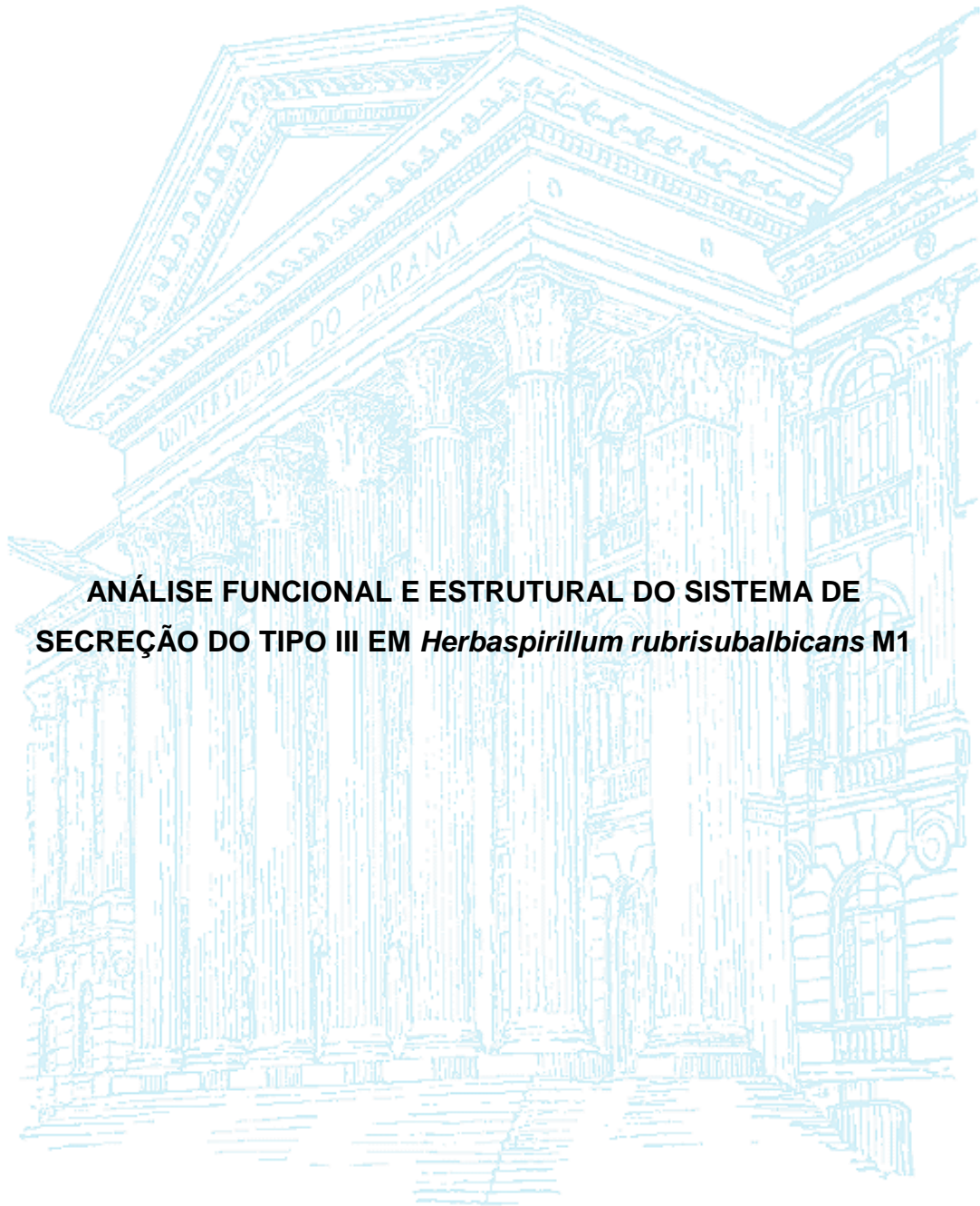


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA AUGUSTA SCHMIDT

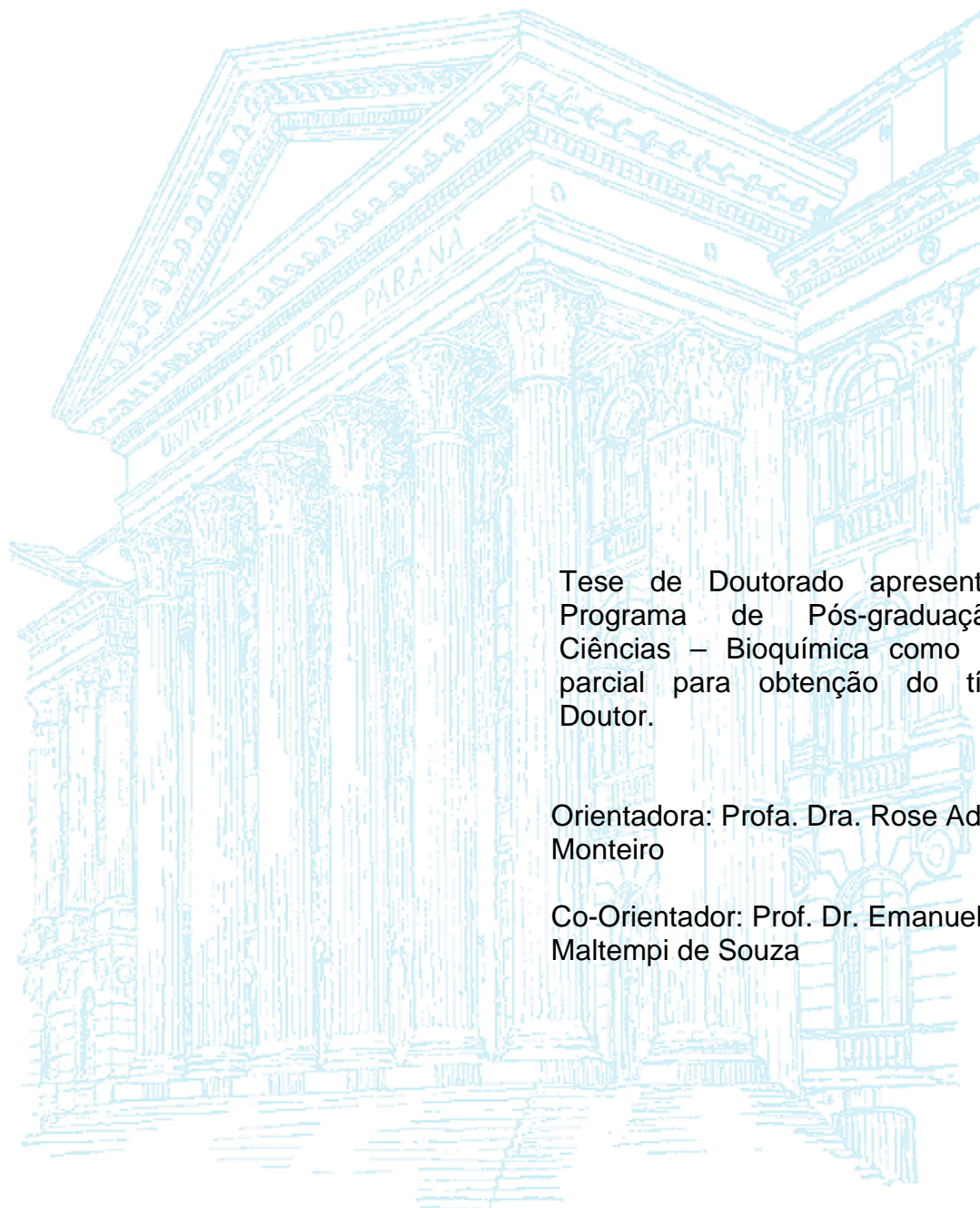


**ANÁLISE FUNCIONAL E ESTRUTURAL DO SISTEMA DE
SECREÇÃO DO TIPO III EM *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1**

CURITIBA

2013

MARIA AUGUSTA SCHMIDT



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Rose Adele Monteiro

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

CURITIBA

2013

“Sonhos não morrem, apenas adormecem na alma da gente”.

Chico Xavier

Dedicado ao Roger

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e especialmente a minha orientadora Rose Adele Monteiro, pela força, dedicação e carinho. Agradeço também ao meu co-orientador Emanuel Maltempi de Souza, juntos me apoiaram com grandes ideias e desprenderam muito tempo, obrigada.

Aos Professores Fábio de Oliveira Pedrosa e Professora Liu Un Rigo agradeço por terem acompanhado meu trabalho desde o começo como relatores, colaboraram muito com tudo, é uma honra tê-los tão próximos me acompanhando. Ao Professor Leonardo Magalhães Cruz por ler a versão da banca interna da minha tese e pelo acompanhamento todos esses anos.

Aos demais Professores do grupo, Marcelo Muller dos Santos, Maria Berenice Steffens, Leda Satie Shubatsu e Luciano Huergo obrigada pela dedicação e trabalho enfrentando todo processo burocrático para nosso grupo seguir forte e em frente.

Aos técnicos do grupo Valter, Roseli e Dona Ju, por todo amor e dedicação. Agradeço também a Dona Marilza, Alex, Irene e Nanci por toda ajuda.

Muito obrigada também a Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências – Bioquímica em especial aos coordenadores Professores Miguel Daniel Nosedá e Silvia Cadena pelo esforço e dedicação.

Todos os colegas e amigos do grupo, muito obrigada. Em especial aos meus amigos do anexo, Adriano, Eduardo, Michelle, Sarah, Denny, Marcelo, Anelis e Thalita. Um agradecimento especial à aluna de Iniciação Científica Fernanda Oliveira que colaborou efetivamente para os resultados dessa tese com muito trabalho e amor.

Aos amigos do Departamento que não são do grupo também mando meu muito obrigada, especialmente a Viviane, Arnaldo, Danilo, Normanda, Nessana, Arquimedes, Lauro, Vassoler, Guilherme, Popó e Elizabeth. Pessoas que irão permanecer na minha vida muito além desta etapa que encerra. Aos meus amigos de fora do Departamento Andersson e Francinete.

A minha amiga Manoela, obrigada pelas longas horas de conversa me ajudando a superar o pior e buscar sucesso sempre.

Gostaria de agradecer a minha família, que sempre apoiou as minhas decisões, independente da saudade que isso causaria e por todo amor. À minha mãe Cássia, meu pai Francismar, minha irmã Maria Cecília, meus irmãos Vitor, Artur

e Rubens e minha vó Nelsi.

Finalmente agradeço ao grande amor da minha vida Roger, meu marido, namorado, amigo que pode me acompanhar fisicamente por metade desse caminho, mas que me acompanhou de alma e coração antes, durante e pra sempre. Obrigada por todo amor. Está aqui mais um sonho nosso realizado.

RESUMO

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

Em várias plantas a virulência das bactérias patogênicas é em parte dependente de um grupo de proteínas que são injetadas nas células do hospedeiro pelo Sistema de Secreção do Tipo III (SST3). Esta é uma maquinaria altamente conservada capaz de injetar proteínas bacterianas dentro de células eucarióticas. Recentemente, genes *hrp/hrc* que codificam as proteínas do SST3, foram identificados no genoma de *H. rubrisubalbicans*. Neste trabalho também identificamos prováveis proteínas efetoras e possíveis regiões promotoras dentro deste cluster.

Os genes *hrpE* e *hrcN* que foram mutagenizados gerando os mutantes TSE e TSN que foram incapazes de causar a doença da estria mosqueada na cana de açúcar B-4362. A cana-de-açúcar B-4362 quando inoculada com a estirpe selvagem M1 materna apresenta sintomas da doença.

A caracterização do funcionamento do SST3 foi feita inoculando os mutantes em outras variedades de gramíneas, como o arroz e milho. Sua capacidade de colonização e de promover o crescimento vegetal foi determinado, permitindo que o mutante no SST3 além de não ter conseguido colonizar arroz, cana de açúcar e milho com tanta eficiência quanto o selvagem, também não foi capaz de promover o crescimento destas plantas.

O secretoma de *H. rubrisubalbicans* foi realizado afim de determinarmos quais proteínas estariam sendo secretadas na presença do caldo da cana B-4362 durante o cultivo, diferentes padrões proteicos foram encontrados sendo que 5 proteínas diferentemente expressas nas duas condições puderam ser identificadas.

Estes resultados mostram que o produto dos genes *hrpE* ou *hrcN* é essencial para o funcionamento do SST3 em *H. rubrisubalbicans* ou ainda que este produto faz reação cruzada com outros sistemas interferindo assim na fisiologia da interação desta bactéria com as plantas.

ABSTRACT

The *Herbaspirillum rubrisubalbicans* is an endophytic diazotrophic bacterium and belongs to the class β of proteobacteria that can be associated with several Poaceae of economic interest such as maize, rice, sorghum, wheat and sugar cane. This bacterium is capable of causing mottled strip disease in B-4362 variety of cane sugar and the Red Stripe disease in some sorghum varieties.

In several plants the virulence of pathogenic bacteria is partly dependent on a group of proteins that are injected into host cells by Type III Secretion System (T3SS). This is a highly conserved machinery capable of injecting bacterial proteins into eukaryotic cells. Recently, *hrp/hrc* genes that encode proteins of T3SS were identified in the genome of *H. rubrisubalbicans*. This work also identified probable effector proteins and putative promoter regions of this cluster.

hrpE and *hrcN* genes were mutated generating mutants TSE and TSN, they were unable to cause mottled strip disease in sugarcane B-4362. The cane sugar B-4362 when inoculated with the wild type M1 maternal symptoms of the disease.

The characterization of operation of T3SS was made by inoculating mutants in other varieties of grasses, such as rice and maize. The ability to colonize and promote plant growth was determined by allowing the mutant of T3SS in addition to failing to colonize rice, sugarcane and maize as efficiently as the wild, was not able to promote the growth of these plants.

The secretome of *H. rubrisubalbicans* was performed in order to determine which proteins were being secreted in the presence of B-4362 sugarcane juice during cultivation, different protein patterns were found with 5 proteins differentially expressed in the two conditions could be identified.

These results show that the product of gene *hrpE* or *hrcN* is essential for the functioning of T3SS of *H. rubrisubalbicans* or that this product is cross-reaction with other systems interfering in the physiology of these bacteria interact with plants.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenina trifosfato

atm - atmosfera

Amp – ampicilina

BSA – Bovin sorum albumin (Albumina de soro bovino)

°C – graus Celcius

DNA – ácido desoxirribonucleico

D.O.₆₀₀ – densidade óptica em 600 nanômetros

h - horas

Km^R – resistente a canamicina

L - litro

ms - milissegundos

mmol - milimol

mL – mililitro

µg - microgramas

µL - microlitros

µm - micrômetros

ng - nano gramas

nm - nanômetros

pb – pares de bases

p/v – para volume

q.s.p. – quantidade suficiente para

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

Tc^R – resistente a tetraciclina

Lista de Figuras

FIGURA 1 – CANA-DE-AÇÚCAR B-4362 INOCULADA COM <i>H. rubrisubalbicans</i> ESTIRPE M1	7
FIGURA 2 – SISTEMAS DE SECREÇÃO – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICA .	9
FIGURA 3 - ESQUEMA GERAL DO SISTEMA Sec DE SECREÇÃO	10
FIGURA 4 – MODELO DO TRANSLOCADOR TAT-DEPENDENTE.....	11
FIGURA 5 – ESQUEMA GERAL DO SST2 EM <i>Klebsiella oxytoca</i>	12
FIGURA 6 - RESUMO ESQUEMÁTICO DOS TIPOS DE SST5	14
FIGURA 7 – EXEMPLO DE TRANSPORTE DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO 1	15
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES MECANISMOS DE SECREÇÃO DO SST4.....	17
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SST6.....	19
FIGURA 10 – MODELO ESQUEMÁTICO DO SST3.....	22
FIGURA 11 - ESTRUTURA DOS COMPONENTES DO SST3 E SUAS LOCALIZAÇÕES.....	22
FIGURA 12 - MODELO DE REGULAÇÃO GÊNICA DO SST3 EM <i>X. campestris pv. Vesicatoria</i>	25
FIGURA 13 – MODELO DE FUNCIONAMENTO DO SST3	26
FIGURA 14 – INOCULAÇÃO DO CULTIVAR B-4362 DE CANA-DE-AÇÚCAR COM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	28
FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DO GRUPAMENTO GÊNICO <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> COM OUTROS ORGANISMOS	48
FIGURA 16 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS SEQUENCIAS DO GENE <i>hrcN</i> DE REPRESENTANTES ALFA E BETAPROTEOBACTERIA.....	50
FIGURA 17 – SEQUENCIAS DE POSSÍVEIS REGIÕES PROMOTORAS DE <i>orf1</i> , <i>orf6</i> , <i>orf8</i> , <i>hrpB</i> e <i>orf10</i> E DO GENE <i>hrpO</i>	52
FIGURA 18 - MICROSCOPIA ÓPTICA (MO) E ELETRONICA DE TRANSMISSÃO (MET) DE FOLHA DE CANA DE AÇÚCAR DA VARIEDADE B-4362 INOCULADA COM <i>H. rubrisubalbicans</i> M1, TSE E TSN.....	56
FIGURA 19 – PLANTAS DE ARROZ DA VARIEDADE NIPPONBARE INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E A ESTIRPE FP2 DE <i>A. brasiliense</i>	60
FIGURA 20 – Determinação do efeito da inoculação de <i>H. rubrisubalbicans</i> estirpes	

M1 e TSE sobre o crescimento de plântulas de milho.	63
FIGURA 21 – GEL BIDIMENSIONAL DO SECRETOMA DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO CALDO DE CANA B-4362.....	65

Lista de Tabelas

TABELA 1- Estirpes de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	33
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO Nfb-Malato	34
TABELA 3 - ANTIBIÓTICOS	35
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO HOAGLAND	37
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO MS	38
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS HOMÓLOGOS DAS PROTEÍNAS Hrp/Hrc de <i>H. rubrisubalbicans</i> e <i>H.seropedicae</i>	49
TABELA 7– PROTEÍNAS EFETORAS DO SST3 DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	54
TABELA 8 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 NA AUSENCIA E PRESENÇA DE CALDO DE CANA B-4362 NO MEIO DE CULTIVO	66

Lista de Gráficos

GRAFICO 1 – CONTAGEM DE BACTÉRIAS NOS TECIDOS INTERNOS DA CANA DE AÇÚCAR B-4362.....	58
GRAFICO 2 – DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE BACTERIAS ENDOFITICAS ENCONTRADAS NAS RAIZES DE ARROZ APOS A INOCULAÇÃO DO ARROZ COM O <i>H. rubrisubalbicans</i> ESTIRPES M1, TSE e TSN.....	59
GRAFICO 3 – ANÁLISE DO COMPRIMENTO E PESO SECO DAS RAIZES DE ARROZ INOCULADAS COM <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 E TSE E <i>A. brasiliense</i> FP2	62
GRAFICO 4 – PESO SECO E COMPRIMENTO DE RAIZES E FOLHAS DE MILHO	64

Sumário

1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	6
2.2 DOENÇA DA ESTRIA MOSQUEADA	6
2.3 SISTEMAS DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS	8
2.3.1 Sistemas Sec	9
2.3.2 Sistema Tat	10
2.3.3 Sistema de Secreção do Tipo 2	11
2.3.4 Sistema de Secreção do Tipo 5	13
2.3.5 Sistemas Sec-independentes.....	14
2.3.5.1 Sistema de Secreção do Tipo 1	15
2.3.5.2 Sistema de Secreção do Tipo 4	16
2.3.5.3 Sistema de Secreção do Tipo 6	18
2.3.5.5 Sistema de Secreção do Tipo 3	19
2.3.5.5.1 Estrutura do Complexo do SST3.....	22
2.3.5.5.2 Complexo da membrana interna	23
2.3.5.5.3 Complexo de membrana externa	23
2.3.5.5.4 Componentes extracelulares.....	24
2.3.5.5.5 Regulação da expressão dos genes <i>hrp/hrc</i>	24
2.3.5.6 SST3 em <i>H. rubrisubalbicans</i>	26
3. JUSTIFICATIVA	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL.....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 BACTÉRIAS	33
5.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	33
5.2.1 Meios empregados para o cultivo de <i>H. rubrisubalbicans</i>	33
5.2.2 Antibióticos	35
5.2.3 Manutenção das estirpes bacterianas.....	35
5.3 MICROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	36
5.4 INOCULAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> SELVAGEM M1	

