $\text{DO}_{600} = 1$ em meio NFbHPG, os compostos listados acima foram adicionados à culturas independentes. As culturas foram incubadas por 6 horas, e então a atividade de β -galactosidade foi determinada como descrito anteriormente. Os resultados reportados representam a média de pelo menos cinco experimentos independentes. O controle com uma plântula de milho sem bactérias não apresentou atividade de β -galactosidade detectável.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISES *in silico* DA VIA DE BIOSÍNTESE DE RAMNOSE EM *H. seropedicae*

A análise do banco de dados do genoma de *H. seropedicae* (www.genopar.org) revelou a presença de quatro genes codificantes para proteínas similares a RfbA, RfbB, RfbC e RfbD, responsáveis pela biossíntese bacteriana de dTDP-ramnose (TABELA 4).

TABELA 4. SIMILARIDADES DE SEQUENCIA ENTRE AS PROTEÍNAS Rfb PUTATIVAS DE *H. seropedicae* E OUTRAS ENZIMAS DA BIOSÍNTESE DE dTDP-L-Rha.

Proteínas Rfb de <i>H. seropedicae</i> ^a	Proteínas relacionadas de outros organismos	Identidade / Similaridade (%) ^b	Função proposta	Referência ^c
RfbB (FJ830638)	RfbB <i>Ralstonia solanacearum</i>	71 / 84	dTDP-D-glucose 4,6-dehidratase	ZP-00943277.1
	RfbB <i>Burkholderia graminis</i>	68 / 81	dTDP-D-glucose 4,6-dehidratase	ZP-02883286.1
	RfbB <i>Pseudomonas syringae</i>	62 / 75	dTDP-D-glucose 4,6-dehidratase	YP-234022.1
	RmlB <i>Azoarcus</i> sp.	63 / 76	dTDP-D-glucose 4,6-dehidratase	YP-933381.1
RfbC (FJ830638)	RfbC <i>Pseudomonas fluorescens</i>	62 / 74	dTDP-4-dehidroramnose 3,5-epimerase	YP-257449.1
	RfbC <i>Ralstonia solanacearum</i>	59 / 72	dTDP-4-dehidroramnose 3,5-epimerase	ZP-00943274.1
	RfbC <i>Burkholderia xenovorans</i>	59 / 73	dTDP-4-dehidroramnose 3,5-epimerase	YP-557250.1
	RmlC <i>Azoarcus</i> sp.	60 / 71	dTDP-4-dehidroramnose 3,5-	YP-158282.1

		epimerase		
RfbD (FJ830636)	RfbD <i>Pseudomonas mendocina</i>	49 / 66	dTDP-4-dehidroramnose redutase	YP-001187365.1
	RfbD <i>Ralstonia solanacearum</i>	47 / 63	dTDP-4ceto-L-ramnose redutase	CAD14213.1
	RmlD <i>Rickettsia typhi</i>	47 / 67	dTDP-4ceto-L-ramnose redutase	YP-067284.1
	RfbD <i>Burkholderia cenocepacia</i>	33 / 50	dTDP-4-dehidroramnose redutase	YP-625593.1
HS 283.853 (provável RfbA) (FJ830637)	PSEEN2466 <i>Pseudomonas entomophila</i> L48	52 / 67	fosfo-açúcar nucleotidiltransferase	YP-608074.1
	Reut A0722 <i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	41 / 53	fosfo-açúcar nucleotidiltransferase	YP-294948.1
	Neut 0159 <i>Nitrossomonas eutropha</i> C91	40 / 53	nucleotidiltransferase	YP-746412.1
	NTP-transferase <i>Burkholderia</i> sp. H160	36 / 50	nucleotidiltransferase	ZP-03266916.1

^a Número de acesso do banco de dados GenBank.

^b Os alinhamentos das proteínas foram realizados pelo programa PSI-Blastp no site do NCBI (<http://ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

^c Número de acesso do banco de dados SwissProt.

Os genes *rfbB* e *rfbC* estão a jusante do gene *galE* (que codifica para UDP-D-glucose 4-epimerase) e *rfbG* (que codifica para CDP-D-glucose 4,6-dehidratase)(Fig. 9). O gene *galE* participa da biossíntese de UDP- D-galactose, e o gene *rfbG* da biossíntese de CDP-abequose, ambos monossacarídeos encontrados na cápsula de diversas bactérias. As regiões intergênicas são muito curtas, com *rfbB* e *rfbC* sobrepostos por uma base, sugerindo que esses quatro genes formam um

único operon. Embora nenhum gene *rfaA* tenha sido encontrado, existe um gene 3,8 kb a jusante de *rfaC* com alta homologia a fosfo-açúcar nucleotidiltransferase (TABELA 4), cujo produto poderia catalisar a transferência do grupo TTP (timidina trifosfato) para a molécula de D-glucose-1-fosfato, primeiro passo da biossíntese de L-ramnose. Duas cópias de *rfaD* foram encontradas, a mais próxima e conservada delas foi encontrada a 36,3 kb de distância, a montante dos outros genes *rfa*. A proteína codificada pela segunda cópia de *rfaD* apresentou máximo de 34% de identidade com RfaD de outros organismos, e sua distância aos demais *rfa* não pôde ser determinada.

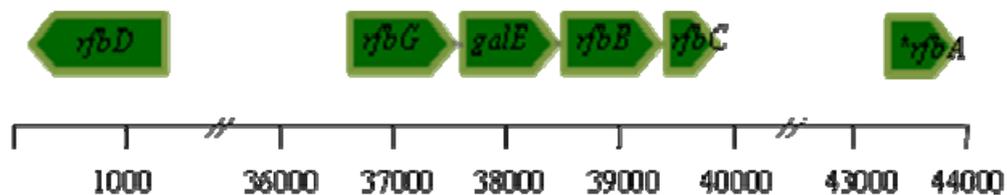


FIGURA 9 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES *rfa* EM *H. seropedicae*. Valores expressos em números de bases. *provável ortólogo de *rfaA*. A segunda cópia de *rfaD* não foi representada por não ter sido determinada sua distância física dos demais genes.

Análises com o software STRING (SNEL *et al.*, 2000) mostraram que a organização *rfaGgalErfbaBC* é única entre Proteobacteria. A organização gênica mais comum dos genes microbianos de biossíntese de ramnose é *rfaBDAC*. Em muitos microrganismos os genes da biossíntese de ramnose encontram-se em um agrupamento gênico juntamente com genes das vias de biossíntese de antígeno-O, como glicosiltransferases, sistemas de transporte de açúcares tipo ABC, genes de

biossíntese de monossacarídeos, antígeno-O polimerase, antígeno-O flipase e outros genes relacionados (REEVES & WANG, 2006). Em *H. seropedicae*, estes genes encontram-se dispersos no genoma, formando pequenos operons, assim como *rfbGgalErfbBC*.

Para determinar a importância dos genes *rfb* na biossíntese do LPS em *H. seropedicae* e na interação deste endófito com o hospedeiro vegetal, foram construídas estirpes mutantes por recombinação homóloga.

4.2. OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES *H. seropedicae* RAMEB-B E RAMEB-C

A estratégia utilizada para a obtenção destes mutantes foi a recombinação homóloga. O plasmídeo HS06-FP-00-000-008.D02 (Genopar), que contém os genes *rfbB* e *rfbC* clonados no sítio *SmaI* do vetor pUC19, foi utilizado em uma reação de transposição *in vitro* utilizando o transposon EZ::Tn5™ <TET1> (o qual confere resistência a tetraciclina). Após análise de restrição e sequenciamento foram selecionados dois plasmídeos, um deles continha o transposon inserido na base 732 no gene *rfbB* (nomeado *prfbBTET1*) e o outro na base 351 do gene *rfbC* (nomeado *prfbCTET1*). Os plasmídeos *prfbBTET1* e *prfbCTET1* foram digeridos com a enzima *Scal* (posição 2177 do vetor pUC19) e um fragmento de DNA que confere resistência a canamicina (*nptI*) foi inserido nesta posição. Desta forma, foram gerados os plasmídeos pRAMEB-B e pRAMEB-C, que expressam genes de

resistência à tetraciclina (pela inserção do transposon no gene) e canamicina (pelo gene *nptI* no vetor), permitindo assim a futura seleção dos duplos recombinantes. Com a transformação destas construções na estirpe selvagem de *H. seropedicae* (SmR1), ocorreu o fenômeno de permuta, gerando estirpes com o gene mutado. Os duplos recombinantes foram isolados por seleção negativa (resistência à tetraciclina e sensibilidade à canamicina), e a inserção do transposon no genoma foi confirmada por *Southern blot* (Fig. 10). O DNA genômico da estirpe selvagem de *H. seropedicae*, digerido com a enzima *SmaI*, apresentou sinal de hibridização dos genes *rfbB* e *rfbC* de 8,7 kb, conforme previsto em análises *in silico*. Na estirpe mutante *rfbB*⁻, o sinal de hibridização foi de 5,8 kb, referente à inserção do cassete *EZ:Tn5<TET1>* no gene *rfbB*. Esta inserção cria um sítio adicional de restrição da enzima *SmaI*, diminuindo o tamanho do fragmento que contém o gene *rfbB* em 2,9 kb. Na estirpe mutante *rfbC*⁻, o sinal de hibridização foi de 5kb, referente à inserção do cassete *EZ:Tn5<TET1>* no gene *rfbC*. Esta inserção cria um sítio adicional de restrição da enzima *SmaI*, diminuindo o tamanho do fragmento que contém o gene *rfbC* em 3,7 kb. Da mesma forma, o DNA genômico da estirpe selvagem de *H. seropedicae*, digerido com a enzima *SacI*, apresentou sinal de hibridização dos genes *rfbB* e *rfbC* de 7,2 kb, conforme previsto em análises *in silico*. Na estirpe mutante *rfbB*⁻, o sinal de hibridização foi de 4kb, referente à inserção do cassete *EZ:Tn5<TET1>* no gene *rfbB*. Esta inserção cria um sítio adicional de restrição da enzima *SmaI*, diminuindo o tamanho do fragmento que contém o gene *rfbB* em 3,2kb. Na estirpe mutante *rfbC*⁻, o sinal de hibridização foi de 3,5kb, referente à inserção

do cassete *EZ:Tn5<TET1>* no gene *rfbC*. Esta inserção cria um sítio adicional de restrição da enzima *SmaI*, diminuindo o tamanho do fragmento que contém o gene *rfbC* em 3,7kb. Os mutantes, após terem sua espécie confirmada por sequenciamento do gene 16S rDNA, foram nomeados *H. seropedicae* RAMEB-B (*rfbB*⁻) e RAMEB-C (*rfbC*⁻).

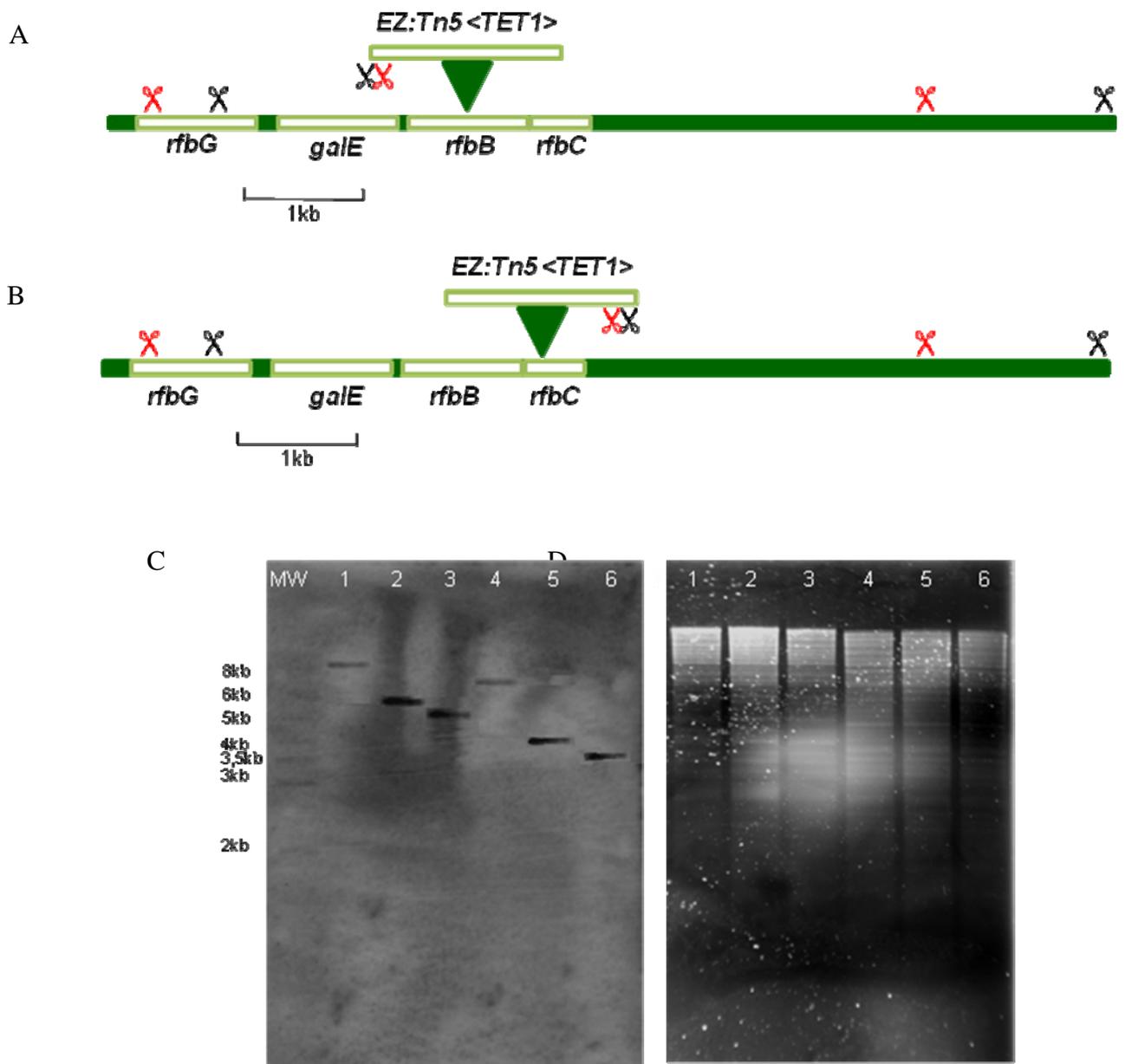


FIGURA 10 – PERFIL DE HIBRIDIZAÇÃO DOS GENES *rfbB* E *rfbC* NAS ESTIRPES SELVAGEM E MUTANTES DE *H. seropedicae*. A e B: esquema do mapa de restrição da região genômica dos genes *rfb* e inserção do transposon nos genes *rfbB* (A) e *rfbC* (B), no qual (✂) representa sítios de restrição da enzima *Sma*I e (✂) representa sítios de restrição da enzima *Sac*I. C: hibridização de D com a sonda HS06-FP-00-000-008.D02. D perfil eletroforético do DNA total das estirpes digerido com *Sma*I (1, 2 e 3) ou *Sac*I (4, 5 e 6). MW: Marcador de peso molecular (1kb); 1 e 4: DNA total de *H. seropedicae* SmR1; 2 e 5: DNA total de *H. seropedicae rfbB*; 3 e 6: DNA total de *H. seropedicae rfbC*.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO LPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*

SDS-PAGE foi utilizado para determinar o perfil do LPS das estirpes de *H. seropedicae* (Fig. 11). As estirpes mutantes *rfbB* e *rfbC* apresentaram diferentes perfis de LPS quando comparadas à estirpe selvagem, crescidas em meio NFbHPN. O perfil da estirpe selvagem apresentou intensas bandas de baixa massa molecular (BMM) e uma série de bandas de alta massa molecular (AMM) em padrão de degraus. Comparações com perfis de LPS conhecidos de outras bactérias sugerem que as bandas de BMM correspondem ao lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central, e as bandas de AMM às moléculas completas de LPS com diferentes números de unidades de antígeno-O (CARLSON, 1984; BRAUN *et al.*, 2005). O LPS das estirpes mutantes não apresentaram o antígeno-O, e a porção de lipídeo-A ligada ao oligossacarídeo central apresenta um deslocamento eletroforético quando comparada ao da estirpe selvagem.

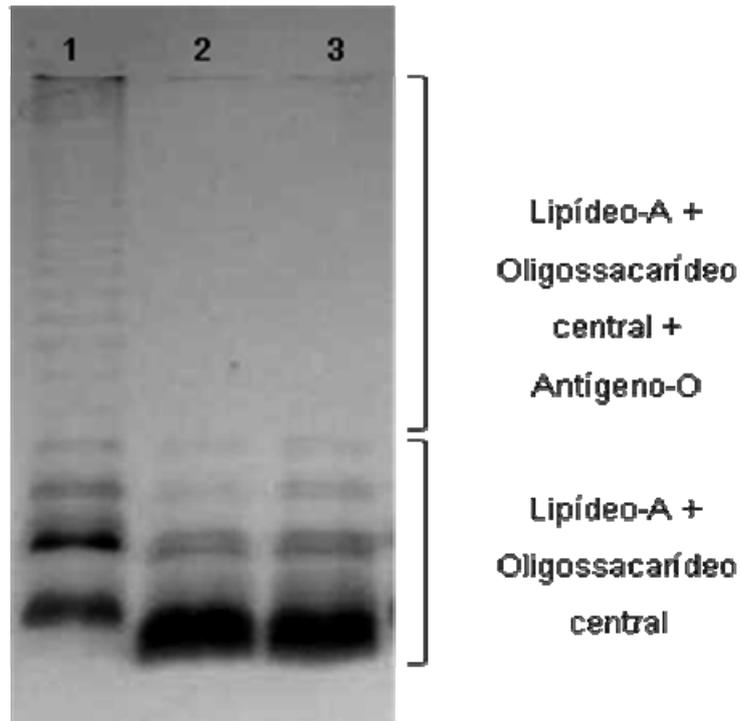


FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO LPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*. A análise foi realizada por SDS-PAGE do LPS total extraído pelo método de proteinase K/SDS da estirpe selvagem (linha 1) e das estirpes mutantes *rfbB* (linha 2) e *rfbC* (linha 3).

Análises da composição de monossacarídeos por GC-MS da cadeia oligossacarídica do LPS da estirpe selvagem de *H. seropedicae* revelaram a presença de L-ramnose como principal açúcar (35,9%), seguido por N-acetil D-glucosamina e D-glucose (TABELA 5, modificada de SERRATO 2008). Este resultado demonstra que L-ramnose é o principal constituinte do antígeno-O de *H. seropedicae*. Por outro lado, na cadeia oligossacarídica do LPS das estirpes mutantes *rfbB* e *rfbC*, heptose e D-galactose foram os açúcares quantitativamente predominantes (TABELA 5). Como esperado, ramnose não estava presente na

porção oligossacarídica do LPS das estirpes mutantes, e também se observou a ausência de N-acetil glucosamina.

TABELA 5. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO LPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*.

Composto	Razão dos derivados de per-O-TMS		
	Selvagem	<i>rfbB</i> ⁻	<i>rfbC</i> ⁻
L-ramnose	35,9	ND	ND
4-N- L-arabinose	2,1	7.3	7.6
D-manose	ND	2.8	3.4
D-galactose	ND	24.7	26.6
N-acetil D-quinovosamina	ND	4.8	5.1
D-glucose	27,5	ND	ND
D-heptose	ND	60.5	57.3
Ácido 3-deoxi- D-mano- oct-2-ulopiranosônico	6,2	ND	ND
N-acetil D-glucosamina	28,2	ND	ND

ND = não detectado. Composições estão expressas como porcentagem do total de carboidratos detectados representados por cada uma das porções de açúcar. Modificado de SERRATO (2008).

Estes resultados mostram que as mutações nos genes *rfbB* ou *rfbC* alteram drasticamente a composição química do LPS de *H. seropedicae*. Em *Pseudomonas aeruginosa*, ramnose liga o oligossacarídeo central ao antígeno-O, e a estirpe

mutante *rfbC* deste organismo sintetiza um oligossacarídeo central truncado que é incapaz de atuar como ponto de adesão para o antígeno-O (RAHIM *et al.*, 2000). Uma função similar para ramnose em *H. seropedicae* poderia causar a observada reorganização estrutural nas estirpes mutantes.

Quando as estirpes mutantes foram crescidas com L-ramnose com única fonte de carbono, o fenótipo de LPS tipo selvagem não foi reestabelecido, indicando que este monossacarídeo é incorporado no LPS somente quando é biossintetizado pela via *rfb*.

Para investigar se estas modificações tiveram consequências biológicas, foram realizados ensaios de colonização em milho, avaliando a capacidade endofítica das estirpes.

4.4. FENÓTIPO DA COLONIZAÇÃO DE MILHO POR *H. seropedicae* RAMEB-B, RAMEB-C e SmR1.

4.4.1. Adesão e colonização de raízes de milho pelas estirpes de *H. seropedicae*.

Ensaio *in planta* foram realizados para comparar a capacidade de associação endofítica das estirpes mutantes *rfbB* e *rfbC* com a da estirpe selvagem. Plântulas de milho de três dias de idade foram parcialmente imersas em uma suspensão de células das estirpes de *H. seropedicae*. Após trinta minutos, as

plântulas foram lavadas por imersão em solução salina estéril para remoção de bactérias não aderidas. As raízes foram então cortadas, pesadas e vortexizadas vigorosamente por 20 segundos em 1 mL de solução salina estéril. O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz. O número de células de *H. seropedicae* SmR1 aderidos à superfície de raiz de milho foi aproximadamente 100 vezes maior que o número de células mutantes (Fig. 12). Com o intuito de investigar se as mutações na biossíntese de ramnose influenciariam a colonização de tecidos internos, o número de bactérias endofíticas foi determinado após 1, 4, 7 e 10 dias da inoculação no hospedeiro (Fig. 12). Novamente, a estirpe selvagem colonizou os tecidos internos mais eficientemente: 24 horas depois da inoculação o número de bactérias da estirpe selvagem era 100 vezes maior que o de mutantes, diferença esta mantida nos dias subsequentes.

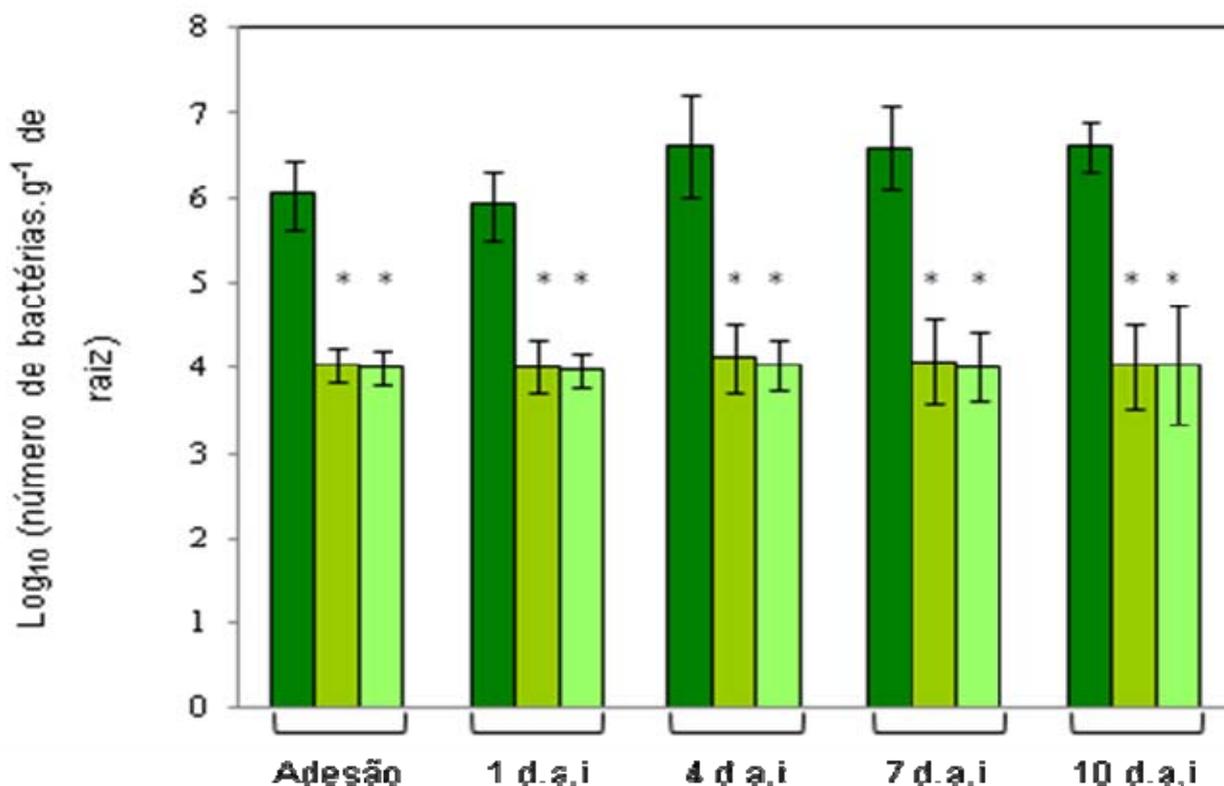


FIGURA 12 - COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE MILHO PELAS ESTIRPES *H. seropedicae* SELVAGEM SmR1 (BARRAS VERDE ESCURO), MUTANTE *rfbB* (BARRAS VERDE AMARELADO) E *rfbC* (BARRAS VERDE CLARO). Para avaliação da adesão das estirpes de *H. seropedicae* à superfície radicular, 10^5 células de *H. seropedicae* foram inoculadas por planta, e as bactérias que se mantiveram aderidas à planta após lavagem foram removidas por agitação vigorosa em vórtex e quantificadas. Para avaliação da colonização dos tecidos radiculares internos, 10^5 células de *H. seropedicae* foram inoculadas por planta de milho, e 1, 4, 7 e 10 dias após inoculação (d.a.i), as raízes tiveram sua superfície esterilizada e então foram homogeneizadas. As bactérias que colonizaram os tecidos internos da raiz foram então quantificadas. Resultados mostrados como média do Log₁₀ (número de bactérias.g⁻¹ de raiz) ± desvio padrão. (*) Valores estatisticamente diferentes dos valores da estirpe selvagem (P<0,01; teste de múltiplas classes de Duncan).

Esses resultados mostram que a mutação na via de biossíntese de ramnose diminuiu a capacidade de *H. seropedicae* aderir à superfície radicular e colonizar os tecidos internos de plântulas de milho. Uma vez que a mutação em *rfbB* ou *rfbC* alterou drasticamente a composição e estrutura do LPS, é provável que esta molécula seja requerida para a colonização do hospedeiro vegetal por *H. seropedicae*. Foram realizadas diversas tentativas de complementação das estirpes mutantes utilizando variadas estratégias, contudo não

4.4.2. Competição pela colonização de raízes de milho entre as estirpes de *H. seropedicae*

As estirpes mutantes apresentaram capacidade de colonização diminuída em relação à estirpe selvagem quando inoculadas separadamente em milho (Fig. 12). Essas estirpes provavelmente utilizam os mesmos mecanismos moleculares para interação com o hospedeiro, portanto algum destes mecanismos foi alterado nas estirpes mutantes. Desta forma, experimentos de coinoculação mostrariam competição entre elas para a colonização da planta. *H. seropedicae* RAM4, uma estirpe que expressa constitutivamente a proteína fluorescente ds-RED, foi utilizada nestes experimentos para possibilitar a diferenciação das estirpes bacterianas inoculadas. O padrão de colonização desta estirpe é idêntico ao da estirpe selvagem SmR1 (MONTEIRO *et al.*, 2008). Plântulas de milho foram inoculadas separada ou simultaneamente com as estirpes *H. seropedicae* RAM4 e RAMEBB

(*rfbB::EZTn5<TET1>*), em diferentes proporções (em um total de 10^5 UFC.mL⁻¹) e o número de células de cada estirpe aderida ou colonizando os tecidos internos foi determinado.