E MUTANTES TSN E TSE EM VEGETAIS	36
5.4.1 Cultivares vegetais	36
5.4.2 Desinfecção das sementes	36
5.4.3 Condições de cultivo	37
5.4.4 Preparo dos inóculos de <i>H. rubrisubalbicans</i>	38
5.4.5 Inoculação das plantas com <i>H. rubrisubalbicans</i>	39
5.5 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE BACTÉRIAS <i>H. rubrisubalbicans</i> M1, <i>hrpE</i> E <i>hrcN</i> COLONIZANDO ENDOFITICAMENTE FOLHAS E RAÍZES DE ARROZ, MILHO E CANA MICROPROPAGADA.	39
5.6 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO E PESO SECO DAS RAÍZES E FOLHAS DE PLÂNTULAS DE MILHO E ARROZ INOCULADAS COM <i>H.</i> <i>rubrisubalbicans</i> M1, <i>hrpE</i> E <i>hrcN</i>	40
5.7 ANÁLISE PROTEÔMICA	40
5.7.1 PREPARO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE PROTEÔMICA.....	40
5.7.2 PROTEÍNAS BACTERIANAS SECRETADAS.....	41
5.7.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	41
5.7.4 ISOELETROFOCALIZAÇÃO (IEF)	41
5.7.5 EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE GRADIENTE DE PH IMOBILIZADO.....	42
5.7.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE)	42
5.7.7 VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS	43
5.7.8 CAPTURA DAS IMAGENS.....	43
5.7.9 ANÁLISE DOS GÉIS	43
5.7.10 RETIRADA DE PROTEÍNAS DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS	44
5.7.11 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA	44
5.7.12 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA ATRAVÉS DE MALDI TOF TOF ...	45
5.7.13 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	45
5.8 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DO GRUPAMENTO GÊNICO <i>hrp/hrc</i> ..	45
5.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA	46
6. RESULTADOS	47
6.1 ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1	47
6.2 GENES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> ACESSÓRIOS AO SST3.....	52
6.3 GENES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> QUE PROVAVELMENTE CODIFICAM	

PARA PROTEÍNAS EFETORAS DO SST3.....	53
6.5 MICROSCOPIA ÓTICA E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE FOLHA DE CANA DE AÇÚCAR B-4362 INOCULADA COM <i>H. rubrisubalbicans</i> M1, TSE E TSN.	55
6.6 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE BACTÉRIAS <i>H. rubrisubalbicans</i> ESTIRPES M1 E TSE COLONIZANDO RAÍZES E FOLHAS DE CANA DE AÇÚCAR B-4362.....	57
6.7 EFEITO DAS MUTAÇÕES NOS GENES <i>hrcN</i> E <i>hrpE</i> SOBRE A COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DE RAÍZES DE ARROZ.....	58
6.8 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE <i>H. rubrisubalbicans</i> ESTIRPES M1 E TSE SOBRE O CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE ARROZ.	59
6.9 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE <i>H. rubrisubalbicans</i> ESTIRPES M1 E TSE SOBRE O CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO.....	62
6.10 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 DURANTE O CULTIVO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO EXTRATO DE CANA DE AÇÚCAR B-4362.....	64
7. DISCUSSÃO	68
8. CONCLUSÕES.....	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos principais fatores limitantes do crescimento vegetal. O ganho na produtividade de grãos após a revolução verde foi consequência principalmente do uso de enormes quantias de pesticidas e fertilizantes químicos. A produção e uso destes fertilizantes, no entanto, causam grandes danos ambientais (Reddy et al, 2002). A fixação biológica de nitrogênio, realizada por bactérias diazotróficas, é uma alternativa viável para suprir nitrogênio para as plantas, sem causar danos (Alves et al, 2003).

Entre os microrganismos diazotróficos endofíticos, ou seja que são capazes de colonizar internamente os tecidos vegetais e fixam o nitrogênio atmosférico em amônia, encontram-se representantes dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* (Baldani et al., 1997), além de cianobactérias e actinomicetes (Postgate et al., 1982). Experimentos de inoculação de gramíneas com alguns destes microrganismos demonstraram o fornecimento da ordem de 30% do nitrogênio necessário para planta (Baldani et al, 1996), implicando, portanto, que o uso destes na agricultura brasileira representará uma economia anual de US\$ 1,339 bilhão em fertilizantes nitrogenados.

As bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* são bactérias diazotróficas-associativas, endofíticas, Gram-negativas, vibrióides, membros da classe das Proteobactérias (Baldani et al., 1986; Baldani et al., 1996). Essas bactérias colonizam o interior das raízes de milho, trigo, arroz e sorgo (Boddey et al., 1995) e também foram encontradas em colmos e folhas de arroz e cana de açúcar (Pimentel et al, 1991).

O *Herbaspirillum rubrisubalbicans* promove o crescimento vegetal (James et.al., 1997), mas também é capaz de atuar como um fitopatógeno causando a doença da estria mosqueada na variedade norte-americana B-4362 de cana-de-açúcar e na variedade chinesa Taiwang de cana de açúcar, e estrias vermelhas em variedades de sorgo (Tan et. al., 2010, Pimentel et al., 1991). O nome da espécie deriva de *ruber*, vermelho, e *subalbicans*, esbranquiçado, uma referência ao sintoma da doença estria mosqueada,

caracterizada pelo desenvolvimento de estrias vermelhas com manchas brancas nas folhas de cana-de-açúcar. O ponto de inoculação da bactéria torna-se vermelho e necrótico (Olivares et al, 1997).

Como o *H. rubrisubalbicans* é uma bactéria promotora do crescimento vegetal que pode ter um comportamento fitopatogênico dependendo da variedade da planta, ele tornou-se um interessante modelo de estudo de interação planta bactéria.

O sequenciamento parcial do genoma de *H. rubrisubalbicans* M1 revelou a presença de genes homólogos aos dos genes *hrc/hrp* que codificam para as proteínas do Sistema de secreção do tipo 3 (SST3). Este sistema está presente nas bactérias Gram-negativas simbióticas, saprofíticas e endofíticas patógenos de animais e vegetais, (Hueck, 1998) e secreta proteínas efetoras diretamente no citoplasma das células eucarióticas. Essas proteínas efetoras controlam o metabolismo da célula hospedeira para obter vantagens para a bactéria e para reprimir os mecanismos de defesa (Mota et al, 2005).

Estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1 nos genes *hrpE* e *hrcN* foram incapazes de causar a doença da estria mosqueada na variedade de cana de açúcar B-4362, indicando que o SST3 é importante para o desenvolvimento desta doença (Schmidt et al, 2012). Nosso desafio foi determinar se este sistema de secreção (SST3) está envolvido com o comportamento endofítico. Além disso a capacidade destas bactérias mutantes de se comportar como promotor do crescimento vegetal em plantas de arroz e milho foi determinada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Herbaspirillum rubrisubalbicans é uma bactéria diazotrófica e endofítica, pertencente à classe β do filo Proteobactéria. É uma espécie fitopatogênica originalmente descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans* e que foi incluída no gênero *Herbaspirillum* com base em estudos moleculares (Baldani et al, 1996). O *H. rubrisubalbicans* pode ser isolado do interior de raízes, caule e folhas de várias gramíneas de interesse econômico como cana-de-açúcar, arroz e sorgo (Baldani et al, 1996).

O *H. rubrisubalbicans* pode causar a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 e na variedade chinesa Taiwang de cana de açúcar e estrias vermelhas em sorgo (James et al, 1997; Tan et. al., 2010; Pimentel et. al., 2001). O nome da espécie deriva de *ruber*, vermelho, e *subalbicans*, esbranquiçado, referindo-se aos sintomas da doença estria mosqueada nas folhas da cana-de-açúcar (Olivares et. al., 1997). É uma doença que perdeu a importância econômica, que afeta poucas variedades e não mata a planta, apenas diminui a área fotossintética e a vida útil da folha (Christopher & Edgerton, 1992; Olivares et. al., 1997).

2.2 DOENÇA DA ESTRIA MOSQUEADA

A doença da estria mosqueada, causada pelo *H. rubrisubalbicans*, foi descrita primeiramente no estado da Louisiana (EUA) em 1932. É uma doença de pouca importância econômica e afeta somente algumas variedades de cana-de-açúcar (Christopher & Edgerton, 1992).

A variedade de cana-de-açúcar B-4362, de Barbados, é suscetível a esta doença (Olivares et al, 1997). A inoculação de *H. rubrisubalbicans* nas folhas desta variedade provoca sintomas típicos da doença. O ponto de inoculação torna-se vermelho e necrótico e no sétimo dia ocorre a formação de estrias vermelhas ao longo dos vasos perto do ponto de inoculação,

acompanhado de clorose (Figura 1). Neste estágio, a bactéria é encontrada preenchendo completamente o protoxilema e parcialmente o metaxilema da região que foi afetada com as estrias vermelhas. No vigésimo dia a bactéria bloqueia os vasos do meta e protoxilema e ocorre uma necrose ao redor do ponto de inoculação. A estria mosqueada aumenta desde o ponto de inoculação tanto em direção ao topo como para a base da folha, à medida que a bactéria avança no interior dos vasos da folha (Olivares et al, 1997).

FIGURA 1 – CANA-DE-AÇÚCAR B-4362 INOCULADA COM *H. rubrisubalbicans* ESTIRPE M1.



Sintomas típicos da doença da estria mosqueada em cana-de-açúcar da variedade B-4362 sete dias depois de inoculada com *H. rubrisubalbicans*. A estrela aponta a doença, a seta larga o espalhamento e a seta menos o ponto de inoculação. FONTE: OLIVARES *et al.* 1997.

A extensa colonização bacteriana resulta na expansão dos espaços intercelulares e subsequente compressão das células do hospedeiro. As colônias bacterianas podem eventualmente passar dos vasos para dentro do mesófilo circundante, podendo atingir os estômatos reduzindo o tempo de vida médio das folhas em aproximadamente 75 dias. A planta hospedeira responde

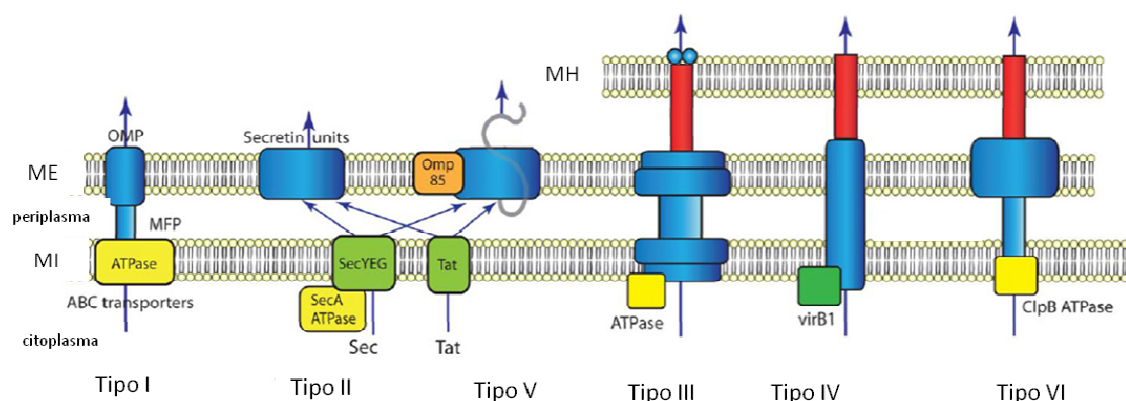
com produção de compostos fenólicos intercelulares e de goma para provavelmente restringir o desenvolvimento bacteriano dentro dos vasos e confinar as bactérias em grandes colônias. Além disso, ocorre morte localizada de células, um processo denominado de Resposta Hipersensitiva (RH) (Hueck, 1998). Esta resposta é consequência da comunicação entre a bactéria e a planta quando elas não estão em uma relação compatível.

Muitas bactérias gram-negativas dependem do Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3) para interagir com as células do hospedeiro eucariótico. Este sistema pode estar envolvido na translocação de proteínas responsáveis pela patogenicidade da bactéria através da parede celular vegetal (Ghosh, 2004).

2.3 SISTEMAS DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS

O termo secreção da bactéria utilizado para descrever o transporte ativo de proteínas do citoplasma, através da membrana para a superfície ou ainda no interior das células eucarióticas. Nas bactérias gram-negativas, os sistemas de secreção de proteínas podem ser divididos em seis diferentes tipos (1-6). Essa classificação foi primeiramente baseada nas características de secreção das proteínas pela membrana externa (Gerlach & Hensel, 2007). Os sistemas de secreção 1, 3, 4 e 6 podem exportar proteínas através das membranas internas e externas através de um único passo acoplado ao consumo de energia. Os sistemas de secreção do tipo 2 e 5 exportam proteínas através das duas membranas em dois passos distintos, utilizando o sistema geral de secreção (Sec) ou sistema Tat para a passagem através da membrana interna (Saier, 2006). A Figura 2 resume as principais características dos sistemas de secreção conhecidos.

FIGURA 2 – SISTEMAS DE SECREÇÃO – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICA

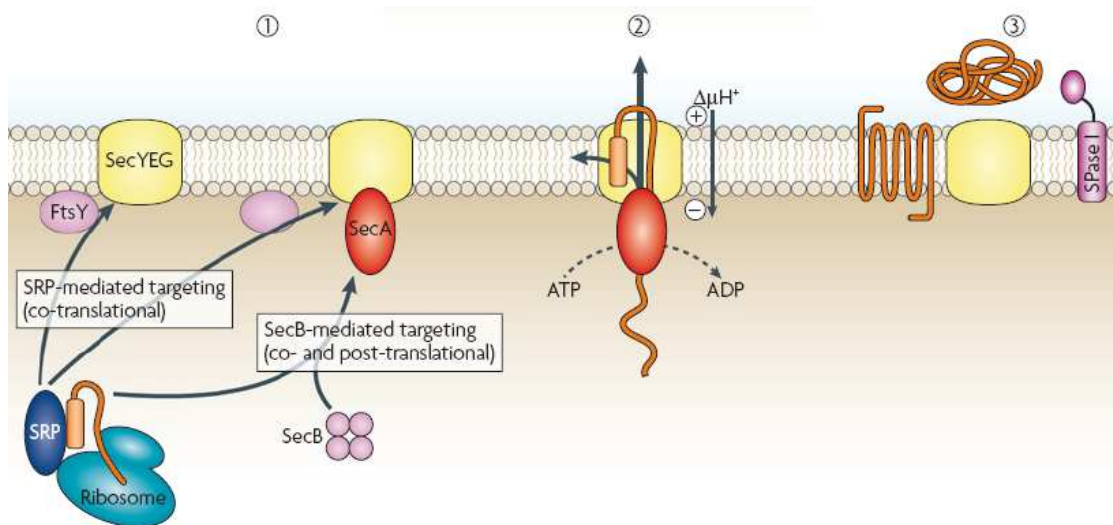


Tipos de sistemas de secreção presentes em bactérias gram-negativas
 MH: Membrana do hospedeiro, ME: Membrana externa; MI: Membrana Interna; MFP: proteína de fusão de membranas; OMP: proteína da membrana externa. ATPases e chaperonas são mostradas em amarelo (Fonte: TSENG, 2009).

2.3.1 Sistemas Sec

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

Depois desta primeira etapa o peptídeo sinal é clivado por peptidases periplasmáticas e então a proteína se encontra no seu estado maduro (Figura 3). Esta proteína poderá atravessar a membrana externa por diferentes caminhos: (i) por um complexo de secreção ou Sistema de Secreção do Tipo 2, (ii) por um sistema auto-transportador ou Sistema de Secreção do Tipo 5.

FIGURA 3 - ESQUEMA GERAL DO SISTEMA Sec DE SECREÇÃO

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

2.3.2 Sistema Tat

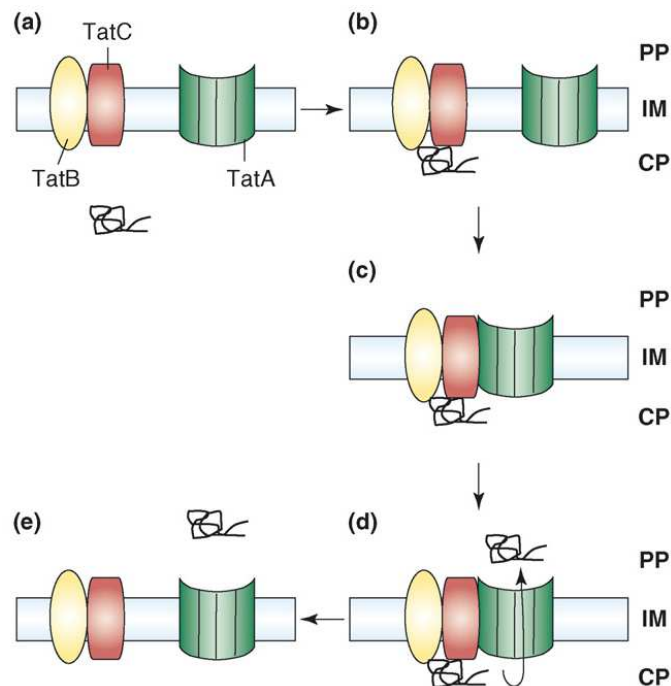
O Sistema Tat (Twin-arginine Translocator) é uma via de transporte de proteínas presente em Bacteria, Archea e em cloroplastos. Proteínas transportadas por este sistema possuem um motivo de argininas geminadas no peptídeo sinal. O sistema Tat está localizado na membrana interna e de maneira geral é composto por 3 tipos de proteínas integrais de membrana: TatA, TatB e TatC (Cline & McCaffery, 2007) (Figura 4).

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

Na ausência de proteínas transportadas por este sistema, os dois complexos encontram-se separados. Quando um motivo de argininas geminadas no peptídeo sinal é reconhecido pelo complexo TatBC ocorre a associação dos dois complexos de uma maneira dependente da força próton

motriz. A proteína alvo é então translocada para o periplasma passando pelo canal formado pelas proteínas TatA e então os dois complexos se dissociam novamente (Palmer, Sargent & Berks, 2005; Buck, Lammertyn & Anné, 2008).

FIGURA 4 – MODELO DO TRANSLOCADOR TAT-DEPENDENTE



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

2.3.3 Sistema de Secreção do Tipo 2

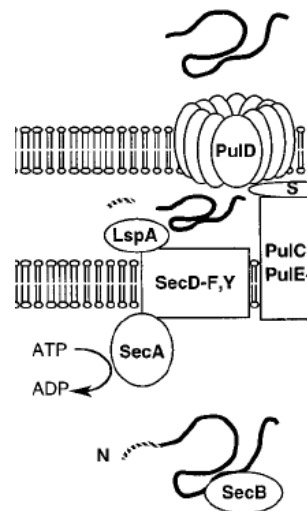
O SST2 é formado por aproximadamente 12 componentes, uma secretina de membrana externa, pseudopilinas, a pré-pseudopilina peptidase/metiltransferase e proteínas envolvidas na montagem do sistema e no reconhecimento do substrato (Cianciotto, 2005).

O primeiro SST2 caracterizado foi o de *Klebsiella oxytoca* por Pusgley e colaboradores (1997) e é formado pelas proteínas Pul (Figura 5).

Existem algumas evidências que sugerem que o SST2 pode estar

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

FIGURA 5 – ESQUEMA GERAL DO SST2 EM *Klebsiella oxytoca*



A proteína efetora é carregada até o espaço periplasmático pelo sistema Sec e o SST2 formado pelo conjunto de proteínas Pul atravessa a proteína madura para o espaço extracelular. LspA: peptidase periplasmática, entrega a proteína efetora no espaço periplasmático; PulD: componente da membrana externa (HUECK, 1998).