Quando as estirpes RAM4 e RAMEBB foram coinoculadas em uma proporção de inóculo de 1:1, o número de células de RAM4 aderidas foi idêntico na presença ou na ausência da estirpe competidora mutante, e similar ao da estirpe selvagem SMR1 (Fig. 12). Por outro lado, o número de células de RAMEBB aderidas foi 50 vezes menor do que quando as estirpes foram inoculadas separadamente (comparar Fig. 13B com Fig. 13A); e cerca de 1000 vezes menor que o da estirpe RAM4 coinoculada. A estirpe mutante RAMEBB também foi menos competitiva que a estirpe RAM4 para colonização de tecidos internos: o número de células mutantes nos tecidos internos de milho foi novamente cerca de 1000 vezes menor do que o de RAM4 após 1, 4, 7 ou 10 dias quando as estirpes foram coinoculadas (Fig. 13B). Comparado à colonização interna quando apenas a estirpe mutante foi inoculada, a competição com a estirpe RAM4 reduziu a contagem de RAMEBB 50 vezes. A colonização de tecidos internos por RAM4 também foi idêntica na presença ou ausência da estirpe competidora.

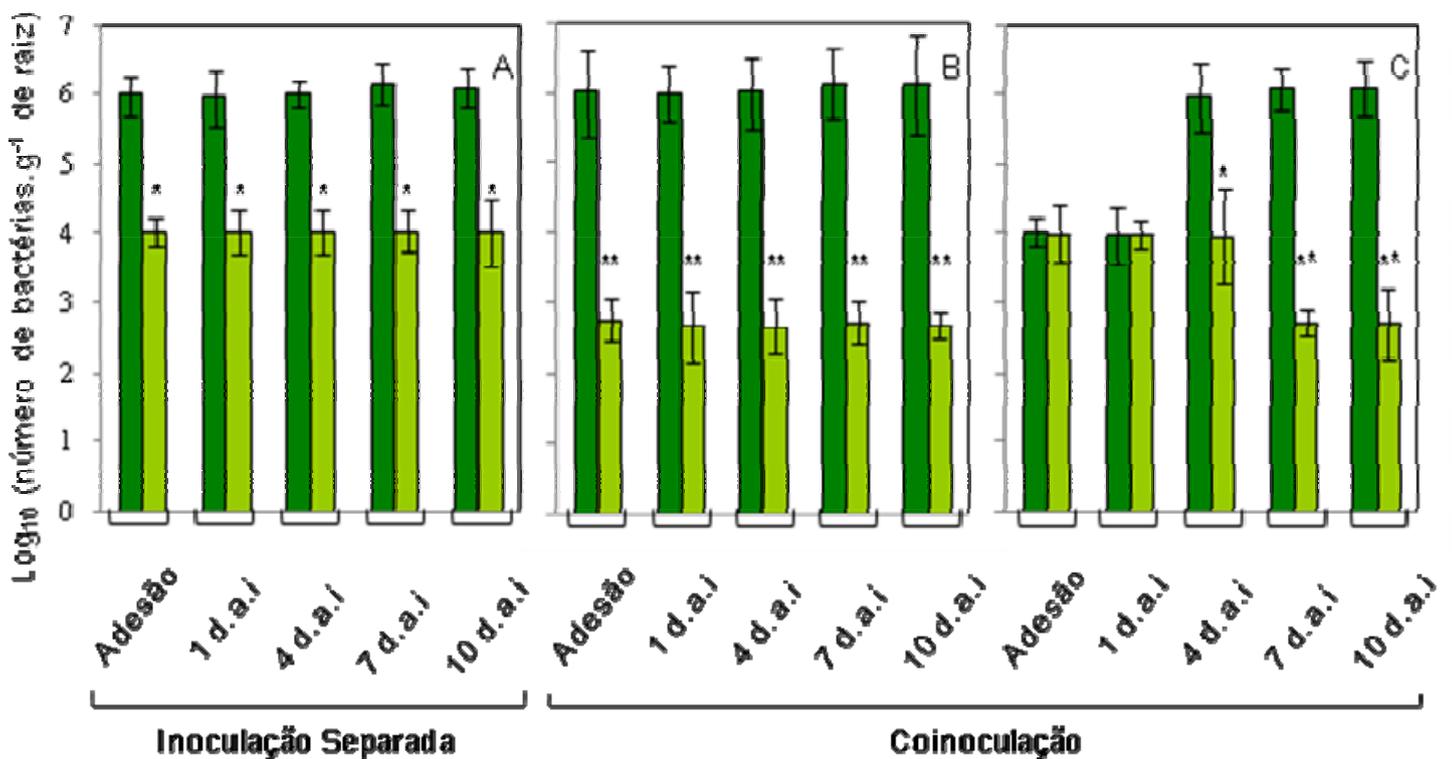


FIGURA 13 - COMPETIÇÃO ENTRE *H. seropedicae* RAM4 (BARRAS VERDE ESCURO) E RAMEBB (BARRAS VERDE AMARELADO) PELA COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE PLÂNTULAS DE MILHO. (A) As estirpes foram inoculadas separadamente em milho e a colonização foi acompanhada ao longo do tempo. (B) As estirpes foram coinoculadas na proporção de 1:1 em milho e a colonização foi acompanhada ao longo do tempo. (C) Mesmo que B, mas a proporção 100:1 de RAMEBB:RAM4 foi utilizada para inocular as plântulas de milho. Resultados mostrados como média do Log₁₀ (número de bactérias.g⁻¹ de raiz) ± desvio padrão. Um asterisco indica diferença significativa em P<0,01 (teste de múltiplas classes de Duncan) entre as estirpes competidoras. Dois asteriscos indicam diferença significativa em P<0,01 (teste de múltiplas classes de Duncan) entre a colonização da estirpe mutante quando inoculada separadamente e quando é coinoculada.

Quando uma proporção de 100:1 células de RAM4:RAMEBB foi utilizada para inocular plântulas de milho, não foram recuperadas células da estirpe mutante da superfície radicular nem dos tecidos vegetais internos. Novamente, a adesão e a colonização dos tecidos internos pela estirpe RAM4 foram similares na presença ou ausência da estirpe competidora (dados não mostrados).

Quando RAM4:RAMEBB foram inoculadas na proporção de 1:100 (Fig. 13C), o número de células aderidas à superfície radicular de milho foi similar para ambas estirpes. Um dia após inoculação, o número de células bacterianas colonizando a raiz internamente também foi similar para ambas as estirpes. Entretanto, 4 dias após inoculação o número de células RAM4 alcançou $10^6 \cdot g^{-1}$ de raiz, que é cerca de 100 vezes maior que o da estirpe mutante coinoculada. Nos dias subsequentes, o número de células RAM4 continuou no mesmo nível, em contraste, o número de células RAMEBB diminuiu, ficando 1000 vezes menor que o de RAM4. É interessante notar que o número de células mutantes foi menor 7 e 10 dias após inoculação quando coinoculado com RAM4 do que quando inoculado separadamente. Neste experimento, o número de células mutantes aderidas à raiz de milho é igual ao número de células selvagens. Nesta situação, a capacidade diminuída de adesão da estirpe mutante não interfere nos próximos passos da colonização. Desta forma, a análise da colonização dos tecidos internos mostra um claro declínio na capacidade endofítica da estirpe mutante, provavelmente derivado das alterações estruturais no LPS.

Estes resultados revelaram que o defeito na biossíntese de ramnose diminuiu consideravelmente a competitividade de *H. seropedicae*. Ser competitiva é uma característica indispensável para rizobactérias em seu nicho, onde a competição para colonizar plantas é muito alta.

4.4.3. Adesão das estirpes de *H. seropedicae* a uma matriz inerte.

Para testar se o fenótipo de adesão das estirpes mutantes *rfbB* e *rfbC* foi específico para a superfície radicular, também foram realizados ensaios de adesão a uma matriz de fibra de vidro. Sob as condições testadas, não foi observada diferença de adesão à matriz de vidro entre a estirpe selvagem e as mutantes (Fig. 14), sugerindo que a redução na adesão às raízes de milho depende do reconhecimento do hospedeiro, e que um componente importante desse reconhecimento foi alterado nas estirpes mutantes, mais provavelmente o LPS.

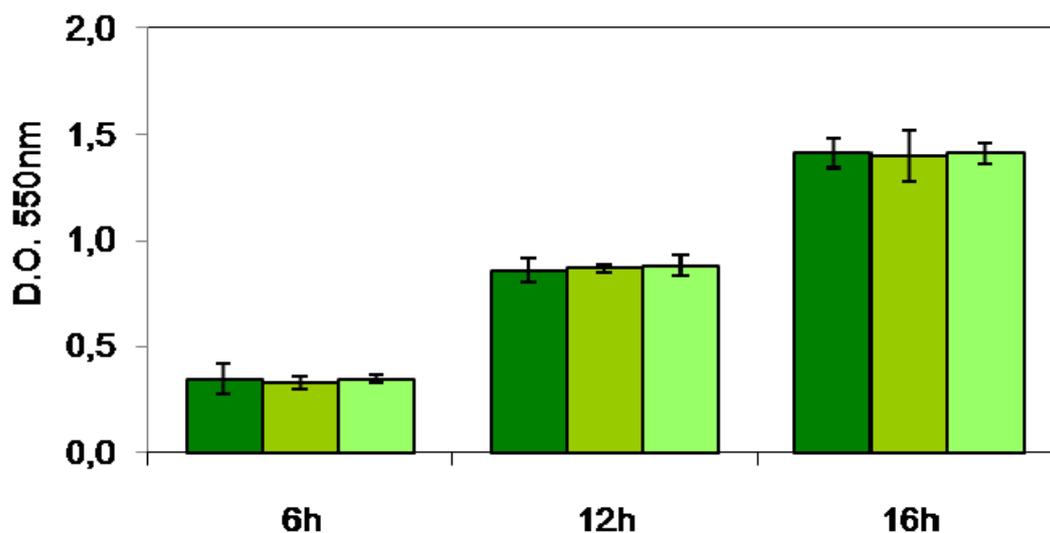


FIGURA 14 - ADESÃO DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* À MATRIZ DE FIBRA DE VIDRO. Após crescimento bacteriano em meio NFbHPN com fibra de vidro, a matriz foi removida, e as bactérias aderidas a ela coradas com violeta cristal. A amostra foi então descorada com etanol absoluto e a absorbância deste mensurada a 550nm. Valores expressos como DO_{550} das amostras subtraída da DO_{550} de uma matriz de fibra de vidro corada sem bactérias.

4.4.4. A adesão de *H. seropedicae* à superfície radicular de milho é inibida por D-glucosamina e LPS purificado.

Os resultados dos experimentos anteriores sugeriram o envolvimento do LPS na adesão, colonização dos tecidos radiculares internos e competição pela colonização de milho. Para testar a hipótese de que as alterações no LPS das estirpes mutantes foram responsáveis pela diminuição na adesão à raiz de milho, ensaios de adesão foram realizados utilizando LPS purificado da estirpe selvagem (1 mg de equivalente em D-glucose.mL⁻¹) como competidor durante incubação das

bactérias com as plântulas de milho. Nesta condição, a adesão da estirpe selvagem diminuiu para níveis similares aos das estirpes mutantes, enquanto a adesão das estirpes mutantes não foi afetada (Fig. 15). Em contraste, quando LPS isolado da estirpe mutante *rfbB* foi utilizado como competidor, não foram observadas diferenças na adesão das estirpes, confirmando que o LPS selvagem é requerido para bloquear os pontos de adesão na superfície radicular de milho.

Para determinar quais monossacarídeos do LPS estão envolvidos na ligação à superfície radicular da planta, foram realizados ensaios de adesão utilizando um excesso de diversos monossacarídeos como competidores. Apenas glucosamina e N-acetil glucosamina (1 mg.mL^{-1}) foram capazes de reduzir a adesão da estirpe selvagem para níveis similares aos das estirpes mutantes, enquanto a adesão das estirpes mutantes não foi afetada por nenhum açúcar (fig. 15). O ensaio de adesão também foi realizado utilizando uma concentração menor de N-acetil glucosamina ($10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nesta concentração biologicamente relevante, a adesão da estirpe selvagem também foi reduzida para níveis similares aos das estirpes mutantes, enquanto a adesão destas não foi afetada. Estes resultados suportam firmemente o envolvimento de N-acetil glucosamina na adesão de *H. seropedicae* às raízes de milho.