O SST2 ocorre em duas etapas. Em primeiro lugar, ele requer a ação das vias Sec ou Tat que transloca o substrato através da membrana citoplasmática. A partir do periplasma, o substrato dobrado é então transportado para o exterior da membrana pelo SST2 para alcançar o meio extracelular. Para este processo, o sistema se compõe de 11 a 16 componentes dependendo do organismo (Shutinoski, 2010). Para a construção da máquina do SST2 os componentes se distribuem por diferentes interações, proteína-proteína e proteína-membrana (Sandkvist, 2001; Filloux, 2004). Também tem sido observado que o SST2 tem uma relação evolutiva com o Sistema de secreção do tipo 4 (SST4), principalmente quanto a maquinaria molecular envolvida na formação do pilus (Peabody et al, 2003;. Filloux, 2004).

2.3.4 Sistema de Secreção do Tipo 5

O SST5 é também conhecido como auto-transportador. Mais de 700 proteínas auto-transportadoras são encontradas hoje em bactérias Gram-negativas. A análise de diferentes genomas revelou a presença destas proteínas em diferentes bactérias como *Brucella abortus*, *Bartonella spp.*, *Pseudomonas spp.* e *E. coli*. As sequências destas proteínas podem ser muito parecidas, porém não deixam de ser específicas para cada organismo (Pallen 2003).

O SST5 pode ser subdividido em 3 outros sistemas ou sub-sistemas: o sistema de autotransporte (V_a), o sistema de secreção de dois componentes (V_b) e o sistema V_c (autotransporte do tipo 2).

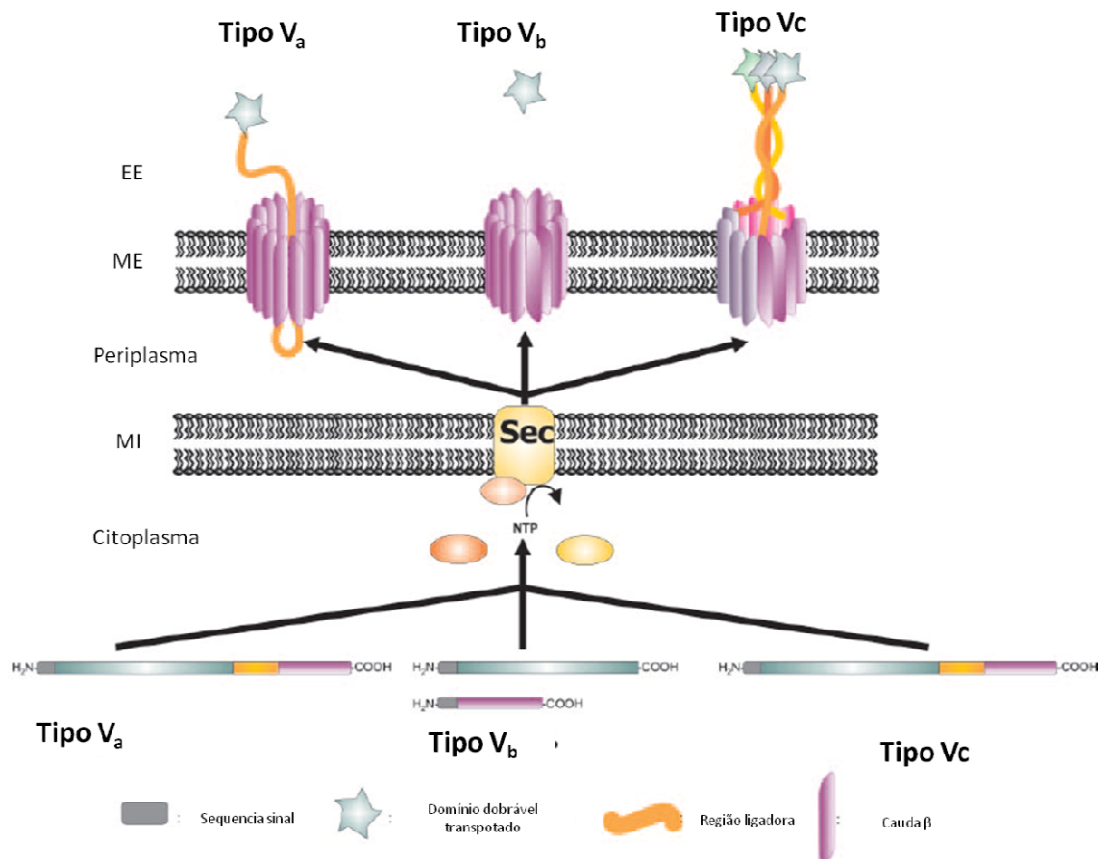
As proteínas que fazem parte do sistema V_a são capazes de se translocar através da membrana externa sem a ajuda de proteínas acessórias. Essas proteínas geralmente contêm 3 domínios: a sequência sinal, o domínio que será transportado ou domínio α , e a unidade de translocação ou domínio β . A sequência sinal é necessária para a passagem através da membrana interna, pelo sistema Sec ou Tat. O domínio β tem uma estrutura em forma de barril que fica embebida na membrana externa e é responsável pela translocação do domínio α que é o domínio efetor. O domínio α pode ser processado e separado dos demais domínios, ou pode continuar ancorado nos outros domínios e exercer a sua função extracelular (Henderson et al, 2004).

O sistema V_b ou TPS (*two-partner secretion*) é composto por duas proteínas membros da família TpsA e TpsB. As proteínas da família TpsA são chamadas de exoproteínas, domínio α , ou ainda de domínio passageiro, e possui a sequência sinal necessária para a translocação através da membrana interna. As proteínas TpsB são chamadas de domínio B formador de poro ou domínio transportador e são responsáveis pela translocação das proteínas TpsA (Jacob-Dubisson et al, 2004).

As famílias das adesinas oligoméricas – Coiled Coil – têm sido descritas como uma superfamília das autotransportadoras oligoméricas de superfície. Essas proteínas devido a sua estrutura terciária são secretadas diferentemente do sistema V_a , devido ao modo alternativo de secreção elas foram designadas

de sistema V_c . A proteína YadA é a adesina melhor caracterizada, sendo a principal adesina da bactéria enteropatogênica *Yersinia* spp (Gelarch & Hensel, 2007). Os modelos esquemáticos dos tipos do SST5 estão mostrados na FIGURA 6.

FIGURA 6 - RESUMO ESQUEMÁTICO DOS TIPOS DE SST5



Secreção de proteínas do tipo AT ou V_a está representado do lado esquerdo do diagrama, as TPS ou tipo V_b no centro e do tipo V_c ou AT-2 esquematizada a direita. São mostrados quatro domínios funcionais: a sequência sinal, o domínio a ser transportado, a região de ligação e o domínio β (Fonte: Henderson, 2004)

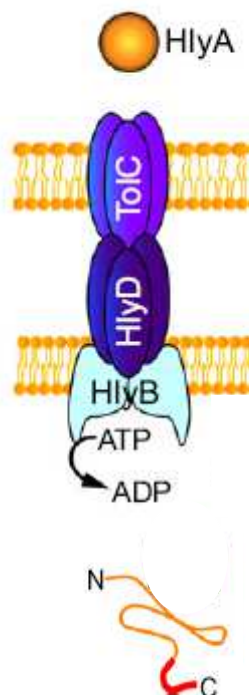
2.3.5 Sistemas Sec-independentes

Em contraste com os sistemas de secreção dos tipos 2 e 5, os sistemas do tipo 1, 3, 4, e 6 exportam proteínas através das membranas internas e externas através de um processo contínuo sem a necessidade de um sistema acessório (Hueck, 1998).

2.3.5.1 Sistema de Secreção do Tipo 1

O SST1 é um transportador do tipo ABC que forma um complexo heterotrimérico intermembranar constituído por uma proteína exportadora de membrana interna, uma proteína de fusão (entre as membranas) e uma terceira proteína formadora de poro na membrana externa. Este sistema permite a secreção de uma vasta gama de substratos que podem ser protéicos ou não, a partir do citoplasma para o espaço extracelular em uma única etapa, sem um passo intermediário periplasmático (Figura 7). A maioria das proteínas ou substratos descritos até agora possuem uma sequência C-terminal altamente conservada que forma estruturas secundárias conservadas reconhecidas por este sistema e esta porção não é clivada durante o processo de secreção (Gerlach & Hensel, 2007).

FIGURA 7 – EXEMPLO DE TRANSPORTE DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO 1



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

membrana externa TolC age como um canal trimérico hidrofílico exportador do sistema (Gerlach & Hensel, 2007).

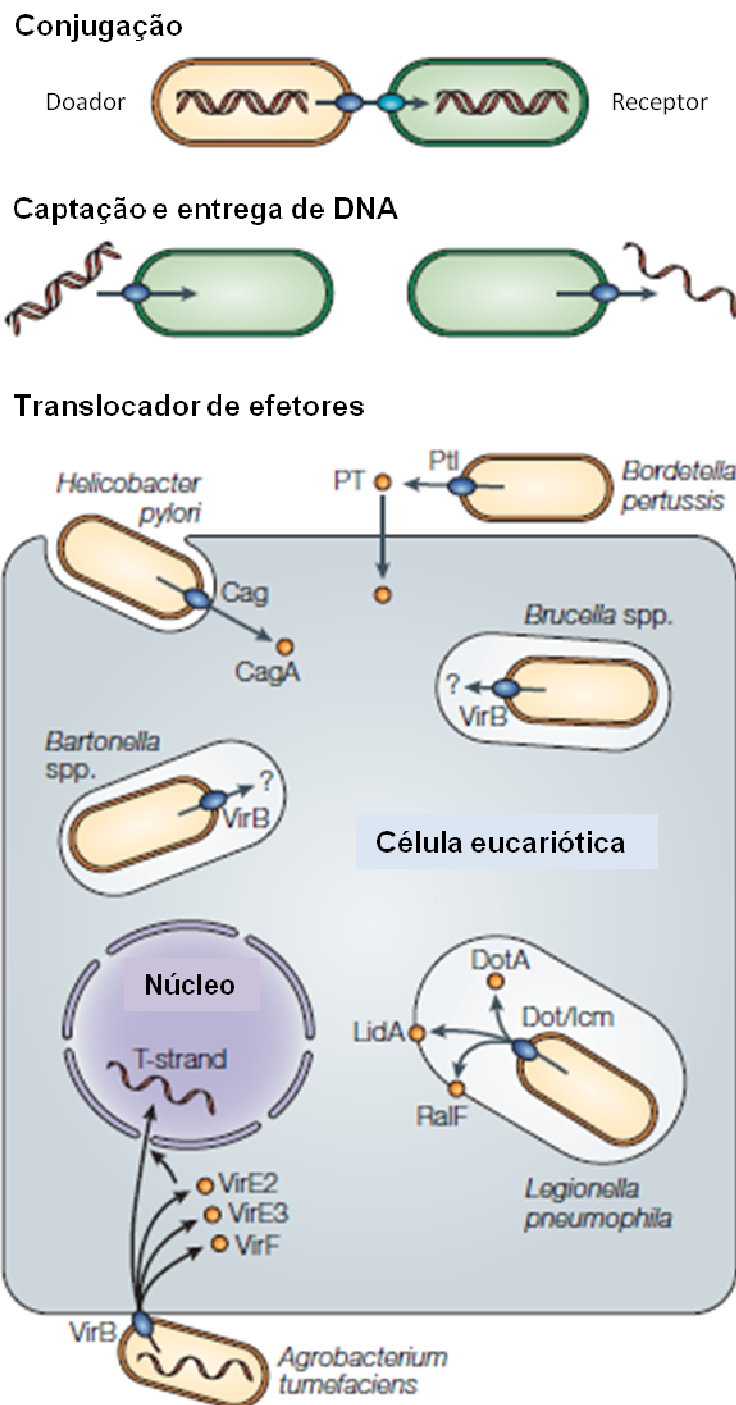
2.3.5.2 Sistema de Secreção do Tipo 4

Diferentemente dos modelos de secreção já descritos aqui o SST4, assim como o Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3) e o Sistema de Secreção do Tipo 6 (SST6), secretam as proteínas exportadas diretamente dentro da célula receptora e não no espaço extracelular.

Os membros da família do SST4 podem ser subdivididos em 3 grupos. O primeiro é o sistema de conjugação, que transfere DNA a células receptoras. O segundo é o translocador efetor, que transfere moléculas consideradas efetoras para células eucarióticas durante a infecção. E finalmente o sistema de captação e liberação de DNA, mediando troca de DNA com o meio (Ding, 2003). O sistema de conjugação tem por definição estabelecer um contato físico com a célula-alvo, que receberá o DNA. Embora o sistema de conjugação seja conhecido por translocar moléculas de DNA entre as bactérias ele também é capaz de translocar proteínas para células eucarióticas, tanto vegetais quanto animais (Dehio, 2008). Esse tipo de translocação pode ser reconhecido como mecanismo de virulência e várias cepas patogênicas possuem este artefato como *Helicobacter pylori*, *Brucella* spp., e *Bartonella* spp.

Para recrutar proteínas presentes no citoplasma o sistema conta com um homohexâmero VirD4 chamada de “coupling protein” (CP) ou proteína acopladora. A estabilidade da interação com CP faz com que o substrato efetor se ligue a proteína transmembranar VirB10, que forma um canal entre as membranas. Várias proteínas Vir fazem parte deste canal, cada uma com funções diferentes, como formar o canal intermembranar, atuar como secretinas, ou ainda, formar o poro na membrana externa da bactéria. VirB4 e VirB11 atuam como ATPases energizando a translocação e a polimerização do *pilus*. O *pilus* extracelular é uma estrutura de forma alongada, composto principalmente por subunidades de VirB2, outras proteínas como VirB5 e VirB7 também podem contribuir para a formação do *pilus* como mostra a Figura 8 (Gerlach & Hensel, 2007).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES MECANISMOS DE SECREÇÃO DO SST4



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

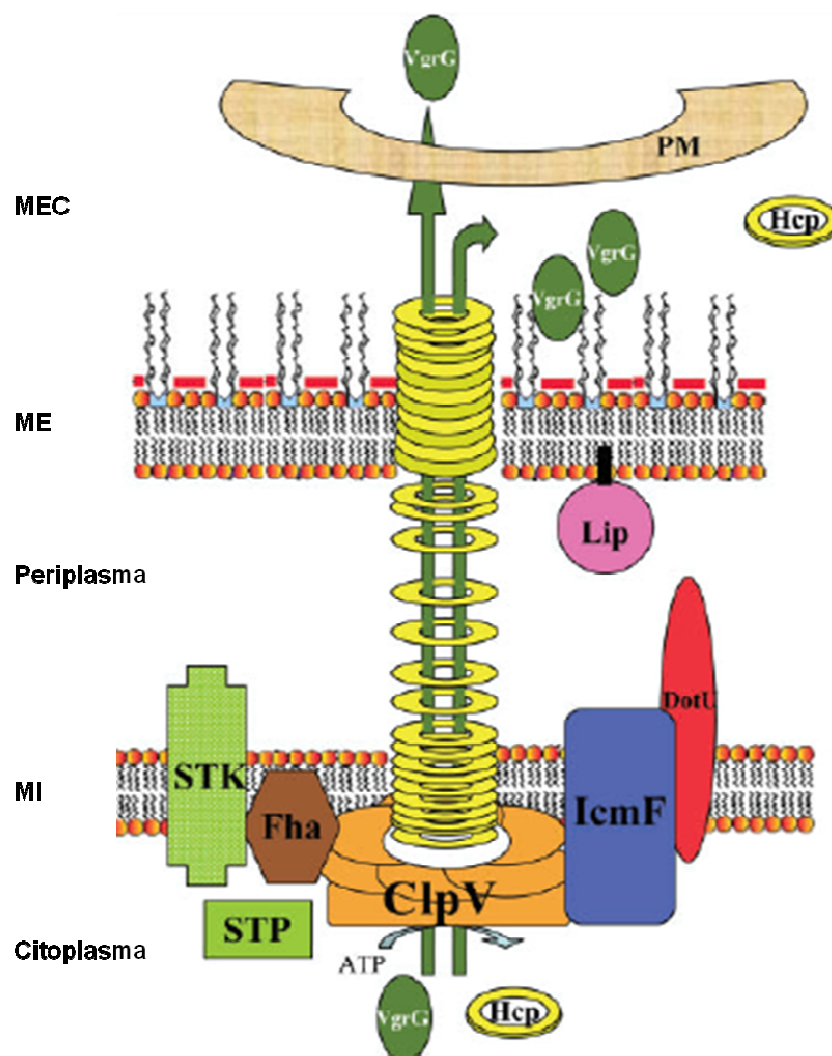
2.3.5.3 Sistema de Secreção do Tipo 6

Estudos de bioinformática identificaram um conjunto de genes altamente conservados em diversos patógenos gram-negativos. Estes genes devido a homologia com o gene *icmF*, foram chamados IAHP do inglês *lcmF-associated homologous protein*. O gene *icmF* codifica para uma proteína associada ao SST4. As proteínas IAHP apesar da homologia com a *lcmF* não estão envolvidas com o SST4, indicando que elas formariam um sistema de secreção diferenciado (Figura 9).

Em 2006, Puzatzki e colaboradores identificaram um conjunto de genes necessários para a citotoxicidade de *Vibrio cholerae* sobre o *Dictyostelium discoideum*. Estes genes foram chamados de *vas*, do inglês “virulence associated secretion”. As proteínas Vas juntamente com as IAHP formam um sistema que estaria envolvido na translocação extracelular de proteínas que não possuem uma sequência líder hidrofóbica, na região N-terminal e foi denominado Sistema de Secreção do Tipo 6. Como várias bactérias patogênicas gram-negativas possuem esse conjunto de genes foi sugerido que a função do SST6 seria o transporte extracelular de fatores de virulência e sua translocação para a célula eucariótica (Pukatzki et al, 2006).

A maquinaria do SST6, assim como em outros sistemas de secreção, é definido por um conjunto de componentes originais. O cluster de genes do SST6 codifica entre 12 e 25 proteínas, das quais DotU e *lcmF* são encontradas também no SST4. Os genes que codificam para as proteínas efetoras secretadas por esse sistema não se encontram neste cluster, podendo estar bem distantes, em outro locus. A maioria dos genes deste cluster tem a função desconhecida. Dentre as conhecidas encontra-se uma ATPase, frequentemente utilizada pelos sistemas de secreção para energizar o processo de transporte (Neuwald et al, 1999).

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SST6



ATPase ClpV em laranja ajuda a transportar Hcp (amarelo) e VgrG (verde escuro) através do envelope da célula. Lip (rosa) é uma lipoproteína putativa de membrana. O nível de fosforilação de Fha (marrom) regula a atividade do SST6 e a STP (verde claro) é a fosfatase. IcmF (azul) e DotU (vermelho) são proteínas de membrana interna. IM – Membrana Interna, P – periplasma, OM - Membrana externa, ECM – Meio Extracelular e PM – Membrana do Hospedeiro (Filloux, Hachani & Bleves, 2008).

2.3.5.5 Sistema de Secreção do Tipo 3

A infecção de uma planta por um fitopatógeno pode desencadear uma reação de hipersensibilidade (HR), que acontece através da morte celular programada que limita o ataque dos patógenos, ou pode ainda levar ao desenvolvimento da doença (Goodman & Novacky, 1994). A compatibilidade e incompatibilidade entre a bactéria e a planta são controladas por um conjunto de genes bacterianos que codificam para proteínas efetoras secretadas pelo

SST3 (Goodman & Novacky, 1994) e seus respectivos receptores vegetais (Mudgett & Staskawicz, 1998; Hueck, 1998; Goodman & Novacky, 1994). As proteínas efetoras bacterianas são denominadas proteínas Avr (avirulentas) e as proteínas correspondentes nas plantas denominadas proteínas R (de resistência). Os genes bacterianos necessários para patogenicidade em plantas suscetíveis e para desencadear a reação de hipersensibilidade em plantas resistentes foram denominados *hrp* (de *hypersensitive response and pathogenicity*), sendo que aproximadamente nove deles são altamente conservados e foram chamados de *hrc* (Hueck, 1998; Cornelis & van Gijsegem, 2000). Os genes *hrp/hrc* que codificam para as proteínas do SST3 estão agrupados em megaplasmídeos (*Ralstonia solanacearum*) ou no genoma (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* e *Xanthomonas campestris*), nas “Ilhas de Patogenicidade” (Hueck, 1998). A expressão dos genes *hrp* é controlada por sinalizadores vegetais e fatores ambientais como pH, força osmótica e repressão metabólica (Rahme et al., 1992; Xiao et al., 1992; Goodman & Novacky, 1994).