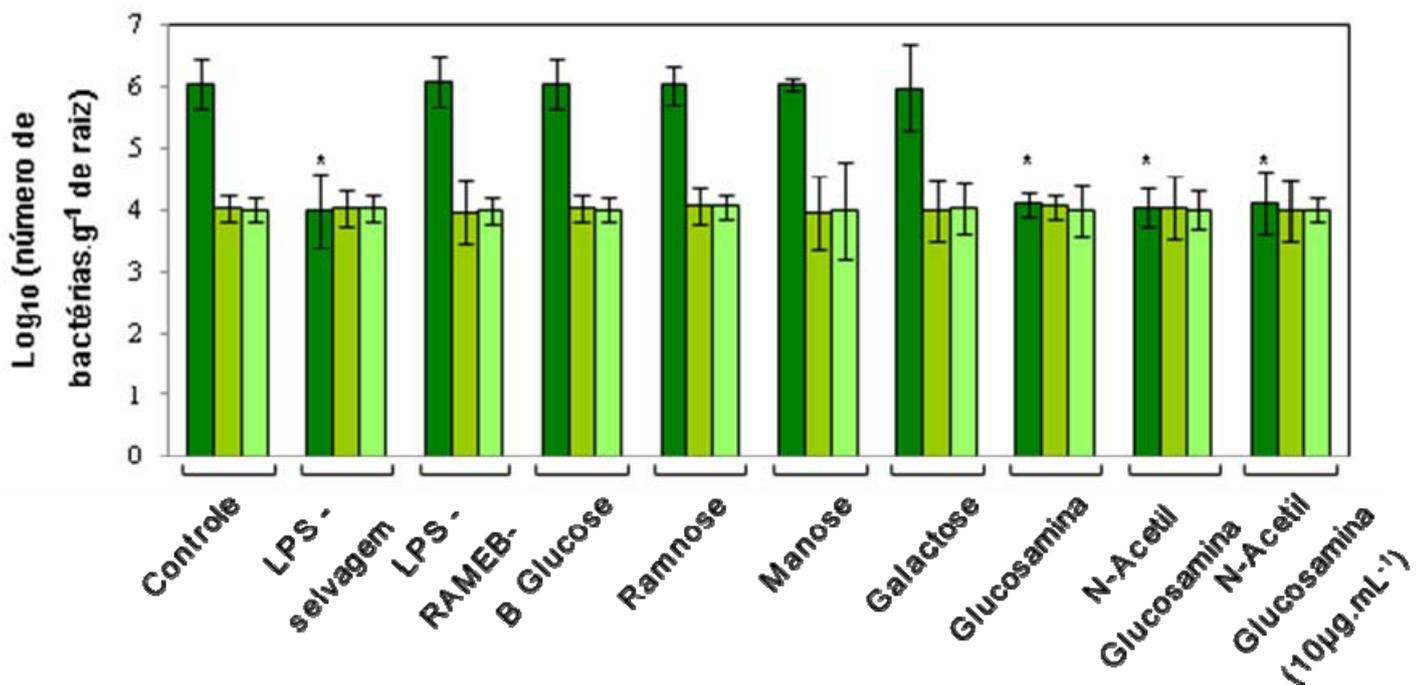


FIGURA 15 - LPS PURIFICADO DE *H. seropedicae* INIBE ADESÃO À SUPERFÍCIE RADICULAR DE MILHO. Os compostos foram adicionados no momento do inóculo das plântulas de milho com *H. seropedicae* selvagem (barras verde escuro), e mutantes *rfbB* (barras verde amarelado) e *rfbC* (barras verde claro). Os monossacarídeos foram adicionados a 1mg.mL⁻¹ e o LPS purificado a 1mg de equivalente em glucose.mL⁻¹. Resultados mostrados como média do Log₁₀ (número de bactérias.g⁻¹ de raiz) ± desvio padrão. Asterisco indica diferença significativa em P<0,01 (teste de múltiplas classes de Duncan) entre adesão da estirpe selvagem à raiz de milho quando na presença ou ausência do composto competidor.

O fato de que o número de células da estirpe selvagem aderidas às raízes foi similar ao número de células aderidas das estirpes mutantes quando LPS selvagem, N-acetil D-glucosamina ou D-glucosamina foram utilizados como competidores corrobora a hipótese de que as alterações no LPS são responsáveis

pelas diferenças fenotípicas observadas nos mutantes *rfb*. Os resultados sugerem que o LPS de *H. seropedicae* participa na adesão da bactéria possivelmente ancorando-a em receptores vegetais por seus resíduos de N-acetil D-glucosamina. Uma vez que o LPS das estirpes mutantes não apresenta este monossacarídeo (Tabela 5), a adesão dessas estirpes à superfície radicular do hospedeiro é menor, não sendo alterada pela adição de competidores. Além disso, o LPS parece ter um envolvimento específico na adesão de *H. seropedicae* às raízes do hospedeiro, uma vez que a adesão à matriz de fibra de vidro não foi alterada pelas mutações.

4.5. MUTAÇÃO DOS GENES *rfbB* OU *rfbC* DIMINUEM A RESISTÊNCIA DE *H. seropedicae* À SDS, POLIMIXINA B E À METABÓLITOS VEGETAIS.

Uma vez que mudanças na estrutura do LPS geralmente resultam no aumento da sensibilidade à peptídeos catiônicos, antibióticos, detergentes e outros estresses químicos (CAMPBELL *et al.*, 2002; LEROUGE e VANDERLEYDEN, 2001; JOFRÉ *et al.*, 2004), a sensibilidade das estirpes mutantes à polimixina B, SDS e aos compostos de origem vegetal naringenina, quercetina e ácido salicílico foi testada.

As estirpes mutantes *rfbB* e *rfbC* foram muito sensíveis à SDS. Concentrações de 0,5% aboliram completamente o crescimento dos mutantes em meio LA, enquanto o crescimento da estirpe selvagem não foi afetado por

concentrações de até 1% (Fig. 16A). Este efeito também foi observado em estirpes mutantes *rfb* de *Azospirillum brasilense* (JOFRÉ *et al.*, 2004).

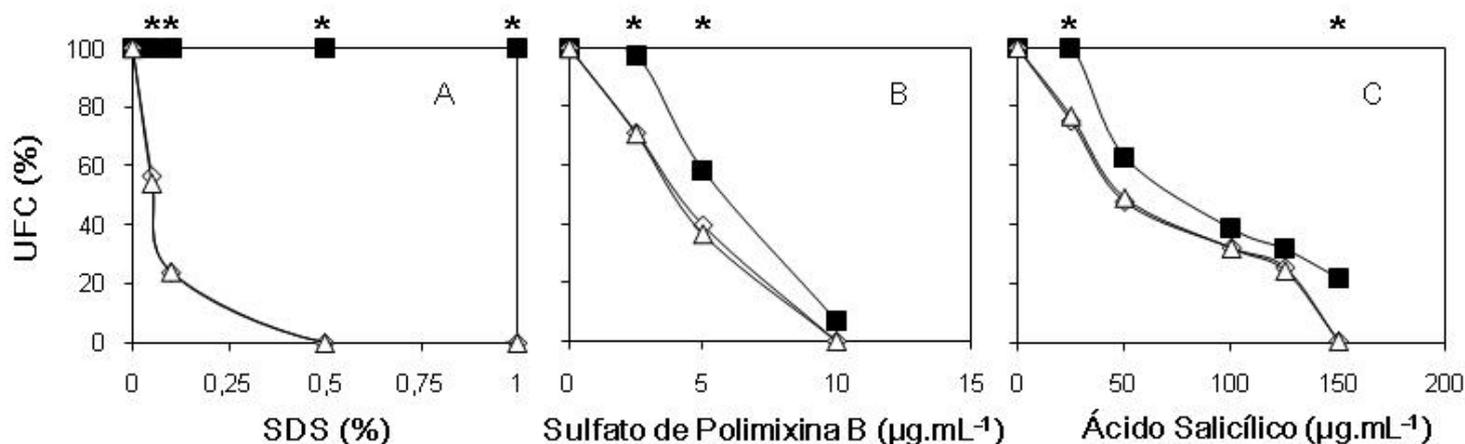


FIGURA 16 - SENSIBILIDADE DAS ESTIRPES *H. seropedicae* SELVAGEM (QUADRADOS PRETOS), *rfbB* (LOZANGOS) E *rfbC* (TRIÂNGULOS) AO ESTRESSE QUÍMICO. Números iguais de células (aproximadamente 100 – 1000) foram espalhados em placas de meio de cultura sólido na presença de concentrações variáveis de SDS (A), sulfato de polimixina B (B) e ácido salicílico (C). O meio LA foi utilizado para os testes de resistência a SDS; e NFbHPN sólido foi utilizado para testar os outros compostos. Após 24-48h de incubação à 30°C, o número de unidades formadoras de colônias foi determinado. Os resultados são mostrados como porcentagem de unidades formadoras de colônias relativa ao número de colônias crescidas na ausência dos compostos testados, e representam a média de três experimentos independentes. Asteriscos indicam diferença significativa ($P < 0,05$; teste t de Student) entre a porcentagem de bactérias selvagens resistentes e mutantes.

Peptídeos catiônicos antimicrobianos exibem uma afinidade intrínseca pela carga negativa da membrana externa bacteriana, alterando sua permeabilidade

(FREER *et al.* 1996). Os resultados mostraram que a mutação em *rfb* aumentou a sensibilidade de *H. seropedicae* ao peptídeo catiônico polimixina B (Fig. 16B), sugerindo que o LPS intacto tem um efeito protetor contra este antibiótico.

O ácido salicílico, um metabólito fenólico vegetal, é uma molécula sinal chave na regulação da defesa vegetal em resposta a uma grande variedade de patógenos (MARTÍNEZ-ABARCA *et al.*, 1998; PRITHIVIRAJ *et al.*, 2005; STACEY *et al.*, 2006). Após infecção, o ácido salicílico dispara tanto uma resposta localizada como uma resposta sistêmica na qual a planta adquire resistência ao patógeno (DURRANT e DONG, 2004). O ácido salicílico pode também agir como um agente bactericida (PRITHIVIRAJ *et al.*, 2005). Os resultados revelaram que os genes *rfbB* e *rfbC* são necessários para a resistência de *H. seropedicae* a pequenas concentrações de ácido salicílico (até 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Fig. 16C), similar às concentrações acumuladas nos locais de infecção bacteriana em plantas (16-23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (HUANG *et al.*, 2006). Se o LPS agiu como uma barreira ao ácido salicílico, prevenindo sua entrada na bactéria, o LPS truncado das estirpes mutantes poderia presumivelmente torna-las mais sensíveis a este composto.

Muitos flavonoides de origem vegetal também apresentam atividade bactericida (XU e LEE, 2001). A exposição das estirpes de *H. seropedicae* a diversas concentrações de naringenina e quercetina (até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) não mostrou efeitos negativos na viabilidade destas.

O fato de as estirpes mutantes *rfbB* e *rfbC* serem mais sensíveis a alguns compostos, inclusive a metabólitos da defesa basal da planta, poderia explicar em

parte a diminuição da capacidade de colonização dos tecidos radiculares internos e da competitividade em relação à estirpe selvagem.

4.6. EFEITOS PLEIOTRÓPICOS DAS MUTAÇÕES EM *rfbB* OU *rfbC* DE *H. seropedicae*

A mutação dos genes responsáveis pela biossíntese de monossacarídeos capsulares é geralmente correlacionada com alterações na motilidade, taxa de crescimento e modificações na produção de exopolissacarídeos (ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2008). Essas características, que provavelmente desempenham importantes funções durante a colonização do hospedeiro vegetal, também foram avaliadas nas estirpes mutantes.

4.6.1. Avaliação da motilidade das estirpes RAMEB-B, RAMEB-C e selvagem de *H. seropedicae*.

Para avaliar a motilidade, as estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae* foram inoculadas no centro de um tubo de vidro, o qual estava parcialmente imerso em meio NFbHPN contendo 0,5% de ágar (Fig. 17). Em 6 horas, ocorre intenso crescimento bacteriano no menisco de meio de cultura do interior do tubo de vidro, seguido de deslocamento das bactérias em busca de nutrientes. O caminho deste deslocamento é direcionado para o fundo do frasco de

cultivo pelo tubo de vidro. Após 12-16 horas, o aerotropismo característico de *H. seropedicae* faz com que as bactérias do fundo do frasco desloquem-se para a superfície do meio de cultura circundante ao tubo de vidro, ocorrendo então formação de um biofilme após 24 horas. Este comportamento foi acompanhado para as estirpes selvagem e mutantes, e ambas mostraram o mesmo padrão de motilidade (Fig. 17).

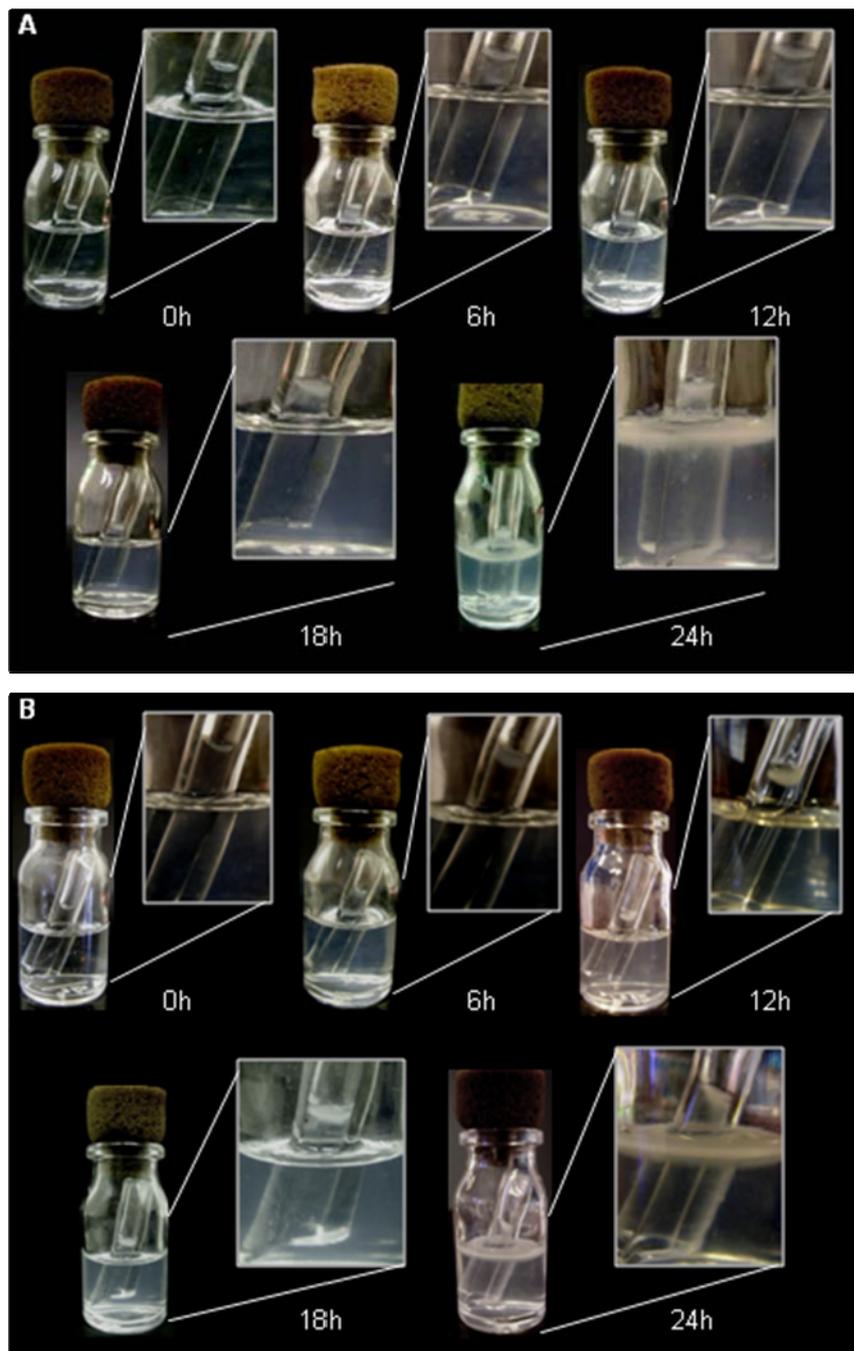


FIGURA 17 - MOTILIDADE DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* EM MEIO NFbHPN CONTENDO 0,5% ÁGAR. 10^5 células das estirpes de *H. seropedicae* foram inoculadas no centro do tubo de vidro. A cultura foi incubada a 30°C e o movimento das células para baixo no tubo de vidro e formação de um biofilme na superfície do meio circundante foram monitorados ao longo do tempo. A estirpe selvagem (A) e a estirpe mutante RAMEB-B (B) mostraram o mesmo padrão de motilidade.

4.6.2. Avaliação da taxa de crescimento das estirpes RAMEB-B, RAMEB-C e selvagem de *H. seropedicae*.

A mutação dos genes *rfbB* ou *rfbC* de *H. seropedicae* diminuem a taxa de crescimento desta bactéria em meio NFbHPN. De acordo com a curva de crescimento das estirpes (Fig. 18), a fase log de crescimento das estirpes mutantes é deslocada em relação a da estirpe selvagem. Este fato é claramente observado quando se compara a taxa máxima de crescimento das estirpes mutantes ($\mu_{\max} = 0,170 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$) com a da estirpe selvagem ($\mu_{\max} = 0,305 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$). Este decréscimo no crescimento logarítmico se reflete no tempo de geração das estirpes mutantes ($g = 4,02 \pm 0,03$), consideravelmente maior que da estirpe selvagem ($g = 2,30 \pm 0,05$).

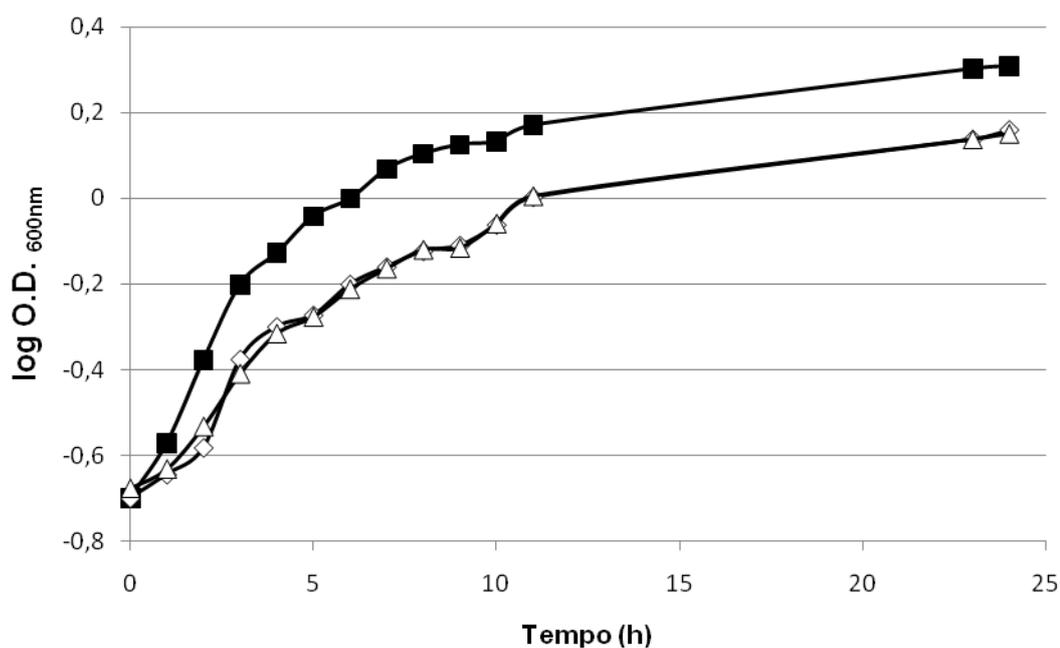


FIGURA 18 - CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* EM MEIO NFbHPN. As culturas das estirpes *H. seropedicae* SmR1 (quadrados negros); RAMEB-B (losangos) e RAMEB-C (triângulos) foram ajustadas para DO_{600nm} 0,2 e incubadas a 30°C e 120rpm.

O decréscimo observado na taxa de crescimento das estirpes mutantes poderia explicar em parte os fenótipos de colonização de tecidos vegetais internos e competitividade. Se este fosse o caso, o número de células mutantes colonizando os tecidos internos de milho deveria ser menor que o de células selvagens nos estágios iniciais, mas como o número de células por grama de tecido estabiliza, o número de células mutantes deveria progressivamente aumentar e atingir o mesmo nível da estirpe selvagem. A comparação do padrão de colonização das estirpes selvagem e mutantes ao longo do tempo não suporta esta suposição: o número de células da estirpe selvagem foi 10^6 por grama de raiz no 3° d.a.i. enquanto o das estirpes mutantes estabilizou em 10^4 até 10 d.a.i. Nos ensaios de competição, esta tendência

torna-se mais clara: quando uma razão de RAM4:RAMEBB de 1:100 foi utilizada para inocular as plântulas de milho, a estirpe selvagem alcançou 10^6 células por grama no 3° d.a.i., mas o número de mutantes continuou em 10^4 por grama, e até diminuiu para 10^3 por grama no 7° d.a.i. Estes resultados indicam que a deficiência na colonização apresentada pelas estirpes mutantes não é um simples efeito da sua menor taxa de crescimento.

4.6.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos pelas estirpes RAMEB-B, RAMEB-C e selvagem de *H. seropedicae*.

Para avaliar a produção de exopolissacarídeos, as estirpes de *H. seropedicae* foram plaqueadas em meio sólido NFbHPN contendo 0,02% de calcoflúor, e após 48 horas de crescimento, expostos à luz ultravioleta. As colônias das estirpes mutantes foram tão gomosas quanto às da estirpe selvagem (Fig. 19A). Além disso, as estirpes mutantes e selvagem mostraram intensidades de fluorescência similares sobre luz UV (Fig. 19B), indicando que a produção de exopolissacarídeos não foi afetada pela mutação em *rfb*.

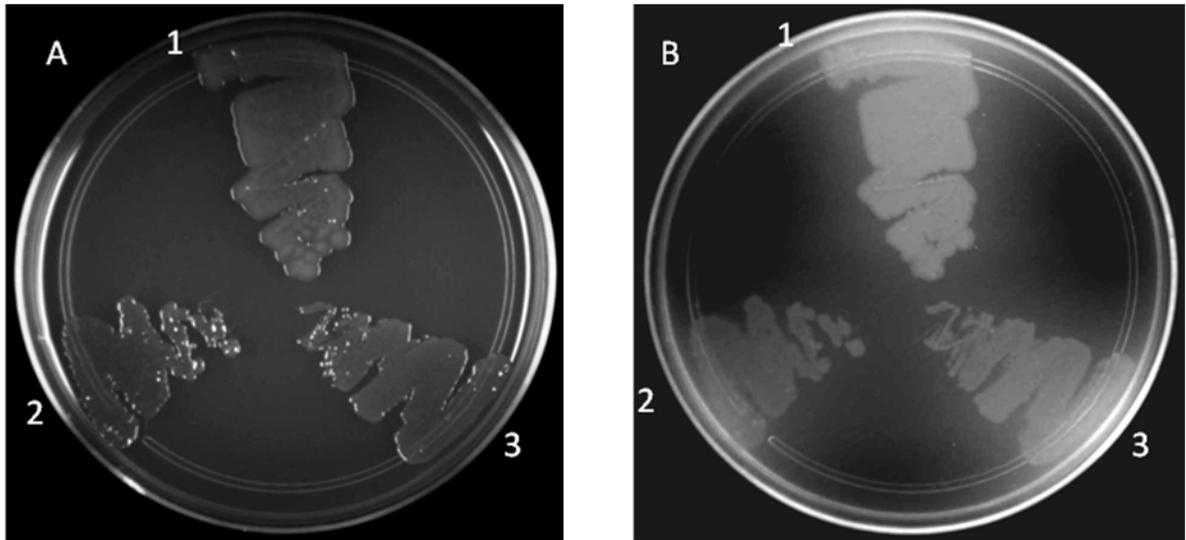


FIGURA 19 – AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELAS ESTIRPES DE *H. seropedicae*. (A) Estirpe selvagem (1), e mutantes *rfbB* (2) e *rfbC* (3) crescidas em meio NFbHPN contendo 0,02% de calcoflúor. (B) Mesmo que A, irradiado com luz UV a 365nm.

4.7. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *rfbB*.

Para determinar a regulação da expressão dos genes *rfb* foi construída a estirpe *H. seropedicae* LPEB, que carrega a fusão cromossomal *rfbB::lacZ::nptI*.

4.7.1. Obtenção da estirpe mutante *H. seropedicae* LPEB

A estratégia utilizada para a obtenção deste mutante foi a recombinação homóloga. O clone HS06-FP-00-000-008.D02 da biblioteca genômica de *H. seropedicae*, que contém os genes *rfbB* e *rfbC* no sítio *SmaI* do vetor, foi digerido

com a enzima *Bgl*I, que possui um único sítio de reconhecimento dentro do gene *rfbB*, e ligado ao cassete *lacZ::nptI* originado após a digestão do plasmídeo pKOK6.1 com a enzima *Bam*HI . A ligação do cassete e sua orientação foram confirmadas por restrição. Com a transformação desta construção na estirpe selvagem *H. seropedicae* SmR1, ocorreu o fenômeno de permuta, gerando estirpes com o gene *rfbB* fusionado ao gene repórter *lacZ*. Estas estirpes foram isoladas por resistência à canamicina e expressão do gene repórter, e a inserção do cassete *lacZ::nptI* no genoma foi confirmada por *Southern blot* (Fig. 20). O DNA genômico da estirpe selvagem de *H. seropedicae*, digerido com a enzima *Pst*I, apresentou sinal de hibridização do gene *rfbB* de 3,4kb, conforme previsto em análises *in silico*. Nas estirpes mutantes, o sinal de hibridização foi de 2,7kb, referente à inserção do cassete *lacZ::nptI* (não presente na sonda) no gene *rfbB*. Esta inserção cria um sítio adicional de restrição da enzima *Pst*I, diminuindo o tamanho do fragmento que contém o gene *rfbB* em 700pb. As estirpes mutantes sofreram recombinação homóloga dupla, pois o vetor marcado presente na sonda não hibridizou com o DNA genômico digerido destas estirpes, o que geraria um sinal de hibridização de 9,8kb. Os mutantes, após terem sua espécie confirmada por sequenciamento do gene 16S rDNA, foram nomeados *H. seropedicae* LPEB (*rfbB::lacZ::nptI*).