Muitas bactérias gram-negativas patógenas utilizam o Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3) para injetar as proteínas efetoras dentro das células eucarióticas, fazendo com que as vias de sinalizações das células da planta sejam alteradas. Essas mudanças podem resultar em um desarmamento da resposta imune criando um nicho celular para a estabilização e colonização da bactéria no interior da planta (Hueck, 1998).

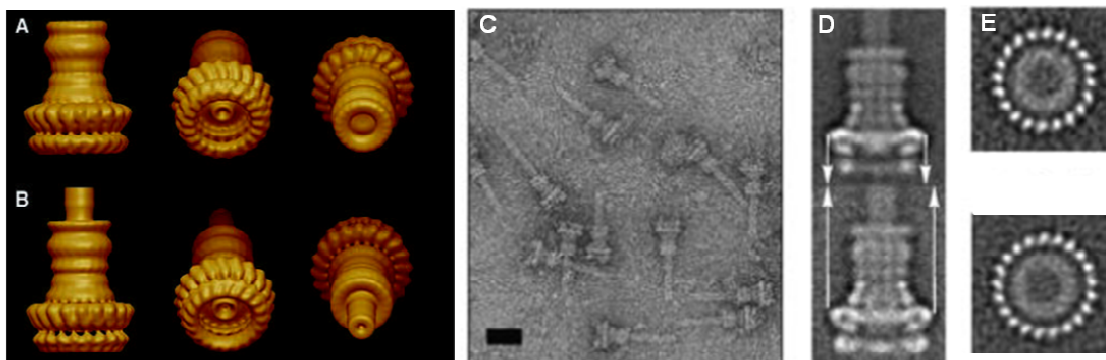
O SST3 é uma maquinaria macromolecular que consiste de componentes estruturais do próprio aparato, das proteínas secretadas, chaperonas e reguladores citoplasmáticos. O aparato é composto por um corpo basal que se distribui entre as duas membranas bacteriana e uma agulha extracelular vinda da superfície da bactéria. O corpo basal possui simetria rotacional e é composto por dois anéis integrados as membranas e proteínas periplasmáticas (Yip, 2006, Moraes, 2008). A projeção da agulha do corpo basal se dá pela polimerização de uma fina agulha. Tanto o corpo basal quanto a agulha, possuem um canal central que serve de caminho onde as proteínas secretadas atravessam. Havendo o contato com a membrana celular do hospedeiro, o SST3 exporta dois tipos diferentes de proteínas: as

translocadoras, que formam um poro na membrana e as efetoras que trafegam por este poro até a célula do hospedeiro. Conforme o SST3 funcional é construído, diferentes estágios durante a montagem requerem substratos específicos para serem transportados, para atravessarem e cada passo entre os acontecimentos (Sukhan, 2001).

O SST3 é formado por aproximadamente 20 proteínas, sendo que a maioria está localizada na membrana interna da bactéria (Hueck, 1998). Também fazem parte do sistema uma proteína formadora do poro da membrana externa e uma ATPase citoplasmática, provavelmente ancorada à membrana interna (Hueck, 1998; Thanassi & Hultgren, 2000). Essas proteínas associam-se em uma estrutura supramolecular que lembra uma seringa com uma agulha, denominada injectiossoma (Figura 10) (Cornelis, 2006). A agulha do injectiossoma, denominada “pilus Hrp” em fitopatógenos, atravessa as membranas interna e externa, fazendo contato com a membrana do hospedeiro (Li et al., 2002; Hueck, 1998; Galan & Collmer, 1999; Thanassi & Hultgren, 2000; Büttner & Bonas, 2002).

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

FIGURA 10 – MODELO ESQUEMÁTICO DO SST3

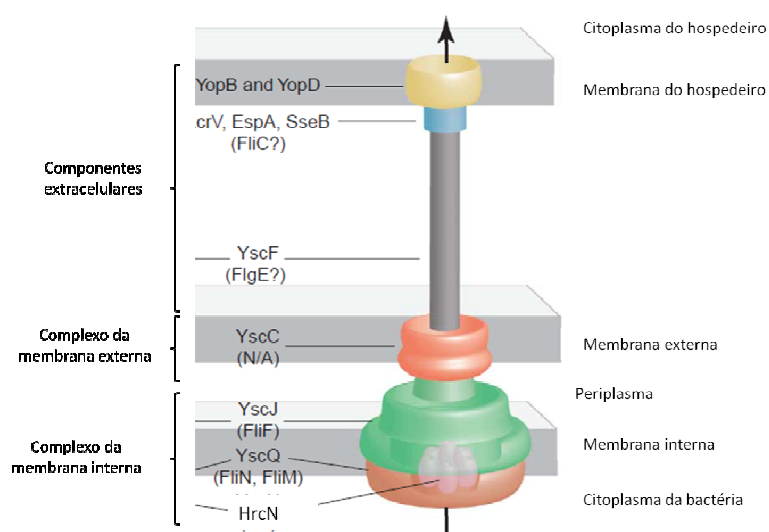


Em A a estrutura basal do sistema. Em B a região da agulha. C e D são imagens de microscopia eletrônica de varredura do complexo do SST3 de *Salmonella entérica*. Em E secção transversal dos anéis (Marlovits 2006).

2.3.5.5.1 Estrutura do Complexo do SST3

O complexo SST3 é formado por três partes principais: componentes extracelulares, complexo da membrana externa bacteriana e o complexo da membrana interna bacteriana (Figura 11).

FIGURA 11 - ESTRUTURA DOS COMPONENTES DO SST3 E SUAS LOCALIZAÇÕES



Modelo do SST3 e seus componentes principais construído com base em estruturas de cristais de alta resolução e empacotamento molecular (Yip & Strynadka, 2006).

2.3.5.5.2 Complexo da membrana interna

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

2.3.5.5.3 Complexo de membrana externa

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

2.3.5.5.4 Componentes extracelulares

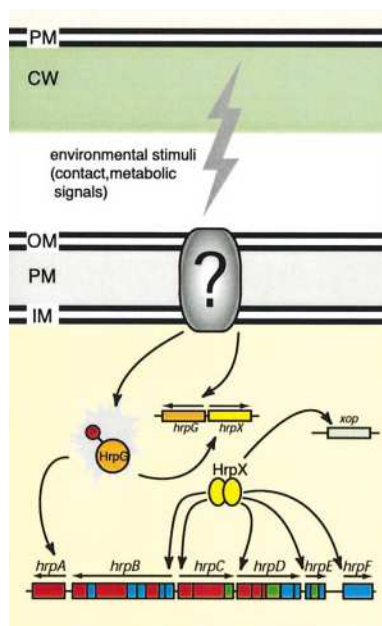
A porção extracelular do SST3 pode ser subdividida em três partes principais: a agulha, a ponta ou extensão da agulha e o poro de translocação (Moraes, Spreter & Strynadka, 2008). A agulha consiste em um polímero helicoidal composto por aproximadamente cem cópias de proteínas de uma mesma família (YscF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

2.3.5.5.5 Regulação da expressão dos genes *hrp/hrc*

Com base em similaridades genéticas, a organização e regulação dos genes *hrp/hrc* em bactérias fitopatógenas foram divididos em dois grupos: grupo I (Ex.: *E. amylovora* e *P. syringae*) e grupo II (Ex.: *R. solanacearum* e espécies de *Xanthomonas*). No grupo I os operons são ativados pela proteína HrpL, um membro da subfamília de fatores sigma de função extra citoplasmática (Frederick et al., 2001). Já no grupo II a expressão é controlada por HrpX, um ativador transcricional tipo AraC da família das OmpR. A análise do transcriptoma de *X. campestris* revelou que HrpG, através de HrpX, controla a regulação da transcrição dos genes *hrp/hrc* e os genes que codificam para as proteínas efetoras (Figura 12) (Cunnac, Boucher & Genin, 2004). Muitos dos

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

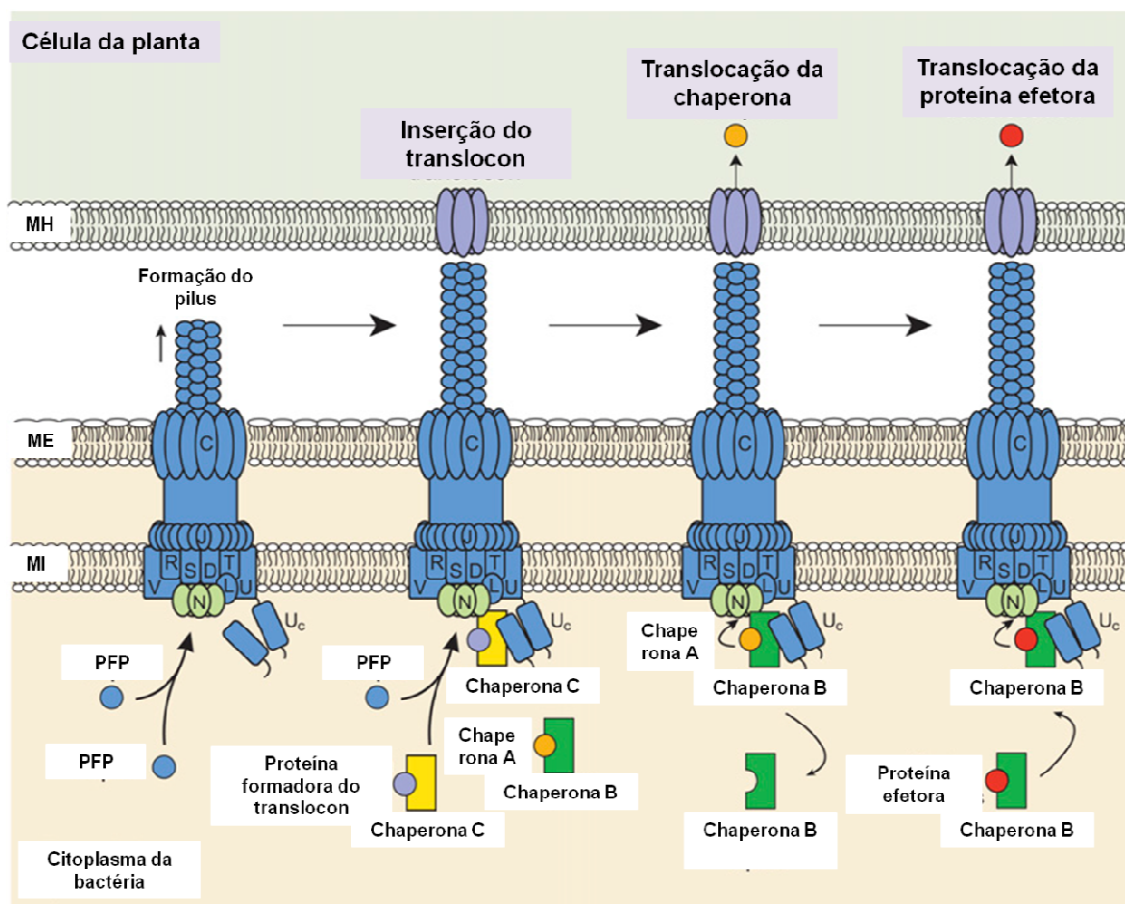
FIGURA 12 - MODELO DE REGULAÇÃO GÊNICA DO SST3 EM *X. campestris* pv. *Vesicatoria*



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

A Figura 13 mostra em resumo o funcionamento do SST3 em patógenos.

FIGURA 13 – MODELO DE FUNCIONAMENTO DO SST3



Modelo do SST3 na bactéria fitopatogena *X. campestris* pv *vesicatoria*. O aparato de secreção consiste de aproximadamente 20 proteínas, nove deles, rotulados aqui por apenas uma letra, que seriam antecedidas por Hrc (ou Hrp conservadas). Os primeiros substratos que atravessam o SST3 são as PFP – proteínas formadoras do pilus. Uma chaperona aqui chamada de C é ativada para fazer o transporte das proteínas formadoras do translocon. A chaperona B capaz de transportar as proteínas efetoras do citoplasma até a maquinaria do SST3 está então inibida por um chaperona A, que atravessa o sistema liberando seu lugar para a efetora, que assim se liga e atravessa até a célula do hospedeiro. Uc: Domínio C terminal reconhecedor. Todo esse sistema requer a atividade de uma ATPase, HrcN. MI, membrana interna, ME, membrana externa e MH membrana do hospedeiro. (Buttner & He, 2009)

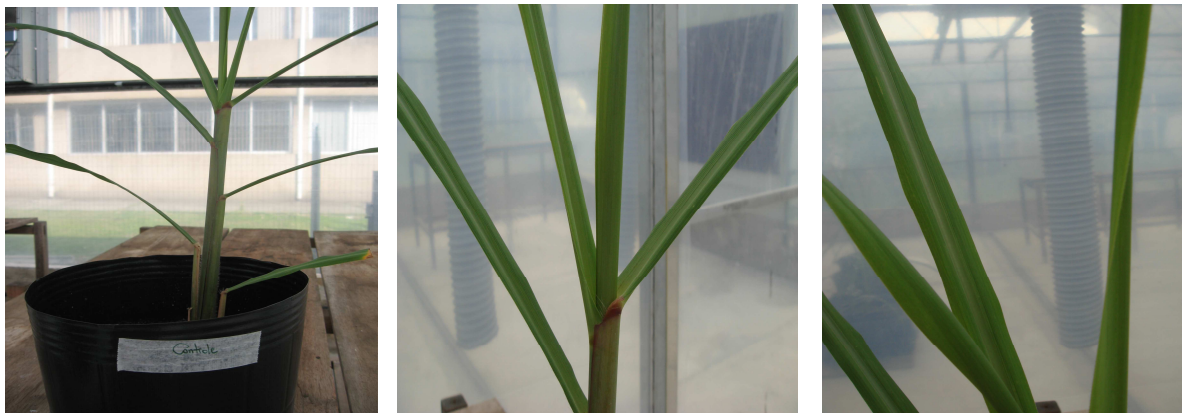
2.3.5.6 SST3 em *H. rubrisubalbicans*

Dados obtidos no Programa de Sequenciamento Genômico da bactéria endofítica *H. rubrisubalbicans* M1 mostraram a presença de genes homólogos aos que codificam para as proteínas do SST3. Para investigar o envolvimento do SST3 na interação entre a planta e a bactéria foram construídas duas estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1 nos genes *hrcN* (TSN) e *hrpE* (TSE) (Schmidt, 2009). A proteína HrcN é a ATPase do SST3. Durante o

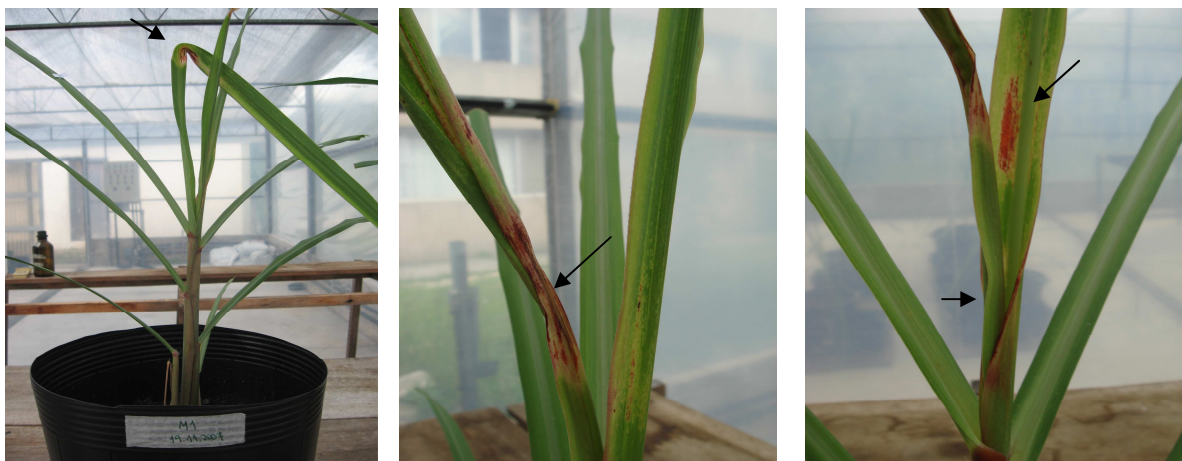
processo de exportação a ATPase, juntamente com outros componentes citoplasmáticos, se associa com o complexo de exportação na membrana interna aonde esta proteína forma um anel dodecamérico. O mecanismo de translocação ainda não é conhecido, mas a ATPase parece causar dissociação das proteínas que serão exportadas de suas respectivas chaperonas (Muller et al, 2006). As proteínas que interagem com a ATPase do SST3, como por exemplo a HrpE tem um papel importante no mecanismo e na regulação da secreção (Jhonson & Blocker, 2008). As estirpes mutantes *hrcN* e *hrpE* não causaram a doença da estria mosqueada em cana de açúcar B-4362 (Figura 14). Essas estirpes também não provocaram lesões nas folhas de *Vigna unguiculata* (Schmidt et. al., 2012). Esses resultados indicam que os produtos dos genes *hrcN* e *hrpE* estão envolvidos com o comportamento fitopatogenico de *H. rubrisubalbicans* M1. Nosso objetivo é verificar se este sistema está envolvido com o comportamento endofítico promotor do crescimento vegetal desta bactéria.

FIGURA 14 – INOCULAÇÃO DO CULTIVAR B-4362 DE CANA-DE-AÇÚCAR COM DIFERENTES ESTIRPES DE *H. rubrisubalbicans*

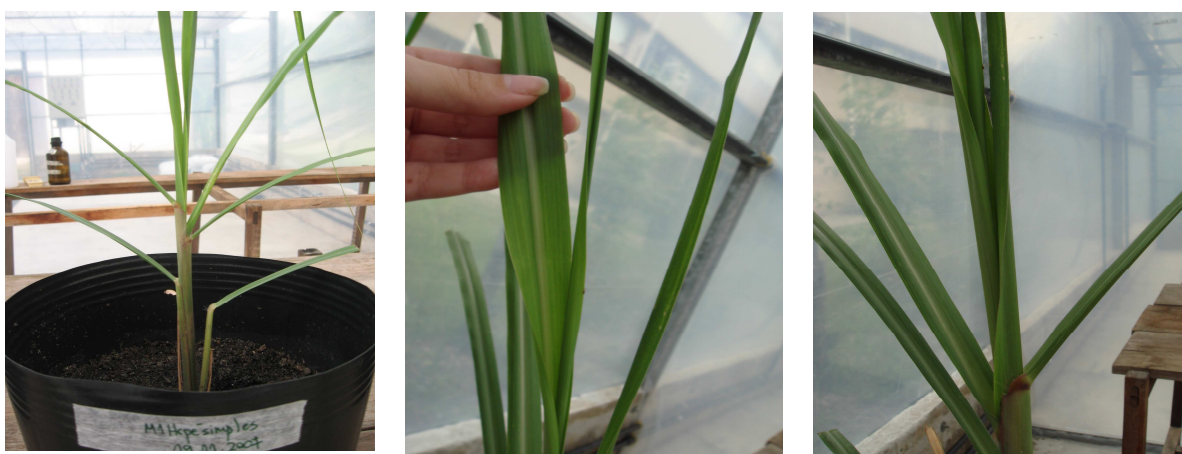
A



B



C



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

germinação. **B. Canas-de-açúcar da variedade B-4362 inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe M1.** A figura mostra três plantas de cana-de-açúcar da variedade B-4362 inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe M1 (10^8 células). Os colmos foram germinados em terra autoclavada, quatro meses depois inoculados com *H. rubrisubalbicans* M1. Quinze dias depois da inoculação as fotos foram tiradas. As flechas indicam pontos de colonização da bactéria aonde se desenvolveu a doença da estria mosqueada. **C. Canas-de-açúcar da variedade B-4362 inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe mutante TSE.** Três diferentes plantas de cana-de-açúcar da variedade B-4362 germinadas em terra autoclavada e inoculadas com *H. rubrisubalbicans* TSE (*hrpE*) (10^8 células) quatro meses após germinação. As fotos foram tiradas quinze após a inoculação da bactéria. Os sintomas da doença da estria mosqueada não apareceram (Schmidt et al, 2012).