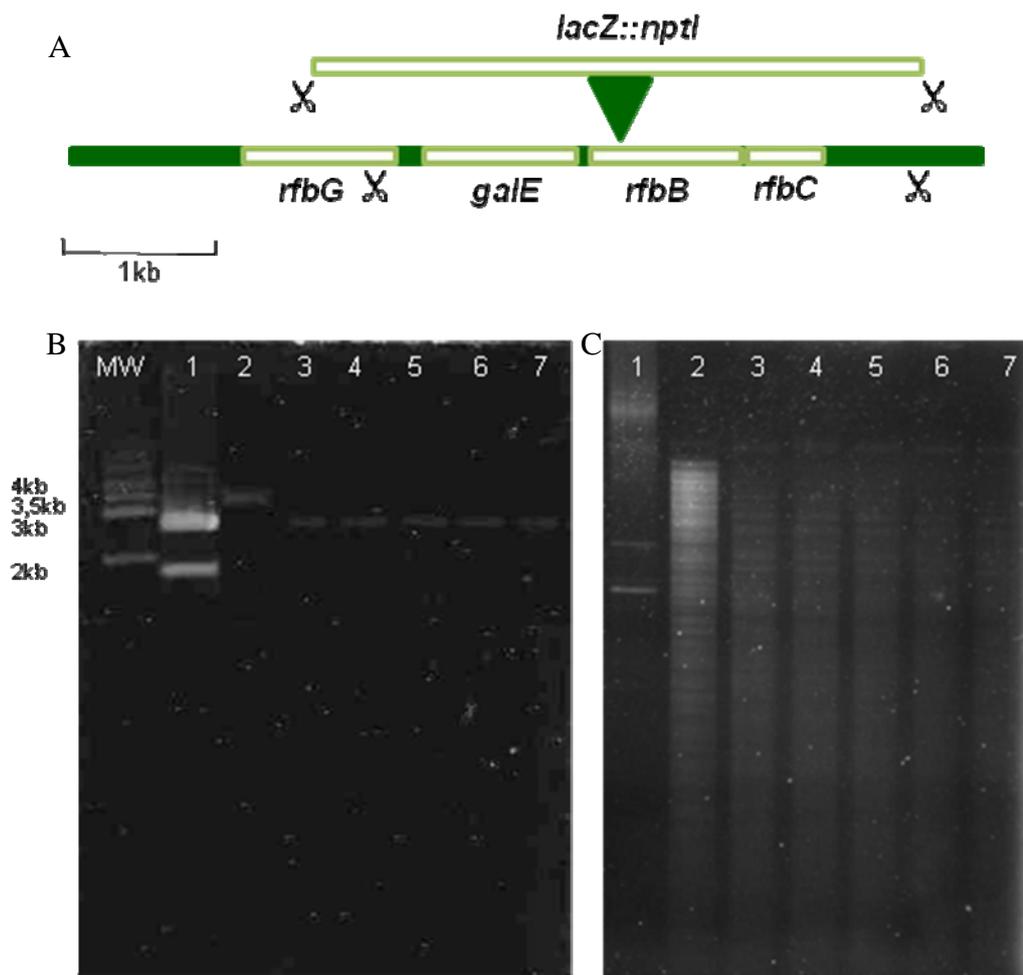


FIGURA 20 – PERFIL DE HIBRIDIZAÇÃO DO GENE *rfbB* NAS ESTIRPES SELVAGEM E MUTANTE DE *H. seropedicae*. A: esquema do mapa de restrição da região genômica dos genes *rfb*, no qual (X) representa sítios de restrição da enzima *PstI*. B: hibridização de C com a sonda HS06-FP-00-000-008.D02. C: perfil eletroforético do DNA total das estirpes digerido com *PstI*. MW: Marcador de peso molecular (1kb); 1: Plasmídeo HS06-FP-00-000-008.D02; 2: DNA total de *H. seropedicae* SmR1; 3-7: DNA total de *H. seropedicae* *rfbB::lacZ::nptI*.

4.7.2. Regulação da expressão do gene *rfbB* de *H. seropedicae*.

Uma vez que o LPS intacto é requerido para maximizar a interação de *H. seropedicae* com a planta, sua biossíntese poderia ser regulada por sinais de origem

vegetal. Em *Rhizobium* NGR234, a rizobactéria mais estudada até o momento, flavonóides exsudados por leguminosas induzem os genes de nodulação, que promovem a produção e secreção de lipoquitooligossacarídeos (fatores Nod), que por sua vez direcionam o desenvolvimento dos canais de infecção, simbiossomas e por fim os nódulos radiculares (BROUGHTON *et al.*, 2006; LE QUÉRÉ *et al.*, 2006). Esta comunicação entre *Rhizobium* NGR234 e seus hospedeiros inclui vários fatores simbióticos, como exopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares, sistema de secreção do tipo III e LPS (MARIE *et al.*, 2004; BROUGHTON *et al.*, 2006; LE QUÉRÉ *et al.*, 2006). Portanto, a expressão do gene *rfbB* de *H. seropedicae* foi analisada na presença de efetores potencialmente presentes na rizosfera, utilizando duas estirpes *rfbB::lacZ::nptI* independentes (Fig. 21).

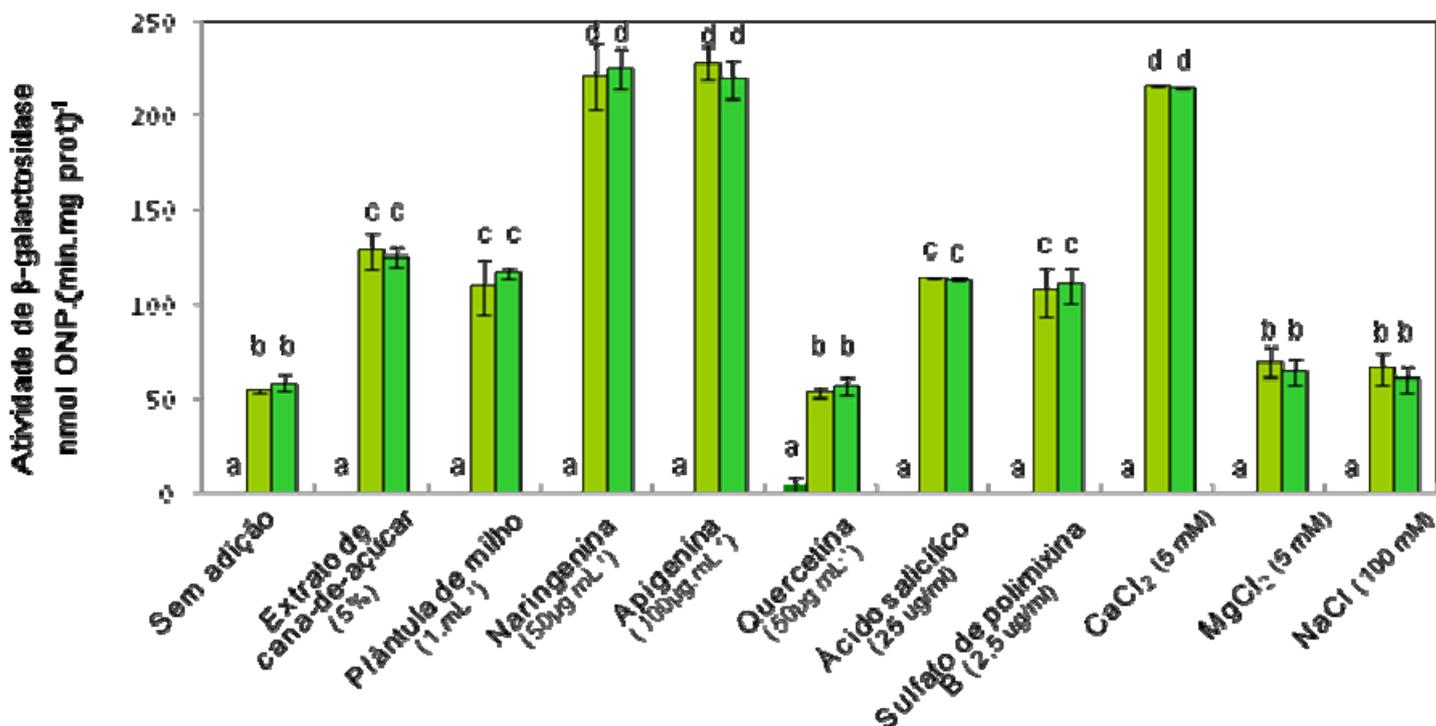


FIGURA 21 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *rfbB* DE *H. seropedicae*. As estirpes selvagem SmR1 (barras verde escuro) e mutantes *rfbB::lacZ::nptI*: LPEB3 (barras verde amarelado) e LPEB10 (barras verde claro) foram crescidas em meio NFbHPN por 6 horas na presença dos compostos mostrados, e então a atividade de β -galactosidase das culturas foi determinada e normalizada pela concentração de proteína total. Valores expressos em nmol ONP.(min.mg de proteína)⁻¹ \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($P < 0,01$; teste de múltiplas classes de Duncan).

Diferentes fontes de carbono como D-manose (2%), D-glucose (2%), L-ramnose (2%) ou succinato (2%), e o flavonoide quercetina não induziram a expressão diferencial de *rfbB*. Por outro lado, os flavonoides naringenina e apigenina aumentaram a expressão de *rfbB* 4 vezes, e o extrato de cana-de-açúcar aumentou 2 vezes. Duarte-Almeida e colaboradores (2006) mostraram que o extrato de cana-

de-açúcar contêm muitos flavonóides, que poderiam atuar como indutores de *rffB*. A expressão também foi aumentada 2 vezes pela presença de uma plântula de milho; presumivelmente o exsudado radicular também contêm fatores ativos. Uma vez que estes flavonoides não parecem afetar a sobrevivência da estirpe selvagem nem das estirpes mutantes de *H. seropedicae*, estes compostos devem sinalizar para a bactéria a presença do hospedeiro vegetal e induzir a expressão de genes necessários para a colonização, incluindo *rffB*.

Sulfato de polimixina B e ácido salicílico também aumentaram 2 vezes a expressão de *rffB*, sugerindo que a biossíntese de LPS deve ser desencadeada por compostos químicos agressivos. Algumas evidências sugerem que o ácido salicílico deve afetar diretamente a expressão gênica bacteriana: este composto inibe produção de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* PA14, além de afetar adesão e formação de biofilme em concentrações que não inibem crescimento (PRITHIVIRAJ *et al.*, 2005). Em *Agrobacterium tumefaciens*, o ácido salicílico inibe a indução de genes relacionados à virulência (YUAN *et al.*, 2007). A resposta da bactéria a este composto deve ser importante para garantir sua sobrevivência após penetração na planta.

A adição de íons cálcio (5 mM) aumentou 4 vezes a transcrição de *rffB* em *H. seropedicae*. Esta capacidade de indução não foi causada por influência osmótica ou de cátions bivalentes, uma vez que NaCl (100 mM) e íons magnésio (5 mM) não tiveram efeito na expressão de *rffB*. Este resultado sugere que os íons cálcio possivelmente atuam como indutores da expressão de genes necessários para a

colonização do hospedeiro por *H. seropedicae*. Íons cálcio e seus transportadores têm uma importante função como fatores de reconhecimento de hospedeiros e especificidade em muitas bactérias (ECONOMOU *et al.*, 1990; EHRHARDT *et al.*, 1996; GEHRING *et al.*, 1997; FELLE *et al.*, 1998; e BROUGHTON *et al.*, 2006). Além disso, Ca^{+2} está envolvido em uma variedade de processos celulares bacterianos, incluindo ciclo celular e divisão, motilidade, patogênese e quimiotaxia (MICHIELS *et al.*, 2002; DOMINGUEZ, 2004). Mudanças na concentração intracelular de Ca^{+2} também alteram estabilidade e atividade de várias enzimas, indicando que Ca^{+2} pode atuar como regulador metabólico (RAMPERSAUD, 1991; HOLLAND, 1999; MICHIELS *et al.*, 2002; e DOMINGUEZ, 2004). Em condições naturais, *H. seropedicae* poderia acessar íons cálcio do apoplasto vegetal, onde sua concentração varia de 1 a 10 mM (BUSH, 1995; LECOURIEUX *et al.*, 2006), sugerindo que a transcrição de *rfbB* poderia ser induzida na bactéria quando esta penetra nos tecidos vegetais. Uma hipótese alternativa é que sinais derivados do hospedeiro poderiam aumentar a concentração intracelular de Ca^{+2} em *H. seropedicae* desencadeando a transcrição de genes envolvidos na colonização de plantas inclusive em baixas concentrações extracelulares de Ca^{+2} . O mecanismo de regulação da transcrição dependente de Ca^{+2} em *H. seropedicae* ainda não foi determinado, uma vez que não puderam ser identificadas prováveis sequências promotoras ou regulatórias próximas ao agrupamento gênico *rfbGgalErfbBrfbC*.

4.7.3. Indutores da expressão de *rfbB* alteram perfil eletroforético do LPS de *H. seropedicae*.

Para determinar se o perfil eletroforético do LPS seria alterado sob as condições utilizadas para indução dos genes *rfb*, as estirpes de *H. seropedicae* selvagem e mutantes RAMEBB e RAMEBC foram cultivadas em meio NFbHPN na ausência e contendo CaCl_2 (5 mM), e o LPS total foi extraído e separado por SDS-PAGE. O perfil do LPS da estirpe selvagem crescida na presença de íons cálcio mostrou um aumento das porções contendo 12, 13, 14 e 15 unidades de antígeno-O (Fig. 22) quando comparado ao perfil obtido na ausência de CaCl_2 . Este resultado sugere que o aumento observado na transcrição de *rfbB* por estes sinais está relacionado ao aumento da produção do antígeno-O e sua incorporação no LPS, e é consistente com um aumento na expressão de genes relacionados à oligomerização do LPS.

O perfil do LPS das estirpes mutantes cultivadas na presença de cálcio revelou uma banda de AMM, também presente na estirpe selvagem, diferente da condição controle (Fig. 22A). Além de LPS, esta banda poderia ser uma molécula de polissacarídeo capsular, usualmente encontrada com massa molecular muito alta. Resultados similares foram observados no perfil de LPS das estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae* quando cultivadas na presença de naringenina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes resultados sugerem que metabólitos vegetais podem modular a síntese do LPS bacteriano para permitir o estabelecimento da associação.