2.4 ORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS E SUAS RELAÇÕES COM GRAMÍNEAS

Vários estudos têm mostrado o efeito positivo da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em gramíneas, especialmente de cana-de-açúcar e arroz, levando ao aumento da contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), além da promoção do desenvolvimento radicular, e aumento de biomassa e produtividade (FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Diversas pesquisas visando desenvolver inoculantes com melhores misturas de bactérias endofíticas têm sido realizadas. No entanto, já está bem definido que o sucesso da associação não depende somente da seleção de melhores estirpes de bactérias, mas ele é dependente também do genótipo da planta (GYANESHER *et al.*, 2002; KENNEDY *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Diferenças de comportamento entre genótipos vegetais em relação a associação com diazotróficos endofíticos forneceram as primeiras evidências de que genes da planta controlam, pelo menos em parte, o sucesso da associação. Estudos de diluição isotópica de ^{15}N mostraram que em alguns cultivares de cana-de-açúcar a obtenção de nitrogênio pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) é bem maior do que em outros, indicando que fatores genéticos da planta participam do controle da eficiência do processo de FBN (URQUIAGA *et al.*, 1992). Além disso, para garantir o sucesso da associação com os endofíticos, a planta deve manter um controle estridente sobre os processos de invasão e proliferação das bactérias para estabelecer um tipo

endofítico e não patogênico de associação. Evidências do controle da planta sob o caráter endofítico da associação são mostradas pelos genótipos de cana de açúcar que são susceptíveis, por exemplo, a *H. rubrisubalbicans*, desenvolvendo a doença da estria mosqueada, devido a uma proliferação acentuada das bactérias, que obstruem os vasos do xilema (OLIVARES et al, 1997).

No estabelecimento da associação, existe uma conversa inicial planta-bactéria que indica à planta se as bactérias são benéficas e não patogênicas, ou patogênicas e ineficientes. Em um segundo momento, então, vias de sinalização da planta conseguem distinguir o status da associação e ativar e/ou reprimir genes envolvidos em respostas de defesa e de promoção do crescimento vegetal.

3. JUSTIFICATIVA

O projeto de sequenciamento do *H. rubrisubalbicans* M1 permitiu a identificação de um “cluster” *hrp*, cujos produtos gênicos compõem a maquinaria do sistema de secreção do tipo 3, responsável por injetar proteínas efetoras produzidas pela bactéria dentro da célula hospedeira eucariótica. Estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* nos genes *hrpE* e *hrcN* foram incapazes de causar a doença da estria mosqueada na variedade de cana de açúcar B-4362, indicando que o SST3 é importante para o desenvolvimento desta doença. Neste trabalho efeitos da inoculação destes mutantes em outras variedades vegetais não compatíveis são analisados, elucidando assim se a participação do sistema de secreção do tipo 3 está somente no poder patogênico da bactéria.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Determinar se o sistema *hrp* está envolvido com o comportamento endofítico promotor do crescimento vegetal em *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar se a inoculação das estirpes mutantes *hrpE* e *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* causam alterações histológicas na folha de cana de açúcar diferentes daquelas observadas quando esta é inoculada com a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans*;
- Determinar o efeito da inoculação de plântulas de arroz e milho com as estirpes mutantes *hrpE* e *hrcN* de *H. rubrisubalbicans*;
- Determinar o perfil de proteínas secretadas de estirpes selvagem de *H. rubrisulbalbicans* cultivadas na presença do extrato de cana de açúcar B-4362;
- Identificar os spots proteicos diferencialmente expressas em *H. rubrisubalbicans* durante a associação bactéria-planta por espectrometria de massa.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Bactérias

As bactérias que foram utilizadas estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1- Estirpes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Bactéria	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referências
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>		
Estirpe		
M1	Estirpe selvagem	(BALDANI <i>et al.</i> , 1996)
TSE	M1 <i>hrpE</i> , Tc ^R , Km ^R	(SCHMIDT, 2012)
TSN	M1 <i>hrcN</i> , Tc ^R	(SCHMIDT, 2012)

5.2 Condições de cultivo

5.2.1 Meios empregados para o cultivo de *H. rubrisubalbicans*

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

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO NfbHP-Malato

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

Solução de Oligonutrientes:

	gramas/Litro
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	1
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175
H ₃ BO ₃	1,4
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,12
Água destilada q.s.p.	1 Litro

Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C a 1 atm.

No momento do uso foi misturado o cloreto de amônio ou glutamato de sódio (estocados a 1 mol/L) nas concentrações adequadas, e 5% (v/v) da mistura de fosfatos (159,4 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4).

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

5.2.2 Antibióticos

Foram utilizados os antibióticos nas concentrações descrita na tabela 3.

TABELA 3: ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>H. rubrisubalbicans</i>
Tetraciclina (Tc)	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Estreptomicina (Sm)	80 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Canamicina (Km)	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

As soluções estoque dos antibióticos estreptomicina e canamicina foram preparadas em água destilada autoclavada, esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,22 μm) e mantidas a -20°C . A solução estoque de tetraciclina foi preparada com etanol, e armazenada a -20°C .

5.2.3 Manutenção das estirpes bacterianas

As estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram estocadas a temperatura ambiente em meio NFb-Malato semi-sólido suplementado com 20 mmol/L de NH_4Cl .

5.3 MICROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Amostras das folhas da cana de açúcar B-4362 foram coletadas 21 dias após a inoculação com a estirpe M1, TSE e TSN de *H. rubrisubalbicans* e Smr1 de *H. seripedicae* e fixadas em glutaraldeído 2,5% (v/v) e 4% de formaldeído (em tampão fosfato 50 Mm). Os cortes foram preparados de acordo com James e colaboradores (1994) tanto para microscopia ótica quanto para microscopia eletrônica de transmissão. Os procedimentos foram executados no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

5.4 INOCULAÇÃO DAS ESTIRPES DE *H. rubrisubalbicans* SELVAGEM M1 E MUTANTES TSN E TSE EM VEGETAIS

5.4.1 Cultivares vegetais

Neste trabalho foram utilizadas sementes de arroz dos cultivares Nipponbare, Soberana e Maravilha, e sementes de milho híbrido simples da linhagem Pioneer cv. 30F53. A cana de açúcar utilizada foi do cultivar B-4362 e as plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas utilizadas nesse projeto foram cedidas pelo Laboratório de Micropropagação de Plantas do Deptº de Fitotecnia da UFPR.

5.4.2 Desinfecção das sementes

As sementes de arroz, previamente descascadas e as de milho foram esterilizadas superficialmente pela imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguida de incubação em uma solução de hipoclorito de sódio 1% e Tween 20 0,02% por 20 minutos. As sementes foram então lavadas três vezes com água destilada estéril.

5.4.3 Condições de cultivo

Após a esterilização das sementes de arroz e milho foram pré-germinadas em placas de petri contendo Ágar-água (1,5 gramas de ágar para 100 ml de água) autoclavado. As placas foram embrulhadas em papel alumínio e colocadas em estufa a 25 °C por 48 horas para o milho e 5 dias para arroz. Trinta plântulas foram inoculadas em 30 mL de cultura bacteriana (10^8 células) e transferidas individualmente para tubos contendo meio Hoagland semi-sólido e bolinhas de polipropileno. Para preparação do meio Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938), soluções estoque foram preparadas conforme a tabela 4 e a partir dessas a solução final era preparada.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO HOAGLAND

Componente	Solução estoque (g/L)	mL de estoque/L solução final
KNO ₃ 2M	202	2,5
Ca(NO ₃). 4H ₂ O 2M	472	2,5
Fe-EDTA	15	1,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O 2M	493	1
NH ₄ NO ₃ 1M	80	1
H ₃ BO ₃	2,86	1
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,81	
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,22	
CuSO ₄	0,051	
H ₃ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,09	
KH ₂ PO ₄ 1M	136	0,5

As plantas de cana de açúcar micropropagadas foram cedidas em meio mínimo. Para a execução do experimento elas foram transferidas para tubos contendo meio líquido MS (Tabela 5) e 14 dias depois as raízes foram inoculadas. Para os experimentos de microscopia os colmos de cana de açúcar

foram plantados em vasos contendo terra autoclavada e foram regados em dias alternados ou conforme a necessidade.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO MS

Solução	Concentração (g/L)
NH₄NO₃	1,65
KNO₃	1,9
H₃BO₃	6,2.10 ⁻³
KH₂PO₄	0,17
KI	8,3.10 ⁻⁵
Na₂MoO₄.2H₂O	0,44
CoCl₂.6H₂O	2,5.10 ⁻⁵
Cacl₂.2H₂O	0,44
MgSO₄.7H₂O	0,37
MnSO₄.H₂O	0,0169
ZnSO₄.7H₂O	8,6.10 ⁻³
CuSO₄.5H₂O	2,5.10 ⁻⁵
Na₂EDTA	0,03725
FeSO₄.7H₂O	0,02785
Tiamina	1.10 ⁻⁵
Glicina	2.10 ⁻³
Piridoxina	5.10 ⁻⁵
Ácido nicotínico	5.10 ⁻⁵
Mio-Inositol	0,1
Sacarose	30

5.4.4 Preparo dos inóculos de *H. rubrisubalbicans*

As estirpes foram crescidas por 24 horas ou até atingir D.O. ₆₀₀ 1,0 em meio NFbHP-malato, com adição de 50 mmol/L de solução estéril de fosfatos (159,5 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄), 20 mmol/L de cloreto de amônio (NFbHPN) e antibiótico.

5.4.5 Inoculação das plantas com *H. rubrisubalbicans*

As plantas de cana de açúcar micropropagadas foram inoculadas após enraizamento e tinham de 3 a 4 folhas. Após a inoculação elas foram mantidas em um fotoperíodo de 12 horas com temperatura controlada (25°C).

As plantas de cana de açúcar foram inoculadas por infiltração direta das bactérias no colmo. Com auxílio de uma seringa estéril, 1 mL da cultura em uma D.O.₆₀₀ 1,0, foi injetada 3 cm abaixo do início da primeira folha, no colmo. As plantas controle foram inoculadas com salina estéril.

As plântulas de arroz foram inoculadas, cinco dias após a germinação, com as estirpes de *H. rubrisubalbicans*. 30 plântulas foram incubadas com 30 mL de cultura D.O.₆₀₀ 1,0 em placas de petri por 15 minutos. As plantas foram transferidas para tubos individualmente e mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas, iluminadas por fotoperíodo de 16 horas.

Três dias após a germinação as plântulas de milho foram inoculadas. Para cada planta foi inoculado 1 mL da cultura da bactéria em D.O.₆₀₀ 1,0. As plantas foram transferidas para tubos que foram mantidos a temperatura constante (25°C) e fotoperíodo de 16 horas.

5.5 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE BACTÉRIAS *H. rubrisubalbicans* M1, *hrpE* E *hrcN* COLONIZANDO ENDOFITICAMENTE FOLHAS E RAÍZES DE ARROZ, MILHO E CANA MICROPROPAGADA.

Para determinar o número de bactérias endofíticas, as folhas e as raízes do arroz, milho e cana de açúcar micropropagada foram desinfectadas superficialmente com hipoclorito 6% (1 minuto) e etanol 70% por mais um minuto, lavadas com água, cortadas, pesadas e maceradas em 1 mL de solução salina estéril. Com os macerados foram feitas diluições seriadas em salina e plaqueadas em forma de gota (10µl) em NFbHPN-malato sólido e incubadas em estufa a 30°C. Trinta horas depois as microcolônias foram contadas e o número de bactérias por grama de folha foi determinado.

5.6 DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO E PESO SECO DAS RAÍZES E FOLHAS DE PLÂNTULAS DE MILHO E ARROZ INOCULADAS COM *H. rubrisubalbicans* M1, *hrpE* E *hrcN*.

Para determinação do comprimento das folhas e raízes foi utilizado uma régua milimétrica, sendo medidos sempre a raiz principal e a folha central de cada planta. Quinze plantas por experimento foram medidas e o experimento foi repetido três vezes.

Para verificação do peso seco as plantas foram seccionadas em parte aérea e raiz e colocadas em envelopes de papel. Cada envelope continha 5 plantas e três envelopes de cada tratamento foram necessários para a execução do experimento. Esses envelopes foram secos e pesados previamente. O peso foi determinado em balança analítica diariamente até alcançar valor constante. A análise estatística das repetições foi feita utilizando o teste t-student.

5.7 ANÁLISE PROTEÔMICA

5.7.1 Preparo da amostra para análise proteômica

Para determinação das proteínas secretadas pela estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* M1 na presença e ausência de extrato de cana foi feito um gel 2D e as proteínas que apresentavam um padrão diferenciado nas condições testadas foram identificadas por espectrometria de massa.

O extrato de cana de açúcar utilizado para o cultivo da bactéria foi obtido da cana de açúcar B-4362, utilizando um moedor de cana para extração do caldo. O extrato (800 mL) foi centrifugado a 15°C a 18800 g por 30 minutos por 3 vezes para a retirada de toda a fibra, em seguida o extrato foi filtrado em membrana de 0,22 µm de espessura com o auxílio de uma bomba de vácuo e então armazenado em freezer -70°C. O extrato de cana foi utilizado numa concentração de 5%, sendo adicionado ao meio (NfbHPN) antes da inoculação de *H. rubrisubalbicans* M1 no dia do preparo das células. E o tratamento controle consistiu na inoculação em meio sem a suplementação com extrato de cana. Após aproximadamente 6 horas de crescimento, a cultura suplementada

com caldo de cana atingiu D.O.₆₀₀ de 0,4. As células sem o caldo de cana atingiram D.O.₆₀₀ de 0,36 neste mesmo tempo, quando foram submetidas ao experimento.

5.7.2 Proteínas bacterianas secretadas

As culturas foram centrifugadas duas vezes por 20 minutos a 6.000 g de rotação, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de policarbonato de 0,4 µm para retirada de células remanescentes. Um inibidor de proteases (GE) foi adicionado e as proteínas foram concentradas em coluna da Milipore, com retenção de 10 KDa, centrifugando a 4.000 g até atingir o volume final de 2 mL. As proteínas foram precipitadas utilizando fenol (1 volume). As proteínas foram incubadas por 12 horas em acetato de amônio 0,1 M (preparado em metanol). A solução foi centrifugada por 15 minutos a 10.000 g e o *pellet* ressuspenso em 50 µL de água. Foram adicionados 950 µL de acetona e a amostra ficou incubando por 4 horas a -20°C. A amostra foi centrifugada novamente a 10.000 g por 15 minutos, a acetona retirada e o precipitado de proteína dissolvido em solução de lise (7 mol/L uréia, 2 mol/L tiouréia, 4% CHAPS e 0,5% Pharmalyte pH 3 – 10).

5.7.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada segundo a técnica descrita por Bradford (1979) utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Devido à interferência da solução de lise nesta técnica, a solução de lise (mesmo volume da amostra a ser dosada) foi adicionada ao branco.

5.7.4 Isoeletrofocalização (IEF)

A isoeletrofocalização das proteínas foi realizada em aparelho IPGphor (GE Healthcare). A IEF foi feita em tiras IPG com gradiente imobilizado de pH (GE Healthcare). A faixa de pH foi de 4 a 7 linear em tiras de 13 cm.

Previamente a IEF, 400 µg de proteína foram misturadas com o tampão

de reidratação (8,5 mol/L de uréia, 2% de TWEEN 20, 2% CHAPS, 1% de IPG buffer pH 4-7, 20 mmol/L de DTT e 0,002% de azul de bromofenol) (SHUKLA, 2006), totalizando um volume final de 250 µL para a aplicação em um suporte de tamanho correspondente a tira. Antes, porém, da aplicação a amostra foi homogeneizada em vortex e em seguida centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado no suporte sem formar bolhas e em seguida a tira com pH imobilizado foi posicionada com o gel voltado para a solução contendo a amostra e cobertas com 1 mL de óleo mineral (*Dry Strip Cover Fluid*). A reidratação foi por 16 horas a 50 V. Após a reidratação teve início a isoeletrofocalização que ocorreu em quatro etapas: 500 Vhr, 800 Vhr, 11.300 Vhr e 16.000 Vhr, totalizando 29.400 Vhr. Após a IEF as tiras foram imediatamente equilibradas ou armazenadas em congelador – 70°C para posterior utilização.

5.7.5 Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado

Após a isoeletrofocalização as tiras foram equilibradas por 30 minutos em 5 mL de tampão de equilíbrio, contendo 50 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L uréia, 30% (p/v) glicerol e 2% (p/v) SDS em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8 e 0,002% (v/v) de solução de azul de bromofenol. Esta etapa foi repetida uma vez, sendo que na primeira etapa foram adicionados 50 mg de ditioneitol (DTT) ao tampão de equilíbrio e ao segundo passo 200 mg de iodoacetamida. Após os dois passos de equilíbrio as tiras foram lavadas com água destilada, submersas por alguns minutos em tampão de corrida (3 g Tris-base, 14 g de glicina, 1 g SDS por litro dH₂O) (LAEMMLI, 1970) e imediatamente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

5.7.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese das proteínas contidas nas tiras IPG foi feita em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) utilizando a tecnologia

descrita por Laemmli (1970). O gel de separação foi usado na concentração de 12,5% de poliacrilamida (Proporção de Acrilamida e Bis-acrilamida: 29:1). A eletroforese foi feita em géis de 18 cm x 16 cm em cuba *Hoefler SE 600 Ruby* (GE Healthcare). As tiras foram posicionadas horizontalmente no topo do gel de forma a manter pleno contato com este e em seguida cobertas com 2 mL de solução de agarose morna (1% de agarose, 1% de SDS e traços de azul de bromofenol). A corrida do gel foi feita limitando-se a corrente a 45 mA por gel até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel. Durante a corrida a temperatura foi mantida a 11°C por meio de refrigeração com circulador termostático.

5.7.7 Visualização dos géis

Os géis bidimensionais foram primeiramente fixados por no mínimo 60 minutos na solução de 5 mL de ácido *o*-fosfórico 85%, 100 mL de metanol e água q.s.p 500 mL. Em seguida os géis com as proteínas fixadas foram visualizados através da coloração por *Coomassie Blue*. Os géis corados com *Coomassie* permaneceram pelo menos 12 horas em solução de *Coomassie Brilliant Blue G-250* (NEUHOFF *et al.* 1985) foram descorados pela lavagem sucessiva com água.

5.7.8 Captura das imagens

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas utilizando o scanner *ImageScanner* da GE Healthcare.

5.7.9 Análise dos géis

A análise dos géis bidimensionais foi realizada utilizando o Programa *Imagemaster 2D Platinum*, versão 6.0 (GE Healthcare). A subtração do fundo foi feita utilizando o modo *no spot*. A detecção de pontos protéicos foi feita automaticamente seguida de correções manuais. O volume dos pontos protéicos detectados foi normalizado utilizando o modo de normalização de volume total de pontos protéicos, no qual o volume de cada ponto é dividido

pelo volume total dos pontos detectados e multiplicado por 100. Os géis representativos de cada condição foram comparados para verificar diferenças de expressão. Pontos protéicos com relação de volume normalizado inferior a 0,6 ou superior a 1,5 foram considerados como expressos diferencialmente.