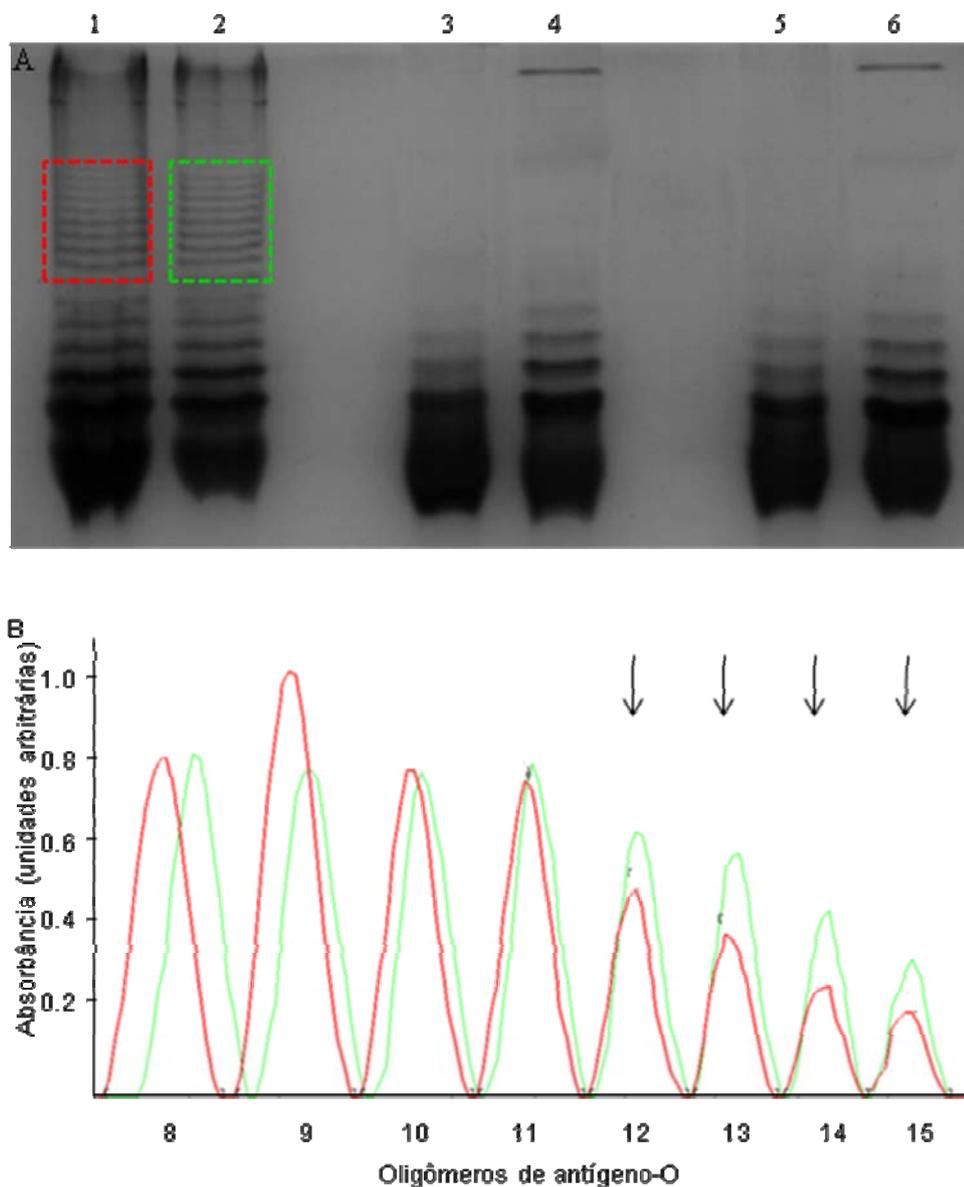


FIGURA 22 – PERFIL DO LPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* CULTIVADAS EM MEIO NFbHPN NA AUSÊNCIA (LINHAS 1, 3 E 5) E NA PRESENÇA DE 5mM DE CaCl_2 (LINHAS 2, 4 E 6). (A) SDS-PAGE realizado com o LPS total extraído das estirpes selvagem (colunas 1 e 2), e mutantes *rfbB* (colunas 3 e 4) e *rfbC* (colunas 5 e 6). As análises de densitometria das regiões do gel delimitadas por quadrados em (A) foram plotadas em (B). Traços vermelhos e verdes indicam o perfil de *H. seropedicae* selvagem crescido na ausência e na presença de cálcio, respectivamente. Setas indicam bandas contendo LPS com maior número de oligômeros de antígeno-O que são mais abundantes quando crescidos na presença de Ca^{+2} . O gel mostrado é representativo de três experimentos independentes.

5. CONCLUSÕES

- ✓ Neste estudo dois genes de *H. seropedicae* responsáveis pela biossíntese de ramnose, *rfbB* e *rfbC*, foram mutagenizados, e revelaram que são importantes para a biossíntese de LPS e para a associação endofítica com milho.

- ✓ Todas as características fenotípicas das estirpes mutantes RAMEB-B e RAMEB-C avaliadas foram similares, sugerindo que a mutação do gene *rfbB* pode exercer um efeito polar no operon, impedindo a expressão de *rfbC*.

- ✓ Análises por SDS-PAGE do LPS total mostraram que as estirpes mutantes aparentemente não possuem antígeno-O, e o lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central apresenta um deslocamento eletroforético, sugerindo que este é menor ou tem carga mais negativa que o da estirpe selvagem. Estes resultados mostram que as mutações nos genes *rfb* alteram drasticamente a estrutura e composição química do LPS.

- ✓ Ensaios *in vivo* mostraram que a adesão eficiente de *H. seropedicae* às raízes de milho depende das moléculas da superfície da célula, uma vez que o número de bactérias selvagens aderidas foi aproximadamente 100 vezes maior que o de bactérias mutantes.

✓ O fato de que o número de células da estirpe selvagem aderidas às raízes diminuiu e foi similar ao número de células aderidas das estirpes mutantes quando LPS selvagem, N-acetil D-glucosamina ou D-glucosamina foram utilizados como competidores corrobora a hipótese de que as alterações no LPS são responsáveis pelas diferenças fenotípicas observadas nos mutantes *rfb*. Os resultados sugerem que o LPS de *H. seropedicae* participa na adesão da bactéria possivelmente ancorando-a em receptores vegetais por seus resíduos de N-acetil D-glucosamina.

✓ O LPS parece ter um envolvimento específico na adesão de *H. seropedicae* às raízes do hospedeiro, uma vez que a adesão à matriz de fibra de vidro não foi alterada pelas mutações.

✓ A estirpe selvagem colonizou os tecidos radiculares internos de milho também mais eficientemente: 24 horas depois da inoculação o número de bactérias selvagens era 100 vezes maior que o de mutantes, diferença esta mantida nos dias subsequentes analisados.

✓ A interrupção na biossíntese de ramnose diminuiu consideravelmente a competitividade de *H. seropedicae* pela colonização de milho.

✓ O fato de as estirpes mutantes *rfbB* e *rfbC* serem mais sensíveis a diversos compostos, inclusive a metabólitos da defesa basal da planta, poderia explicar em parte a diminuição da capacidade de colonização dos tecidos radiculares internos e da competitividade em relação à estirpe selvagem.

✓ A mutação nos genes *rfbB* ou *rfbC* não alterou a motilidade nem a produção de exopolissacarídeos de *H. seropedicae*, porém diminui a taxa de crescimento *in vitro*.

✓ A expressão do gene *rfbB* é induzida pelos flavonoides naringenina e apigenina e cálcio, sinais que podem ser derivados do hospedeiro vegetal. A expressão deste gene também é modulada por compostos químicos agressivos. Estes resultados sugerem que a biossíntese de ramnose é alterada durante a colonização do vegetal e é importante para a sobrevivência da bactéria no interior da planta.

✓ Esses sinais biológicos (Ca^{2+} e alguns flavonoides) parecem aumentar quantitativamente a porção de antígeno-O do LPS, sugerindo que metabólitos vegetais podem modular a síntese do LPS bacteriano para permitir o estabelecimento da associação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 36: 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. AND DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**. 13: 65-73, 1992.

BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L. AND DOBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labelled fertiliser. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – the role of biological nitrogen fixation. Resumos**. Angra dos Reis: EMBRAPA, p.202-203, 1995.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L. AND DOBEREINER, J. 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. Journal of Systematic Bacteriology**. 46: 802–810, 1996.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. AND DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**. 29: 91-92, 1997.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 77:549-579, 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**. 43: 103-121, 1997

BARRAQUIO, W.L., GUZMAN, M.R., BARRION, M., WATANABE, E.I. Population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland and dryland rice. **Appl. Environ. Microbiol.** 42: 124-128, 1982.

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

BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant Soil**. 174: 195-209, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254, 1976.

BRAUN, S.G., MEYER, A., HOLST, O., PÜHLER, A., NIEHAUS, K. Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Lipopolysaccharide Substructures Essential for Elicitation of an Oxidative Burst in Tobacco Cells. **Mol. Plant-Microbe Interac.** 18: 674-681, 2005.

BRENCIC, A; WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiol. Mol. Bio. Rev.** 69: 155-194, 2005.

BROUGHTON, W.J. et al. Flavonoid-Inducible Modifications to Rhamnan O Antigens Are Necessary for *Rhizobium* sp Strain NGR234 – Legume Symbioses. **Journal of Bacteriology**. 188: 3654-3663, 2006.

BURDMAN, S.; OKON, Y. e JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Crit. Rev. Microbiol.** 26: 91–110, 2000.

BURRIS, R.H. Nitrogenases. **J. Biol. Chem.** 266: 9339-9342, 1991.

BUSH, D.S. Calcium regulation in plant cells and its role in signalling. **Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.** 27: 953-967, 1995.

CAMPBELL, G.R.O.; REUHS, B.L.; WALKER, G.C. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. **PNAS**. 99: 3938-3943, 2002.

CAN – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em www.cna.org.br e em paginarural.com.br. Acesso em 10/10/2009.

CARLSON, R.W. Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides. **J Bacteriol.** 158: 1012-17, 1984.

CHRISTOPHER, W.N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **J. Agricult. Research**. Queensland, 41: 259, 1932.

COLLINS, P.M.; FERRIER, R.J. **Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products**. Ed. John Wiley & Sons, p. 463-524, 1995.

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). **Applied and Environmental Microbiology**, 67: 2375-2379, 2001.

DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H. M.; KUIPER, I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G. V.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT, R.; LUGTENBERG, B. J. J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 15:1173-1180, 2002.

DE WEGER, L.A.; BAKKERS, A.H.M.; SCHIPPERS, B.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LUGTENBERG, B.J.J. *Pseudomonas* spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are affected in their ability to colonize potato roots. **Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions.** 36: 197-202, 1989.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.** 41: 339-367, 1990.

DJORDJEVIC, M. A.; GABRIEL, D. W.; ROLFE, B. G. *Rhizobium* – the refined parasite of legumes. **Annual Review of Phytopathology.** 25: 145-168, 1987.

DOMINGUEZ, D.C. Calcium signaling in bacteria. **Mol Microbiol.** 54: 291–297, 2004.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis.** 1: 1-13, 1992.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES R. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). **Plant Physiol.** 105: 1139-47, 1994.

DUARTE-ALMEIDA, M., NOVOA, A.V., LINARES, A.F., LAJOLO, F.M., GENOVESE, I.M. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods Hum. Nutr.** 61(4):187-92, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28: 350-356, 1956.

DUELLI, D.M., e NOEL, K.D. Compounds exuded by *Phaseolus vulgaris* that induce a modification of *Rhizobium etli* lipopolysaccharide. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 10: 903-910, 1997.

DURRANT, W.E., DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 42:185–209, 2004.

EIDELS, L., OSBORN, M.J. Lipopolysaccharide and Aldoheptose Biosynthesis in Transketolase Mutants of *Salmonella typhimurium*. **PNAS** 68: 1673-77, 1971.

ELBELTAGY, A., NISHIOKA, K., SATO, T., SUZUKI, H., YE, B., HAMADA, T., ISAWA, T.; MITSUI, H., MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Appl Environ Microbiol.** 67: 5285-93, 2001.

ECONOMOU, A., HAMILTON, W.D.O., JOHNSTON, A.W.B., e DOWNIE, J.A. The *Rhizobium* nodulation gene *nodO* encodes a Ca²⁺-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins. **EMBO J.** 9: 349-357, 1990.

EGENER, T., HUREK, T., e REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 12:813-819, 1999.

EHRHARDT, D.W., WAIS, R., e LONG, S.R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. **Cell.** 85: 673-681, 1996.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em www.embrapa.br. Acesso em 10/10/2009.

ERRIDGE, C.; BENNET-GUERRERO, E.; POXTON, I.R. Structure and function of lipopolisaccharides. **Microb. Infect.** 4: 837-851, 2002.

FELLE, H.H., KONDOROSI, E., KONDOROSI, A., and SCHULTZE, M. The role of ion fluxes in Nod-factor signaling in *Medicago sativa*. **Plant J.** 13: 455-463, 1998.

FREER, E., MORENO, E., MORIYÓN, I., PIZARRO-CERDÁ, J., WEINTRAUB, A., e GORVEL, J. P. *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. **J. Bacteriol.** 178:5867-5876, 1996.

FREIBERG, C. Molecular basis of the symbiosis between Rhizobium and legumes. **Nature.** 387: 394-401, 1997.

FU, H., BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology.** 171: 3168-3175, 1989.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil.** 154: 117-128, 1993.

GAO, M., D'HAENZE, W., RYCHE, R., WOLUCKA, B., and HOLSTERS, M. Knockout of an Azorhizobial dTDP-L-Rhamnose Synthase Affects Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide Production and Disables Symbiosis with *Sesbania rostrata*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 14: 857-866, 2001.

GEHRING, C.A., IRVING, H.R., KABBARA, A.A., PARISH, R.W., BOUKLI, N.M., and BROUGHTON, W.J. Rapid, plateau-like increases in intracellular free calcium are associated with Nod-factor-induced root hair deformation. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 10: 791-802, 1997.

GILLIS, M.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERTERS, K.; KEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyfasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and the proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂ fixing isolates from rice in Vietnan. **Int. Syst. Bacteriol.** 45: 274-289, 1995.

GLASER, L. Bacterial cell surface polysaccharides. **Ann. Rev. Biochem.** 42: 91-112, 1973.

GOOSEN-DEROO, L.; DE MAAGD, R.A.; LUGTENBERG, B.J. Antigenic changes in lipopolysaccharide I of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* in root nodules of *Vicia sativa* subsp. *Nigra* occur during release from infection threads. **J. Bacteriol.** 173: 3177-183, 1991.

GYANESHWAR, P., JAMES, E. K., REDDY P. M., LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist.** 154: 131-145, 2002.