5.7.10 Retirada de proteínas dos géis bidimensionais

A retirada de proteínas para análise por espectrometria de massa foi feita com auxílio de uma ponteira de 1 mL estéril e com a ponta cortada. As proteínas foram retiradas e armazenadas em tubos tipo eppendorf ou placas de 96 poços em freezer -70°C .

5.7.11 Preparo das amostras para análise espectrométrica

Os pontos proteicos foram digeridos no gel com tripsina como descrito por Shevchenko e colaboradores em 1996. As bandas foram cortadas do gel e divididas em pedaços menores (1 mm^2). Os pedaços do gel foram descorados em solução de acetonitrila 50% , bicarbonato de amônio 25mmol/L pH 8,0 com lavagens de 1 hora com volumes de 400 μL e trocas de solução até a completa transparência dos pedaços de gel e remoção total do *Coomassie* e SDS. Em seguida o descorante foi removido e os pedaços de gel desidratados com 200 μL de acetonitrila 100% por 5 minutos. Este procedimento foi repetido uma vez mais no caso dos pedaços de gel não ficarem opacos. A acetonitrila foi removida e os géis secos em *Speed Vac* por 15 minutos. Na etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com 15 μL de uma solução de tripsina (concentração final 20 ng/ μL) diluída em 40 mmol/L de bicarbonato de amônia mais 10% de acetonitrila. Os pedaços do gel foram mantidos no gelo durante 30 minutos para a penetração da tripsina no gel sem que se inicie a digestão. Após esse tempo o gel foi incubado por 16-24 horas a 37°C . O sobrenadante resultante dessa incubação foi utilizado para análise de espectrometria de massa.

A matriz utilizada para análise por MALDI TOF foi uma solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila 50%, TFA 0,1%. 1 μL da solução da matriz foi misturada com 1 μL da solução de peptídeos, e 1 μL

dessa mistura depositado em placa de MALDI TOF, que foi deixada à temperatura ambiente até secar completamente. Em outros pontos da placa foi depositada também a mistura de padrões peptídicos para a calibração do equipamento de MALDI TOF.

5.7.12 Análise espectrométrica através de MALDI TOF TOF

As análises espectrométricas dos peptídeos resultantes da digestão com tripsina foram feitas em equipamento Maldit-TOF TOF (Bruker Daltonics). O método de aquisição utilizado foi o modo de detecção tipo refletor para íons com polaridade positiva.

5.7.13 Identificação das proteínas

Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa Mascot (<<http://www.matrixscience.com/>>) juntamente com os valores das massas tripticas obtidas pelas análises espectrométricas em MALDI-TOF TOF, os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) determinados experimentalmente. A tolerância para a MM foi de $\pm 10\%$ e os valores de pI serão especificados conforme a faixa de pH utilizada para isoeletrofocalização (pH 4 – 7). A base de dados escolhida foi a sequência genômica de *H. rubrisubalbicans* M1. Foram consideradas as modificações de resíduos de cisteína pelo tratamento com iodoacetamida.

5.8 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA DO GRUPAMENTO GÊNICO *hrp/hrc*

Para a análise do grupamento gênico *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* M1 foi usado o programa Blastx foi utilizado, comparando sempre com o banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As prováveis regiões promotoras do operon foram determinadas baseando-se na sequência consenso HrpL-dependente (GGAACC-N15-CCACTCAAT) (Xiao et al, 1994; Wei & Beer, 1995; Fouts et al, 2002; Ferreira et al, 2006).

O alinhamento das sequências de proteínas foi feito utilizando o programa Needle tool (EMBL-EBI web site - www.ebi.ac.uk).

A identificação das proteínas efetoras do SST3 também foi feita utilizando o programa EffectiveT3 (<http://www.effectors.org/>).

5.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As análises filogenéticas foram feitas usando o programa MEGA versão 5 (Tamura et al, 2011). As sequências de DNA foram obtidas a partir do banco de dados GenBank, traduzidas a aminoácidos e alinhadas utilizando o programa Muscle (Edgar, 2004), com as seguintes alterações nos parâmetros padrão: gap opening -12; gap extension -1; e hydrophobicity multiplier 1. A redundância de sequências com distância "p" menor que 0,1 foi removida, mantendo somente uma sequência representante. As sequências de aminoácidos alinhadas foram convertidas novamente a nucleotídeos e utilizadas para as análises filogenéticas. O alinhamento da sequência de proteínas permite o uso de uma matrix de substituição e evita a inserção de *gaps* em locais que dividam os códons. O método Máxima Verossimilhança (do inglês, *Maximum Likelihood* - ML) foi utilizado para testar os modelos evolucionário, sendo o melhor resultado obtido para o modelo de Tamura 3-parâmetros, com distribuição gama e sítios invariáveis. O modelo selecionado foi utilizado para construir uma árvore filogenética usando o método ML com 1.000 replicatas *bootstrap*. Opções para deleção parcial com cobertura de 95% e um árvore filogenética construída com o método Neighbor-Joining (NJ) usando o modelo de Kimura 2-parâmetros para cálculo das distância genéticas e 10.000 replicatas *bootstrap* foi usado como uma árvore inicial para o método ML. Edição da árvore filogenética obtida foi feita no programa FigTree versão 1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

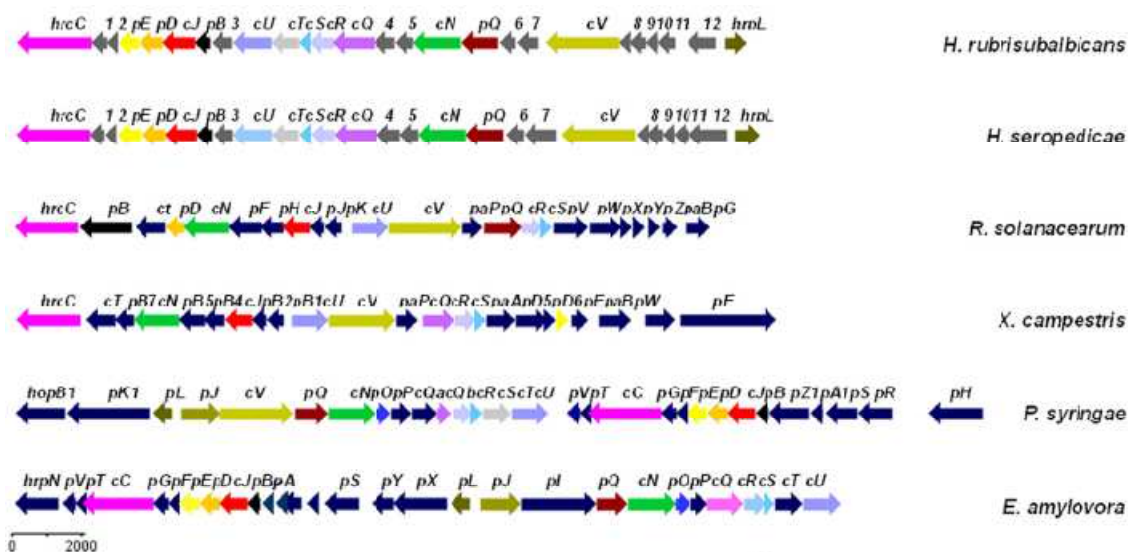
6. RESULTADOS

6.1 Organização dos genes *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* M1

H. rubrisubalbicans M1 contém um grupamento gênico de 21kb composto por 26 genes, a busca por similaridade no banco de dados GenBank mostrou que a maioria das proteínas codificadas são homólogas a proteínas estruturais do Sistema de Secreção do Tipo 3 sendo cinco *hrp*, nove *hrc*, e doze genes codificando para proteínas hipotéticas (GenBank accession JN256203) (Figura 15).

A comparação do grupamento gênico *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* M1 com o de *H. seropedicae* SmR1 mostrou que os genes estão distribuídos de uma maneira muito parecida (Figura 15). No entanto, a comparação de sequências das proteínas codificadas pelos genes *hrp/hrc* dos dois organismos mostrou que somente cinco das 26 proteínas tem identidade maior que 70% (Tabela 6). O grau de identidade entre as proteínas homologas dos dois organismos varia de 11% (proteína hipotética 6) a 86% (HrcS), e a similaridade varia de 17 a 97% (Tabela 6).

FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DO AGRUPAMENTO GÊNICO *hrp/hrc* DE *H. rubrisubalbicans* COM ORGANISMOS RELACIONADOS



Comparação do agrupamento gênico *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* M1 (JN256203), *H. seropedicae* SmR1 (NC014323), *Ralstonia solanacearum* CFBP 2957 (FP885907 - plasmídeo RCFBPv3_mp), *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (AE008922), *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (AE016853) e *Erwinia amylovora* ATCC49946 (FN666575). Genes homólogos são indicados pela mesma cor.

A organização estrutural dos genes *hrcU*, *hrcThrc*, *Shrc*, *Rhrc*, *Q* e *hrpB*, *hrcJ*, *hrpD*, *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* é similar a organização gênica encontrada em *H. seropedicae*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, and *Pantoea stewartii* (Figura 15). Os genes *hrpL* and *hrpG* (JN256211), que provavelmente codificam para as proteínas regulatórias HrpL and HrpG podem ser as responsáveis pela expressão dos genes do SST3 de *H. rubrisubalbicans*. O gene *hrpL* está localizado em uma das pontas do grupamento gênico *hrp/hrc*, já o gene *hrpG* está localizado a aproximadamente 10 kb a jusante do gene *hrcC* que está na ponta oposta a de *hrpL*. Na região promotora do gene *hrpL* não foi encontrado um promotor dependente de σ^{54} , diferentemente do que foi encontrado na região promotora do gene *hrpL* de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Cornelis & VanGijesegeen, 2000; Hendrickson, Guevera & Ausubel, 2000).

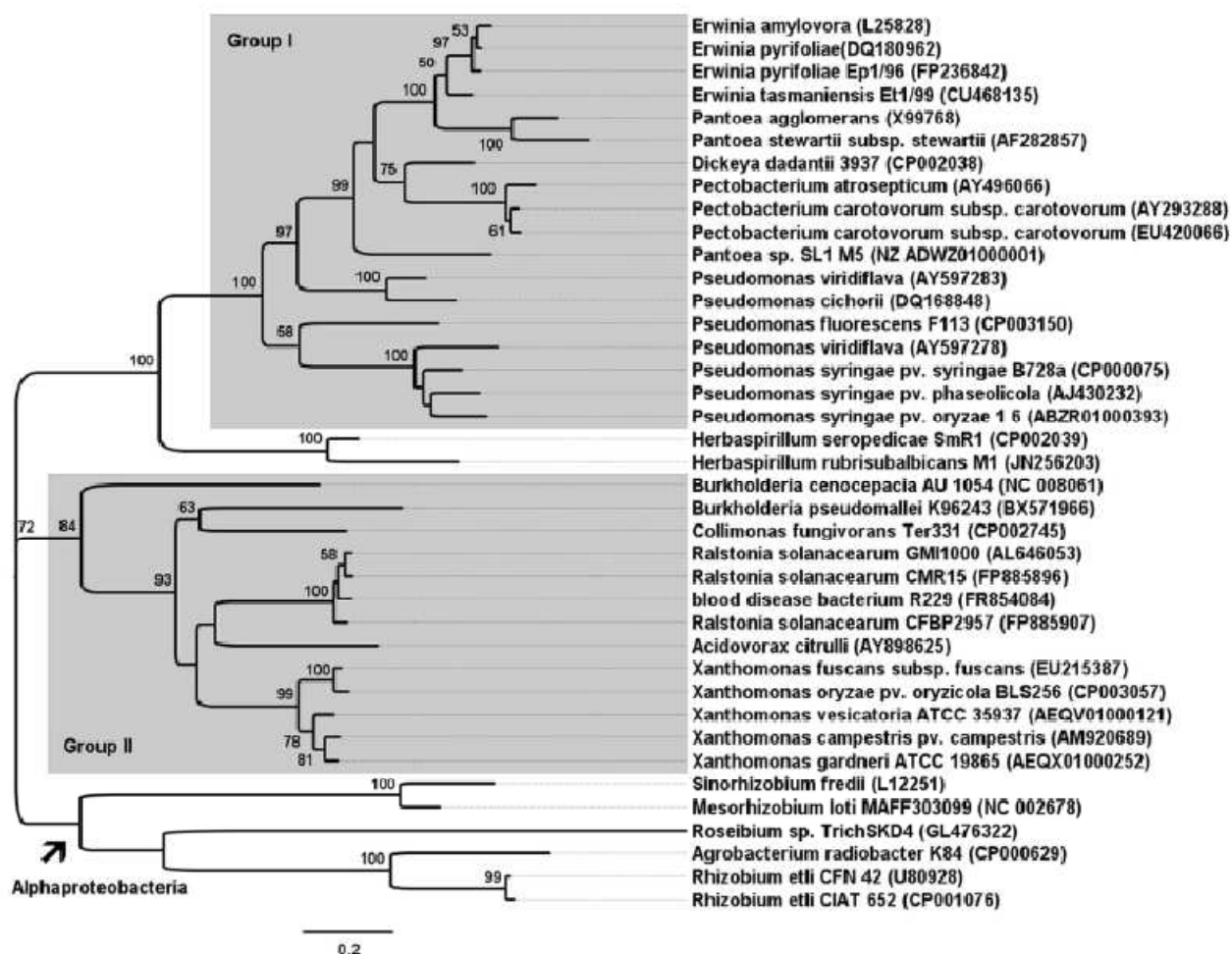
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DA SEQUENCIA DE AMINOÁCIDOS HOMÓLOGOS DAS PROTEÍNAS Hrp/Hrc de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*

Proteína	Homologia (número de acesso no Gene Bank)	Identidade/Positivos	Número de aa <i>H.rubrisubalbicans</i> / <i>H.seropedicae</i>
HrpL	ref YP_003774207.1 RNA polimerase fator sigma-24	57.1% /67.2%	202/244
Hrorf1	Ref YP_003774208.1 proteína hipotética Hsero_0781	20.2%/30%	277/349
Hrorf2	Ref YP_003774209.1 proteína hipotética Hsero_0782	28.2%/42.5%	171/127
Hrorf3	Ref YP_003774210.1 proteína hipotética Hsero_0783	37.9%/57.8%	101/108
Hrorf4	Ref YP_003774211.1 proteína hipotética Hsero_0784	39.9%/56.9%	145/151
Hrorf5	Ref YP_003774212.1 proteína hipotética Hsero_0785	46.6%/63.1%	94/99
HrcV	ref YP_003774213.1 proteína transmembrana do SST3 HrcV	83.5%/ 90.9%	689/695
Hrorf6	Ref YP_003774214.1 proteína hipotética Hsero_0787	10.9%/16.5%	168/299
Hrorf7	Ref YP_003774215.1 proteína hipotética Hsero_0788	43.6%/64%	141/170
HrpQ	ref YP_003774216.1 proteína do SST3 HrpQ	48.6%/62.2%	345/344
HrcN	ref YP_003774217.1 proteína do SST3 ATP sintase	83.3%/89.5%	459/460
HrpO	ref YP_003774218.1 proteína hipotética Hsero_0791	46.5%/58.8%	157/170
Hrorf8	Ref YP_003774219.1 proteína hipotética Hsero_0792	31%/43.2%	202/218
HrcQ	ref YP_003774220.1 Proteína do SST3	35.3%/45.5%	365/400
HrcR	ref YP_003774221.1 protein transmembrana do SST3 HrcR	80.9%/92.7%	219/220
HrcS	ref YP_003774222.1 proteína do SST3 HrcS	86.2%/96.6%	87/87
HrpX	ref YP_003774222.1 proteína do SST3 HrcS	76.9%/90.2%	264/262
HrcU	ref YP_003774224.1 proteína transmembrana do SST3 HrcU	64.7%/77.1%	366/371
Hrorf9	Ref YP_003774225.1 proteína hipotética Hsero_0798	26.6%/35.8%	184/176
HrpB	Ref YP_003774226.1 proteína do SST3 HrpB	52.9%/72.5%	133/134
HrcJ	ref YP_003774227.1 lipoproteína do SST3 HrcJ	65.1%/76.4%	282/292
HrpD	Ref YP_003774228.1 proteína ligadora HrpD	36%/47.4%	208/215
HrpE	ref YP_003774229.1 proteína do SST3 HrpE	38.3%/53.8%	202/233
Hrorf10	Ref YP_003774230.1 proteína hipotética Hsero_0803	64.9%/83.1%	75/77
Hrorf11	Ref YP_003774231.1 proteína hipotética Hsero_0804	45.3%/60.4%	138/137
HrcC	ref YP_003774232.1 proteína tranmembrana dos SST 2 e 3 HrcC	64.2%/75.4%	701/693

Os organismos que contém genes do SST3 podem ser divididos em dois grupos de acordo com a ordem dos genes no grupamento gênico *hrp/hrc* (Cornelis & van Gijsegem, 2000). *Erwinia* sp., *Pantoea* sp., *Pectobacterium* sp., e *Pseudomonas* sp. fazem parte do grupo I. Neste grupo estão presentes somente Gammaproteobacteria, indicando que ele é taxonomicamente uniforme. Todos os membros desse grupo possuem o gene *hrpL*, que codifica para um fator sigma alternativo. A HrpL regula a expressão dos genes *hrp/hrc* dos membros do grupo I (Wei & Beer, 1995; Xiao et al, 1992; Frederick et al, 2001). Entre os membros do grupo II encontramos Betaproteobacteria como *Ralstonia* sp., e *Burkholderia* sp., e também Gammaproteobacteria, como *Xanthomonas* sp. Os integrantes deste grupo não possuem o gene *hrpL* mas

possuem os genes *hrpB* or *hrpX*, que codificam para reguladores transcricionais da família AraC (Tang, Xiao & Zhou, 2006). Os membros do grupo II possuem a proteína HrpG que está envolvida na expressão dos genes *hrp/hrc*. A filogenia do gene *hrcN* mostrou que organismos dos grupos I e II formam grupos monofiléticos (Figura 16). O *H. seropedicae* SmR1 e o *H. rubrisubalbicans* M1 contém o gene *hrpL* e possuem a organização dos genes do SST3 similar a observada nos organismos do grupo I. No entanto, a filogenia do gene *hrcN* mostra que as duas espécies de *Herbaspirillum* se agrupam perto, mas fora do agrupamento dos membros do grupo I (Figura 16), sugerindo uma relação evolucionaria distante e indicando que essas duas espécies de *Herbaspirillum* possuem um sistema híbrido entre o grupo I e o II, como foi sugerido por Pedrosa et al (2011) para o *H. seropedicae* SmR1.

FIGURA 16 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS SEQUENCIAS DO GENE *hrcN* DE REPRESENTANTES ALFA E BETAPROTEOBACTERIA



Organismos do grupo I e II compartilham uma organização similar do cluster *hrp/hrc*. A árvore foi construída usando o método de Maximum-Likelihood. Valores iniciais são mostrados com porcentagem (>50%) de 1000 replicatas para cada nó. O valor da

escala representa o número de nucleotídeos substituídos por sitio. Os números de acesso no GeneBank estão em parênteses.

Analisando a região promotora dos genes *hrp/hrc* encontramos sequências similares a sequência consenso de promotores HrpL-dependentes (GGAACC-N15-CCACTCAAT) (Xiao et al, 1994; Wei & Beer, 1995; Fouts et al, 2002; Ferreira et al, 2006) a montante da *orf1*, *orf6*, *hrpO*, *orf8*, *hrpB* e *orf10* (Figura 17). As ORFs *orf8* a *orf9*, *hrpB* a *hrpE* e *orf1* a *hrcC* se sobrepõe ou tem regiões intergênicas menores que 94 nucleotídeos, indicando que esses três grupos de genes fazem parte de três operons distintos. As ORFs *orf6* a *hrcN* devem pertencer ao mesmo operon. Foram encontradas regiões intergênicas maiores que 100 pb entre os genes *orf6-orf7* (114pb), *orf1-orf2* (336pb) e *orf3-orf4* (249pb), mas nenhuma sequência promotora foi identificada. Em *H. seropedicae* três regiões foram identificadas como sendo reguladas por promotores do tipo *hrp-box*. Estes promotores foram denominados *hrp-box1*, *hrp-box2* e *hrp-box3* (Souza, não publicado). Estas análises sugerem que os genes *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* estão organizados em seis operons HrpL-dependentes.

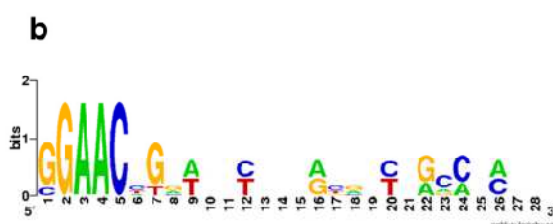
FIGURA 17 – SEQUENCIAS DE POSSÍVEIS REGIÕES PROMOTORAS DE *orf1*, *orf6*, *orf8*, *hrpB* e *orf10* E DO GENE *hrpO* .

a

```

>phrporf1
GGAACCN16CCACCGA
>phrporf6
GGAACTN16CATAAAG
>phrpO
GGAACTN16GACAGCA
>phrporf8
GGAACAN16ACGATGC
>phrpB
GGAACCN16CCACTCA
>phrporf10
CGAACCN16CCACCTA

```



(a) Possíveis regiões promotoras. (b) Sequencia de bases de nucleotídeos conservadas na *hrp*-Box de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*.

6.2 Genes de *H. rubrisubalbicans* acessórios ao SST3

Dois genes acessórios ao SST3 foram encontrados, o gene *hpaB* (JN256204) e o gene *hpaB1* (JN256205). Esses genes codificam para duas chaperonas envolvidas com a secreção e a translocação de proteínas efetoras do SST3 (Buttner et al, 2004). Os genes *hpaB* e *hpaB1* codificam para proteínas que devem pertencer a família TIR das chaperonas (Buttner et al, 2004). O gene *hpaB1* foi encontrado aproximadamente 12kb a jusante do gene *hrcC* e codifica para uma pequena chaperona ácida.

6.3 Genes de *H. rubrisubalbicans* que provavelmente codificam para proteínas efetoras do SST3.

As proteínas estruturais do SST3 são altamente conservadas, já as proteínas efetoras secretadas por esse sistema são menos conservadas e de difícil identificação. A análise do genoma parcial de *H. rubrisubalbicans* utilizando o programa BlastX e o banco de dados NCBI-nr permitiu a identificação de cinco possíveis proteínas efetoras: HropAN1 (*H. rubrisubalbicans* outer protein) (JN256208), HropAV1 (JN256209), HropF1 (JN256210), Hrop1 (JN256206) e Hrop2 (JN256207) (Tabela 7). Hrop1 e Hrop2 também foram identificadas utilizando o programa EffectiveT3 (<http://www.effectors.org/>) (Arnold et al, 2009). Os genes que codificam para essas possíveis proteínas efetoras se encontram fora do agrupamento gênico *hrp/hrc*.

TABELA 7– PROTEÍNAS EFETORAS DO SST3 DE *H. rubrisubalbicans*

Proteína efetora	Homologia (número de acesso no Gene Bank)	Identidade/Similaridade %	Provável número de aa
HropAV1	Efedor do tipo 3, HopAV1 [<i>Ralstonia solanacearum</i>] (CBJ40351.1)	56/70	784
HropAN1	Efedor do tipo 3, proteína Hrp-dependente exterior [<i>Burkholderia sp.</i> Ch1-1] (ZP_06844144.1)	78/86	428
HropF1	Efedor XopF1 [<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzae</i> PXO99A] (YP_001911267.1)	31/45	643
Hrop1	Proteína Efetora do tipo 3 (sequencia central parcial) [<i>Ralstonia solanacearum</i> MolK2] (YP_002252977.1)	25/45	736
Hrop2	Proteína efetora do tipo 3 rica em leucina (GALA5) [<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07] (YP_003752484.1)	32/46	641

Prováveis proteínas efetoras foram identificadas por BlastX e o programa EffectiveT3 (<http://www.effectors.org/>) (Arnold *et al.*, 2009).

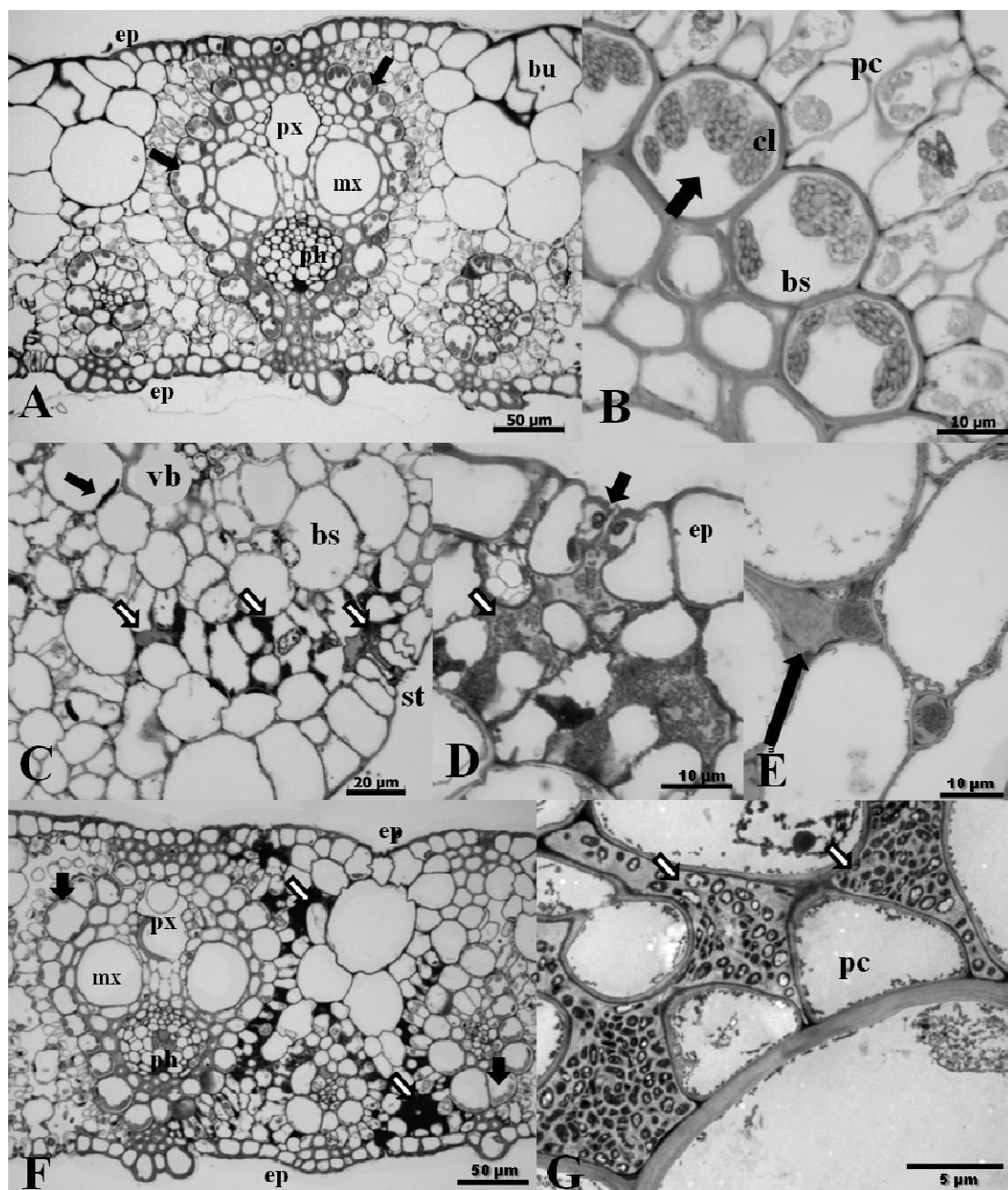
As proteínas HropAN1 (*H. rubrisubalbicans* outer protein), HropAV1 e HropF1 são similares em sequência a HopAN1 (*Burkholderia sp.*), HopAV1 (*Ralstonia solanacearum*) e XopF1 (*Xanthomonas oryzae*), respectivamente. Hrop1 é homologa a proteína efetora MolK2 de *Ralstonia solanacearum*. Hrop2 pertence a subfamília-*leucine-rich repeats* (LRRs) *ribonuclease inhibitor* (RI)-like (Marschler-Bauer *et al.*, 2009). Os genes que codificam para as proteínas HropAV1 e Hrop1 encontram-se a montante do gene *hpaB1*, mas fora do agrupamento gênico *hrp/hrc*. A proteína HrpB de *H. rubrisubalbicans* apresenta uma baixa homologia (identidade 27%/similaridade 48%) com a HrpB de *Pseudomonas syringae*. A HrpB deste organismo é secretada e está envolvida no desencadeamento da resposta hipersensitiva em *Nicotiana tabacum* e

Nicotiana benthamiana (Ramos et al, 2007). Esta similaridade sugere que a HrpB é uma candidata a proteína secretada.

6.5 Microscopia Ótica e Eletrônica de Transmissão de folha de cana de açúcar B-4362 inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1, TSE E TSN.

Olivares e colaboradores em 1997 mostraram, por microscopia eletrônica de transmissão, que o *H. rubrisubalbicans* selvagem coloniza massivamente os tecidos internos desta variedade de cana de açúcar chegando a causar entupimentos de vasos de xilema, o que pode estar relacionado com o desenvolvimento da doença da estria mosqueada. Schmidt e colaboradores (2012) mostraram que a inoculação das estirpes mutantes TSN e TSE não causaram a doença da estria mosqueada em cana de açúcar B-4362, como observado após a inoculação com a estirpe selvagem. Esses resultados indicam que os genes *hrpE* e *hrcN* são importantes para o desenvolvimento da doença. Para verificar se a mutação nesses genes causa alterações histológicas na folha de cana de açúcar diferentes daquelas observadas quando esta é inoculada com a estirpe selvagem, obtivemos cortes histológicos das plantas inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpes M1, TSN e TSE foram visualizados no microscópio óptico e eletrônico de transmissão (FIGURA 18).

FIGURA 18 - MICROSCOPIA ÓPTICA (MO) E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) DE FOLHA DE CANA DE AÇÚCAR DA VARIEDADE B-4362 INOCULADA COM *H. rubrisubalbicans* M1, TSE E TSN.



(a) Seção transversal da folha de cana de açúcar mostrando a organização regular das células no tecido da planta controle. (ep) epiderme, (px) protoxilema, (ph) floema, (mx) metaxilema (bu) células buliformes, (setas) células da bainha com cloroplastos normais. (b) Detalhe das células da bainha (bs) mostrando os cloroplastos (cl) com forma regular, distribuição e aparência (setas) e as células do (pc) parênquima. (c) Padrão de colonização normal da estirpe selvagem M1, mostrando os tecidos com intensa colonização intercelular no mesofilo e cavidade dos estômatos (setas brancas) associado a deformação das células e dos cloroplastos (setas pretas). (vb) feixes vasculares, (bs) vasos, (st) estomato. (d) Visão detalhada da colonização apoplástica pela estirpe selvagem M1 (setas brancas) e abaixo a cavidade estomatal (setas

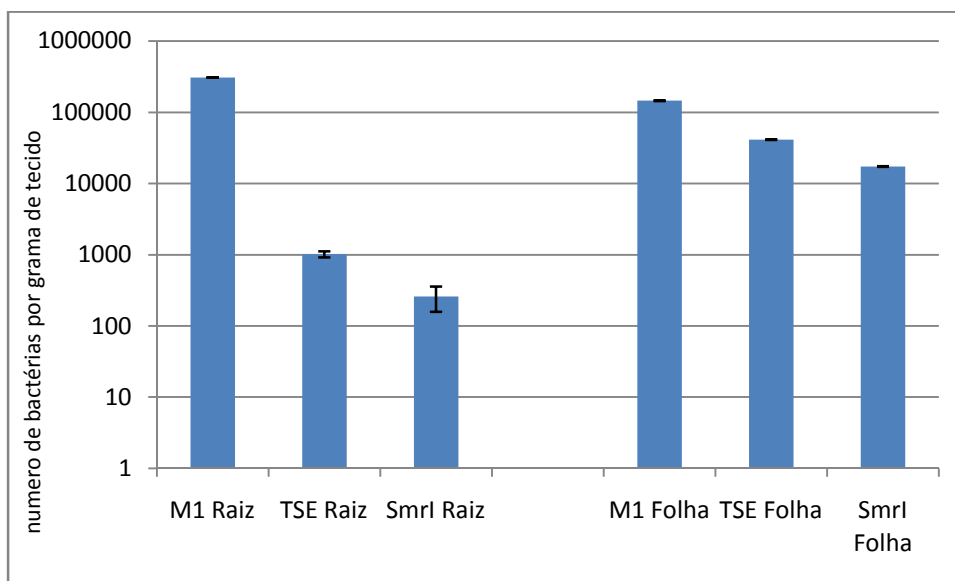
pretas) (ep) epiderme. (e) Corte transversal mostrando os mutantes TSE e TSN colonizando as folhas. Note a goma da planta com colonização intercelular espalhada (setas pretas) (f) Corte transversal de área colonizado densamente pelos mutantes (setas brancas) mostrando mudanças anatômicas bem menores comparadas ao padrão de (a) e (c). Note a redução do número e tamanho dos cloroplastos (setas pretas). (g) Microscopia eletrônica de transmissão da bactéria mutante colonizando os espaços intercelulares do mesófilo. Observe as mudanças nas células do citoplasma da planta hospedeira em contato com a bactéria (pc) células do parênquima. Três plantas sob cada condição foram utilizadas para os experimentos de microscopia e cada foto representa uma das três plantas inoculadas.

As imagens mostraram a mudança morfológica que o selvagem M1 é capaz de produzir nas células do feixe vascular, estômatos e cloroplastos. A presença da bactéria é intensa nos espaços intercelulares e mesófilo. As bactérias mutantes TSE e TSN, apesar de presentes nesses espaços, não provocaram tantas alterações. Os estômatos se apresentam normais assim como os cloroplastos. A quantidade de goma produzida pela planta foi menor quando comparada com a produzida pelas plantas colonizadas pela estirpe selvagem. A capacidade de colonização das estirpes mutantes ficou afetada.

6.6 Determinação do número de bactérias *H. rubrisubalbicans* estirpes M1 e TSE colonizando raízes e folhas de cana de açúcar B-4362.

Para confirmarmos os resultados obtidos por microscopia, que indicam uma capacidade de colonização menor da cana de açúcar B-4362 pelas estirpes mutantes TSE e TSN, determinamos o número de bactérias nos tecidos internos da cana de açúcar. Plantas da cana de açúcar B-4362 micropropagadas, livre de contaminantes, foram inoculadas com as estirpes M1 ou TSE de *H. rubrisubalbicans* ou com SmR1 de *H. seropedicae*, que não é capaz de produzir doença. O gráfico 1 mostra o padrão de colonização destas bactérias 28 dias após a inoculação. O número de bactérias TSE e SmR1 colonizando endofiticamente as raízes e folhas de cana de açúcar B-4362 foi menor do que o observado com a estirpe M1, sugerindo que uma maior colonização pode estar relacionada com o desenvolvimento da doença da estria mosqueada.

GRAFICO 1 – CONTAGEM DE BACTÉRIAS NOS TECIDOS INTERNOS DA CANA DE AÇÚCAR B-4362



As plantas de cana de açúcar micropropagadas foram inoculadas com 10^7 bactérias, 28 dias após a inoculação foram esterilizadas superficialmente com etanol 70% e hipoclorito 6%, maceradas em gral, plaqueadas e as colônias contadas. Três plantas de cada tratamento foram utilizadas para fazer o experimento que foi repetido uma vez.

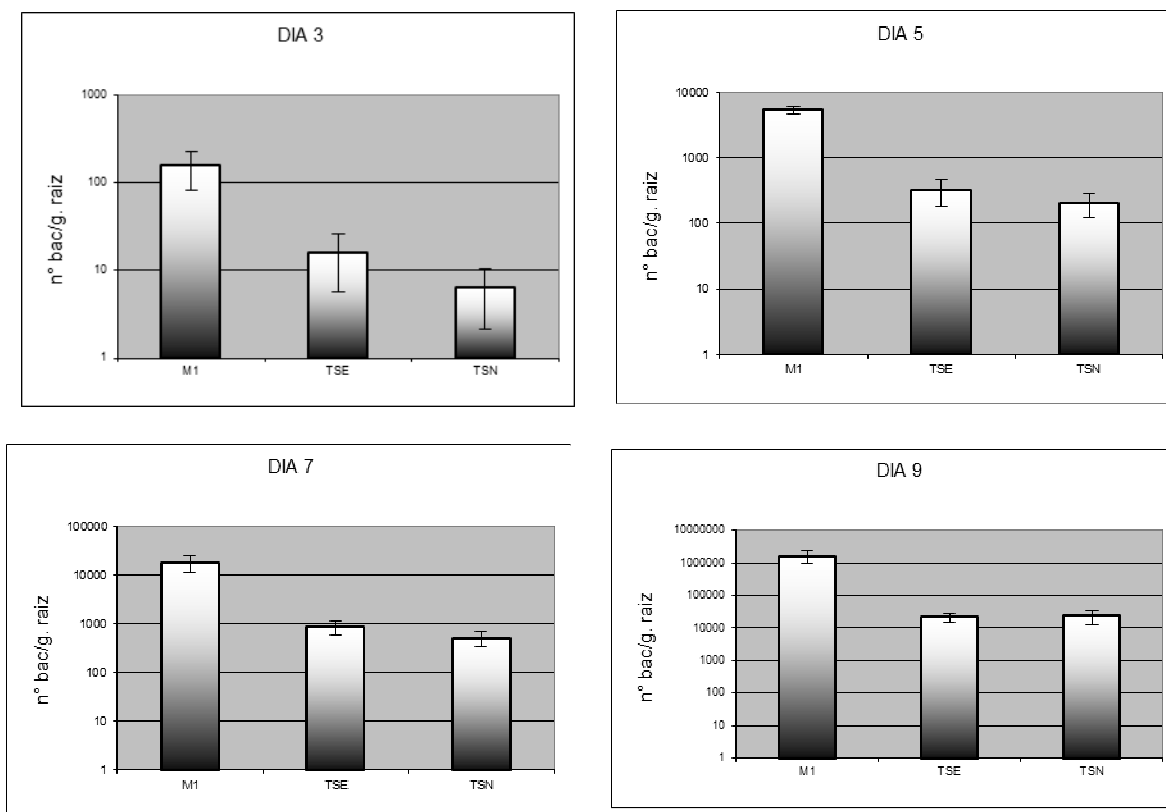
6.7 Efeito das mutações nos genes *hrcN* e *hrpE* sobre a colonização endofítica de raízes de arroz.

O *H. rubrisubalbicans* é uma bactéria promotora de crescimento vegetal que já foi encontrada em arroz numa interação não patogênica. Com o objetivo de verificar se os genes *hrcN* e *hrpE* são importantes para a colonização endofítica de arroz, plântulas desse vegetal foram inoculadas com o *H. rubrisubalbicans* estirpes M1, TSN e TSE e o número de bactérias endofíticas foi determinado.

Os resultados mostraram que no nono dia após a inoculação foram recuperadas 10^6 bactérias da estirpe selvagem M1 por grama de raiz. Em contraste o número de bactérias das estirpes mutantes TSE e TSN foi cerca de 100 vezes menor que o selvagem M1. Contagens feitas no terceiro, quinto e sétimo dia também mostraram um número menor de bactérias nas plântulas de arroz inoculadas com as estirpes mutantes como mostra o gráfico 2. Estes resultados indicam que os genes *hrpE* e *hrcN* estão envolvidos com o processo

de colonização de raízes de arroz pela bactéria.

GRAFICO 2 – Determinação do número de bactérias endofíticas encontradas nas raízes de arroz após a inoculação do arroz com o *H. rubrisubalbicans* estirpes M1, TSE e TSN.