HALVERSON, L.J., STACEY, G. Signal exchange in plant-microbe interactions. **Microbiol Rev.** 50(2):193-225, 1986.

HOLLAND, B., JONES, H.E., CAMPBELL, A.K., JACQ, A. An assessment of the role of intracellular free Ca²⁺ in *E. coli*. **Biochimie.** 81: 901-907, 1999.

HUANG, W.E, HUANG, L., PRESTON, G.M., NAYLOR, M., CARR, J.P., LI, Y., SINGER, A.C., WHITELEY, A.S., WANG, H. Quantitative in situ assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of *Acinetobacter* sp. ADP1. **Plant J.** 46:1073-1083, 2006.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17: 77-119, 1998.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**. 48: 785-797, 1997.

JANNSON, P.E.; LINDBERG, A.A.; LINDBERG, B.; WOLLIN, R. Structural studies on the hexose region of the core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** 231: 267-275, 1981.

JOFRÉ, E.; LAGARES, A.; MORI, G. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production and root colonization in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol.** 231: 267-275, 2004.

JONES, D.A.; TAKEMOTO, D. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Curr. Opin. Immunol.** 16: 48-62, 2004.

KANNENBERG, E.L.; BREWIN, N.J. Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. **Trends Microbiol.** 8:277–283, 1994.

KANNENBERG, E.L.; REUHS, B.L.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: **The Rhizobiacea**. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht:Kluwer Academic Publisher, pp. 154, 1998.

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.** Ottawa, 43: 887-891, 1997.

KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. 38: 1219-1232, 1992.

KOBAYASHI, H. *et al.* Flavonoids induce temporal shifts in gene expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Mol. Microbiol.** 51: 335-347, 2004.

KOKOTEK, W., e LOTZ W. Construction of a lacZ-kanamycin-resistance cassette, useful for site-directed mutagenesis and as a promoter probe. **Gene.** 84(2):467-71, 1989.

KRIEG, N. R., e HOLT, J. G., eds. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*. Vol. 1. **Williams and Wilkins**, Baltimore, MD, U.S.A, 1984.

LADHA, J.K.; BRUIJN, F.J.; MALIK, K.A. Assessing opportunities for nitrogen fixation in rice: a frontier project. **Plant and Soil.** 194: 1-10, 1997.

LADHA, J.K. & REDDY, P.M. Extension of nitrogen fixation to rice necessity and possibilities. **GeoJournal.** 35: 363-372, 1995.

LADHA, J. K.; KIRK, G. J. D.; BENNETT J.; et al. Opportunities for increased nitrogen use efficiency from improved lowland rice germplasm. **Field Crops Research**, v. 56, p. 41–71, 1998.

LADHA, J.K. & REDDY, P.M. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. **Plant and Soil.** 38: 1219-1232, 2003.

LECOURIEUX, D., RANEVA, R., e PUGIN, A. Calcium in plant defense signalling pathways. **New Phytol.** 171: 249-269, 2006.

LE QUÉRÉ, A., DEAKIN, W.J., SCHMEISSER, C., CARLSON, R.W., STREIT, W.R., BROUGHTON, W.J., and FORSBERG, L.S. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234. **J. Biolol. Chem.** 281(39): 28981-992, 2006.

LEROUGE, I., and VANDERLEYDEN, J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. **FEMS Microbiol. Rev.** 26:17-47, 2001.

LONG, S.R.; STAKAWICZ, B.J. Prokaryotic plant parasites. **Cell.** 73(5):921-35, 1993.

LÜDERRITZ, O., WESTPHAL, O. STAUBE, A.M., NIKAIDO, H. Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In: *Microbial Toxins*. Eds. Weinbaum, G., Kadis, S. and Ali, S.J. **Academic Press**, New York, 4(4): 145-233, 1971.

MACHADO, I. M. P.; YATES, M.G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29: 1599-1602, 1996.

MAAGD, R.A.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E. LUGTENBERG, B.J.J. Isolation and characterization of three classes of mutants of *Rhizobium leguminosarum* with altered lipopolysaccharides. In: *Nitrogen Fixation: hundred years after*. Ed. H. BOTHE, F.J. DE BRUJIN, W.E. NEWTON. Stuttgart, Fisher, p. 473-492, 1988.

MALIK, K.A.; RAKHSHANDA, B.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MIRZA, M.S.; ALI, S. Association of nitrogen-fixing plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant Soil.** 194: 37-44, 1997.

MARIE, C., DEAKIN, W.J., OJANEN-REUHS, T., DIALLO, E., REUHS, B., BROUGHTON, W.J., e PERRET, X. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. **Mol. Plant-Microbe Interac.** 17(9): 958-966, 2004.

MARTINEZ-ABARCA, F., HERRERA-CERVERA, J. A., BUENO, P., SANJUAN, J., BISSELING, T., and OLIVARES, J. Involvement of Salicylic Acid in the Establishment of the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa Symbiosis. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 11:153-155, 1998.

MATHYSSE, A.G. Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. **Appl. Environ. Microbiol.** 13: 281-307, 1986.

METTS, J.; WEST, J.; DOARES, S.; MATTHYSE, A.G. Characterization of three *Agrobacterium tumefaciens* mutants with chromosomal mutations that affect induction of *vir* genes. **J. Bacteriol.** 173: 1080-87, 1991.

MICHIELS, J., XI, C., VERHAERT, J., and VANDERLEYDEN, J. The functions of Ca²⁺ in bacteria: a role for EF-hand proteins? **Trends Microbiol** 10: 87–93, 2002.

MILLER, J.F.; MEKALANOS, J.J.; FALKOW, S. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. **Science.** 243: 916-922, 1989.

MILLER, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. **Cold Springer Horbor**, NY.

MONTEIRO, R.A., SCHMIDT, M.A., BAURA, V.A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., YATES, M.G., RANDI, M.A.F., PEDROSA, F.O., eSOUZA, E.M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genet. Mol. Biol.** 31(4): 932-937, 2008.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell.** 7: 869-885, 1995.

NOEL, K.D., VANDENBOSCH, K.A., e KULPAKA, B. Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. **J. Bacteriol.** 168: 1392-1401, 1986.

NOEL, K.D; DUELLI, D.M. *Rhizobium* lipopolysaccharide and its role in symbiosis. In: **Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process.** Ed. E.W. TRIPLETT. Horizon Scientific Press, UK, p. 415-431, 2000.

OLIVARES, F. L.; DOS REIS, F. B.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugarcane roots by the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. In: **International Symposium and Sustainable Agriculture for the Tropics – The Role of Biological Nitrogen Fixation**. BODDEY, R. M.; DE RESENDE, A. S. (eds.) EMBRAPA. 65 – 66, 1995.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**. 21: 197-200, 1996.

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

ORMEÑO-ORRILLO, E., ROSENBLUETH, M., LUYTEN, E., VANDERLEYDEN, J., MARTINEZ-ROMERO, E. Mutations in lipopolysaccharides biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Environ Microbiol** 10: 1271-84, 2008.

PEDROSA, F.O., TEIXEIRA, K.R.S., MACHADO, I.M.P., STEFFENS, M.B.R., KLASSEN, G., BENELLI, E.M., MACHADO, H.B., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U., ISHIDA, M.L., YATES, M.G., SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil. Biol. Biochem**. 29:843-846, 1997.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**. 141(1): 13-39, 1992.

POSTGATE, J. Biological nitrogen fixation: Fundamentals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**. 296: 375-385, 1982.

PUEPPKE, S.G. Adsorption of bacteria to plant surfaces. In: **Plant-Microbe Interactions**. Ed. T. KOSUGE, E.W NESTER. New York, p. 215-261, 1984.

PRITHIVIRAJ, B., BAIS, H.P., WEIR, T., SURESH, B., NAJARRO, E.H., DAYAKAR, B.V., SCHWEIZER, H.P., VIVANCO, J.M. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. **Infect. Immun.** 73:5319–5328, 2005.

PÜHLER, A.; ARLAT, M.; BECKER, A.; GOTTFERT, M.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about plant-bacteria interactions? **Curr. Opin. Plant Biol.** 7: 137-147, 2004.

QUISPEL, A. A search for signals in endophytic microorganisms. **Molecular Signals in Plant-Microbe Communications.** p. 471-490, 1992.

RAETZ, C.R.H. Biochemistry of endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.** 59: 129-70, 1990.

RAETZ, C.R.H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharides endotoxins. **Annu. Rev. Biochem.** 71: 635-700, 1992.

RAETZ, C.R.H.; REYNOLDS, C.M.; TRENT, M.S.; BISHOP, R.E. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.** 54: 412-427, 2007.

RAHIM, R.; BURROWS, L.L.; MONTEIRO, M.A.; PERRY, M.B.; LAM, J.S. Involvement of the *rmI* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology.** 146: 2803-2814, 2000.

RAMPERSAUD, A., UTSUMI, R., DELGADO, J., FORSTS, S.A., INOUYE, M. Ca²⁺-enhanced Phosphorylation of a Chimeric Protein Kinase Involved with Bacterial Signal Transduction. **J. Biolol. Chem.** 266(12): 7633-7637, 1991.

REEVES, P.P., e WANG, L. Genomic Organization of LPS-Specific Loci. **Curr. Top. Microbiol. Immunobio.** 264: 109-135, 2006.

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

REUHS, B.L.; STEPHENS, S.B.; GELLER, D.P.; KIM, J.S.; GLENN, J.; PRZYTYCKI, J.; OJANEN-REUHS, T. Epitope identification for a panel of anti-*Sinorhizobium meliloti* monoclonal antibodies and application to the analysis of K antigens and Lipopolysaccharides from bacterioids. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 5186-5191, 1999.

RIDLEY, B.L. Plant cell wall and bacterial cell surface polysaccharides in plant-microbe interactions: the role of oligogalacturonides and lipopolysaccharides. **The University of Georgia**, Athens, Ga, USA, 2000.

RONCATO-MACARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif gene in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.** 45: 39-47, 2003

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.

SAMUEL, G., REEVES, P. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. **Carboh. Res.** 338: 2503-2519, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 74 : 5463–7, 1977.

SERRATO, R.V. Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. **Tese de Doutorado.** Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba, p. 143, 2008.

SHARON, N. **Complex carbohydrates. Their chemistry, biosynthesis and functions.** Ed. Addison-Wesley Publish Co. p. 129, 1975.

SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, 224: 1095-96, 1984.

SMITH, A.R.W.; MUNRO, S.M. WAIT, R.; HIGNETT, R.C. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plum isolated of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. **Microbiology**, 140: 1585-1593, 1994.

SNEL, B.; LEHMANN, G.; BORK, P.; HUYNEN, M.A. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. **Nucleic Acids Reser.** 28: 3442-44, 2000.

SOUZA, E.M. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de Doutorado.** Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba, p. 260, 1990.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Canadian Journal of Microbiology.** 37(6):425-429, 1991.

STACEY, G., MCALVIN, C.B., KIM, S.Y., OLIVARES, J., SOTO, M.J. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. **Plant. Physiol.** 141:1473–1481, 2006.

STOLTZFUS, J.R.; SO, R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, J.K.; BRUIJIN, F.J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil.** 194: 25-36, 1997.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Ann. Rev. Microbiol.** 39: 243-270, 1985.

TAO, H.; BREWIN, N.J.; NOEL, K.D. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. **J. Bacteriol.** 174: 2222-2229, 1992.

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia.** Artmed. Ed. 8, 920 p., 2005.

TSAI, C., FRISCH, C. E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.** 119:115-119.

UEDA, T., SUGA, Y., YAHIRO, N., MATSUGUSHI, E.T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **J. Bacteriol.** 177: 1414-1417, 1995.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 56: 105-114, 1992.

VALVANO, M.A. Export of O-specific lipopolysaccharide. **Front. Biosc.** 8: 452-471, 2003.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizhosphere with bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.** 26: 379-407, 1988.

WESTPHAL, O., e JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Methods. Carbohydr. Chem.** 5: 83-91, 1965.

WHITFIELD, 2006

WU, P., ZHANG, G., LADHA, J.K., MCCOUCH, S.R., HUANG, E.N. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N₂ fixation in the rizosphere by irrigated rice plants. **Theor. Appl. Genet.** 91: 1171-1183, 1995.

XU, H.X., e LEE, S.F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research.** 15 (1): 39 – 43, 2001.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic Classification of Nitrogen-Fixing Organisms. In: **Biological Nitrogen Fixation**. Ed. G. STACEY, R.M. BURRIS, H.S. EVANS. London Chapman & Hall, p. 43-86, 1992.

YUAN, Z.; EDLING, M.P.; SAENKHAM, P.; BANTA, L.M.; WISE, A.A.; RONZONE, E.; BINNS, A.N.; KERR, K.; NESTER, E.W. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the *vir* regulon and activates quormone-quenching genes in *Agrobacterium*. **PNAS**, 104: 11790-795, 2007.

ZÄHRINGER, U.; LINDNER, B.; RIETSCHHEL, E.T. Endotoxin in Health and Disease. In: **Endotoxins**. Ed. H. BRADE, S.M. OPAL, S.N. VOGEL, D.C. MORRISON. Marcel Dekker Inc. p 93-114, 1999.

ANEXO 1. Composição do meio de cultura NFb-malato (PEDROSA & YATES, 1984).

MgSO ₄ .7H ₂ O	2 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético (NTA)	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	2 x 10 ⁻² g/L
Biotina	1 x 10 ⁻⁴ g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175 g/L
H ₃ BO ₃	1,4 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	4 x 10 ⁻² g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,2 x 10 ⁻¹ g/L
Malato de sódio	5 g/L

ANEXO 2. Composição do meio de cultura LB (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L

ANEXO 3. Composição do meio de cultura TB (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Triptona	12 g/L
Extrato de Levedura	24 g/L
Glicerol	4 g/L