Colonização interna de raízes de arroz inoculadas com *H. rubrisubalbicans* M1, TSE e TSN. Plantas de arroz da variedade BRS Formosa foram inoculadas com as estirpes, desinfectadas superficialmente, maceradas, e o macerado foi diluído e plaqueado. As placas foram mantidas a 30°C por 24 horas e as colônias contadas. Experimento feito em quinduplicatas de amostras.

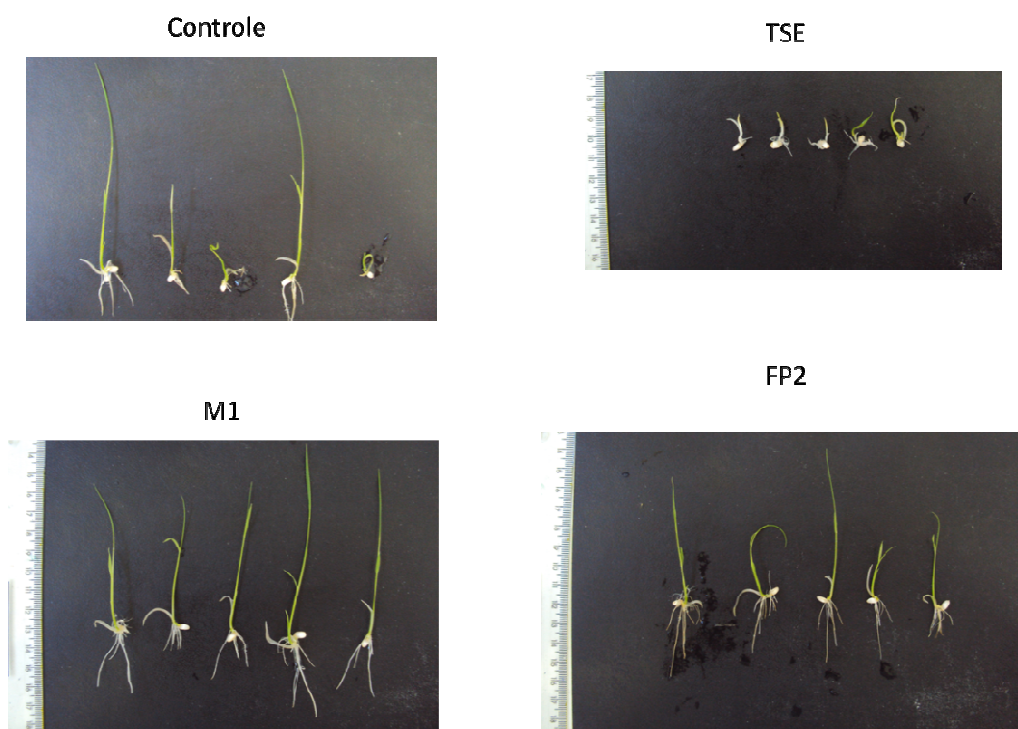
6.8 Determinação do efeito da inoculação de *H. rubrisubalbicans* estirpes M1 e TSE sobre o crescimento de plântulas de arroz.

Para a determinação do efeito da inoculação de *H. rubrisubalbicans* estirpes M1 e TSE sobre o crescimento de plântulas de arroz três variedades foram testadas: Nipponbare, Soberana e Maravilha; e avaliamos o comprimento e peso seco das raízes foram avaliados. Os resultados obtidos

mostraram que a cultivar que apresentou maior resposta diante a inoculação de *H. rubrisubalbicans* foi a Nipponbare.

As plantas de arroz da variedade Nipponbare foram germinadas em placas de petri contendo ágar água e cinco dias depois foram inoculadas com as estirpes M1 ou TSE de *H. rubrisubalbicans* ou a estirpe FP2 de *Azospirillum brasiliense*, que foi utilizada como controle positivo devido à sua capacidade de promover crescimento em gramíneas. Sete dias após a inoculação as plantas foram coletadas, fotografadas (Figura 19), medidas, seccionadas em duas partes, a parte aérea e raiz, colocadas em envelopes de papel e mantidas a 60°C. O experimento foi repetido três vezes, cada amostra continha cinco plantas.

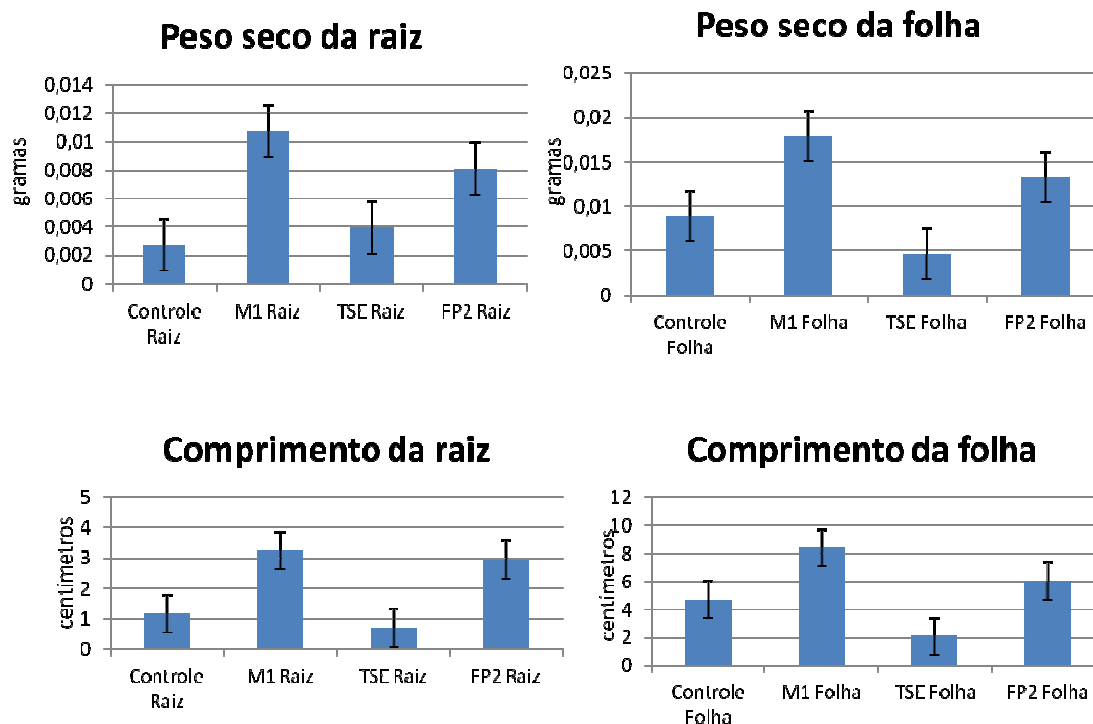
FIGURA 19 – PLANTAS DE ARROZ DA VARIEDADE NIPPONBARE INOCULADAS COM DIFERENTES ESTIRPES DE *H. rubrisubalbicans* E A ESTIRPE FP2 DE *A. brasiliense*



As sementes foram germinadas, cinco dias depois inoculadas com as estirpes M1 e TSE de *H. rubrisubalbicans* e FP2 de *A. brasiliense*. Sete dias depois as fotos foram tiradas. Esses mesmos grupos foram submetidos a medição depois foram cortadas em duas partes e levadas a estufa para execução do experimento de peso seco.

Comparando o controle com as plantas inoculadas, pudemos verificar que a inoculação com a estirpe M1 promoveu o crescimento das plântulas, como observado com relação ao controle positivo FP2. Já a estirpe TSE parece ter afetado negativamente o crescimento das mesmas (Figura 19). No gráfico 3 podemos observar que inoculação com a estirpe M1 aumentou o comprimento das raízes e folhas e o peso seco das mesmas, quando comparada com as plântulas não inoculadas. Esse resultado não foi obtido com as plântulas inoculadas com TSE; ao contrário inoculação com esta estirpe diminuiu o comprimento e o peso seco das raízes e folhas quando comparadas com as plântulas não inoculadas. Esses resultados indicam que o SST3 de *H. rubrisubalbicans* pode estar envolvido com a promoção do crescimento vegetal causado por essa bactéria. A mutação no gene *hrpE* não está simplesmente afetando a capacidade de promover o crescimento, mas pode estar desencadeando algum processo detrimental ao crescimento da planta.

GRAFICO 3 – ANÁLISE DO COMPRIMENTO E PESO SECO DAS RAIZES DE ARROZ DA VARIEDADE NIPPONBARE INOCULADAS COM *H. rubrisubalbicans* M1 E TSE E *A. brasiliense* FP2



As raízes e folhas principais foram medidas, separadas e colocadas em grupos de cinco em um envelope de papel previamente pesado. Os envelopes foram colocados em estufa a 60°C e pesados diariamente até alcançarem valor constante. A média de cinco plantas em cada tratamento e triplicata de experimento geraram os gráficos.

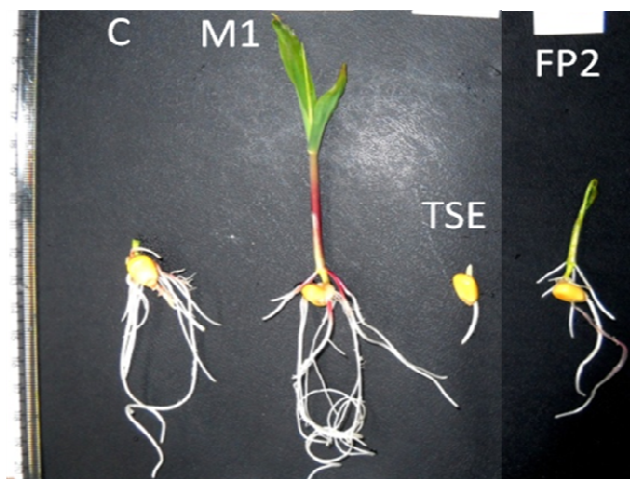
6.9 Determinação do efeito da inoculação de *H. rubrisubalbicans* estirpes M1 e TSE sobre o crescimento de plântulas de milho.

Para verificar se a mutação do gene *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* altera o padrão de crescimento de outro tipo de gramínea, repetimos os experimentos em milho da linhagem Pioneer cv. 30F53. Plântulas de milho foram inoculadas com as estirpes de *H. rubrisubalbicans* M1 e TSE. Como controle positivo foi utilizada a estirpe FP2 de *A. brasiliense*. Figura 20 mostra que é visível o maior desenvolvimento da plântula de milho inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1, quando comparado com a plântula controle (não inoculada). Esse fato não é observado quando a bactéria inoculada é a estirpe mutante TSE, pelo

contrário, esta estirpe mutante parece inibir o crescimento da plântula de milho quando comparado com a plântula controle. O gráfico 4 mostra que o peso seco e comprimento das folhas e raízes de plântulas de milho inoculadas. A inoculação com a estirpe M1 promoveu um aumento no peso seco das raízes de milho e do comprimento da folha quando comparado com as plântulas não inoculadas. A estirpe mutante TSE afetou negativamente esses parâmetros sugerindo que a mutação no gene *hrpE* afeta a capacidade promotora de crescimento desta bactéria.

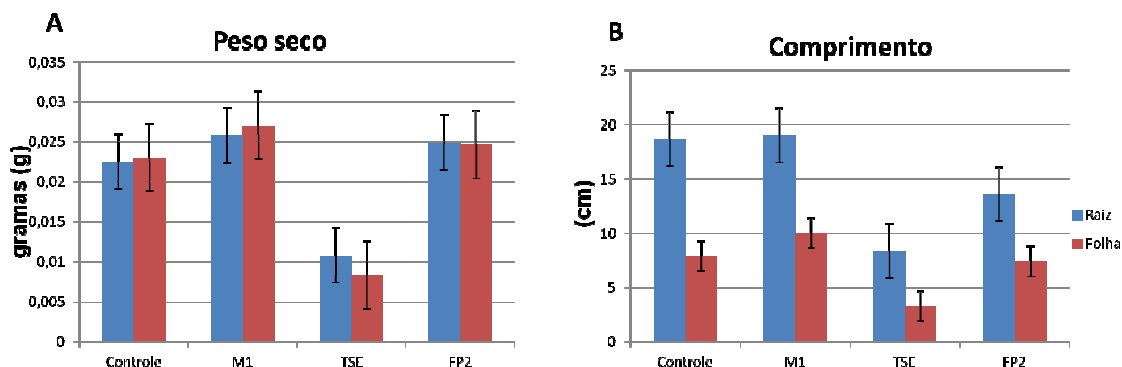
Os resultados apresentados na figura 20 e gráfico 4 mostram que a inoculação de plântulas de milho com *H. rubrisubalbicans* M1 afeta positivamente o crescimento da plântula de milho, o que não é observado com a inoculação da estirpe TSE indicando que o gene *hrpE* está envolvido na promoção do crescimento vegetal estimulada pela estirpe M1. Esses resultados também foram observados quando essas bactérias foram inoculadas no arroz.

FIGURA 20 – Determinação do efeito da inoculação de *H. rubrisubalbicans* estirpes M1 e TSE sobre o crescimento de plântulas de milho da linhagem Pioneer cv. 30F53



As plantas de milho foram coletadas e fotografadas sete dias após a inoculação com as estirpes M1 e TSE de *H. rubrisubalbicans*, a estirpe FP2 de *A. brasiliense* e um dos tratamentos foi com a mistura de M1 e FP2, todos os tratamentos foram inoculados com 10^8 células por raiz.

GRAFICO 4 – PESO SECO E COMPRIMENTO DE RAÍZES E FOLHAS DE MILHO

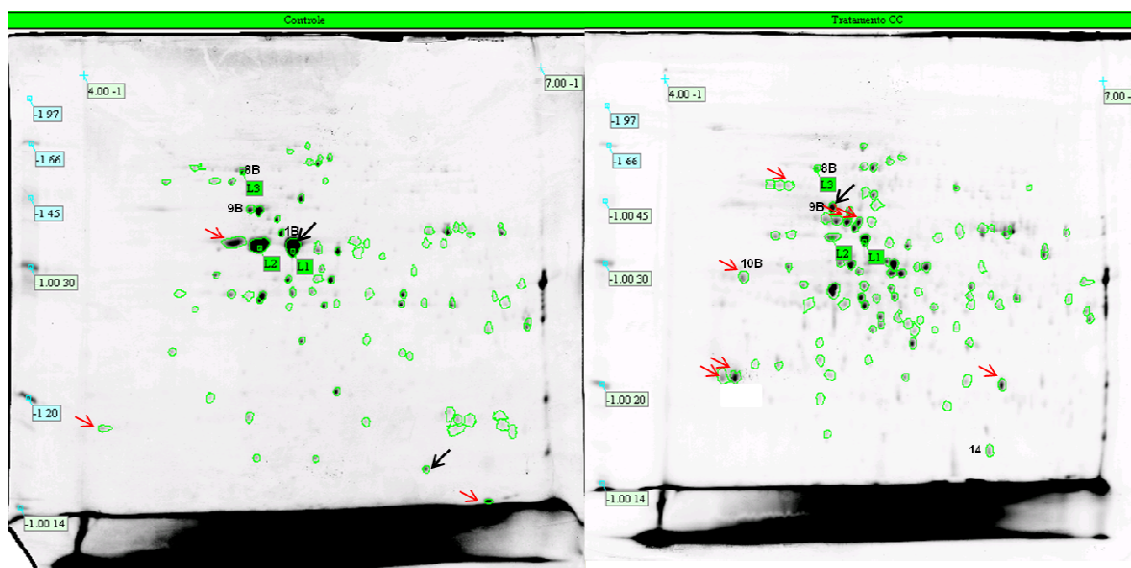


(A) As plantas foram coletadas seccionadas e as raízes colocadas em envelopes de papel previamente pesados. Esses envelopes permaneceram a 60°C até atingirem peso constante. O experimento foi executado em quinduplicata de amostras. (B) As folhas principais foram medidas e as medias das quinduplicatas de amostras mensuradas.

6.10 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR *H. rubrisubalbicans* M1 DURANTE O CULTIVO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO EXTRATO DE CANA DE AÇÚCAR B-4362

Para determinar que proteínas são secretadas pelo *H. rubrisubalbicans* M1 durante o cultivo na presença e ausência de extrato de cana de açúcar B-4362, as proteínas presentes no sobrenadante da cultura cultivada nessas duas condições foram analisadas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa.

FIGURA 21 – GEL BIDIMENSIONAL DO SECRETOMA DE *H. rubrisubalbicans* M1 NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO CALDO DE CANA B-4362



(A) gel referente a tratamento sem caldo de cana. (B) Gel referente a cultura crescida na presença de 5% de caldo de cana B-4362. Foram realizados 3 experimentos independentes, totalizando 6 géis. Para determinar a quantidade de bandas proteicas no gel foi utilizado o programa Image Master Platinum v.5.0 (proteínas marcadas em verde). As setas vermelhas indicam proteínas exclusivas e as pretas proteínas superexpressas.

Um total de 81 proteínas foi mapeado no gel contendo o secretoma da bactéria cultivada na ausência do extrato de cana de açúcar (controle) e 94 no secretoma da bactéria cultivada na presença do extrato de cana de açúcar.

Após a comparação desses secretomas 3 proteínas expressas somente na ausência de extrato de cana de açúcar, 7 expressas somente na presença do extrato, 2 com a expressão aumentada na ausência do extrato e 5 na presença foram encontradas. Das 17 proteínas diferencialmente expressas encontradas na comparação dos dois secretomas somente 5 foram identificadas e estão mostradas na tabela 8.

TABELA 8 – IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DE *H. rubrisubalbicans* M1 NA AUSENCIA E PRESENÇA DE CALDO DE CANA B-4362 NO MEIO DE CULTIVO

ID	pl exp	MM exp	pl teórico	MM teórica	Score	Matches de peptídeos	E value	Proteína	Condição de expressão no gel tratamento	ID no genoma
10B	4,0	28	6,0	29	22	20	0	Intracelular protease/amidase	Presente	Hrubri 0001.2528
8B	5,7	40	4,79	45	47	12	0	Conserved hypotetical protein	Superexpressa	Hrubri 0001.4387
9B	5,2	60	10,02	53	22	13	0	família dos reguladores transcricionais XRE	Superexpressa	Hrubri 0001.1260
14	9,0	20	8,96	27	37	13	0	Amino acid ABC Transporter ATPase	Menos expressa	Hrubri 0001.1155
1B	6,0	33	8,98	41	47	12	0		Menos expressa	Hrubri 0001.1644

Os dois transportadores tipo ABC identificados (Hrubri 0001.1644 e Hrubri 0001.1155) tiveram a sua expressão reprimida na presença de extrato de cana de açúcar. Transportadores do tipo ABC são sistemas de transporte que acoplam a hidrólise de ATP ao transporte dos seus substratos, que podem ser açúcares, íons, peptídeos, ou outras moléculas orgânicas. Os transportadores do tipo ABC são organizados em três componentes: proteína integral de membrana; proteína de membrana periférica que liga e hidrolisa ATP e uma proteína periplasmática, que se liga ao substrato (Saurin & Dassa, 1994).

A proteína Hrubri1644 é o componente periplasmático de um transportador ABC que não teve o seu ligante caracterizado. A proteína Hrubri1155 é o componente que se liga ao ATP do transportador ABC de aminoácidos de cadeia ramificada. Em 2011, Lery e colaboradores encontraram proteínas componentes de transportadores ABC de *Gluconacetobacter diazotrophicus* cuja expressão é regulada durante a interação desta bactéria com cana de açúcar. Como essas duas proteínas de *H. rubrisubalbicans* são componentes de sistemas de transporte de membranas elas podem ser encontradas junto com as proteínas secretadas.

Algum dos compostos presentes no extrato de cana de açúcar pode estar inibindo o transporte de moléculas que são transportados por esses dois sistemas, e por isso esses componentes tem a sua expressão diminuída.

A proteína Hrubri 0001.2528 só é expressa na presença de extrato de cana açúcar. Essa proteína tem um domínio homólogo ao domínio GATase, encontrado na protease intracelular da família Pfpl. Como as proteínas que fazem parte dessa família são normalmente intracelulares, os dados obtidos serão novamente analisados para confirmar se a proteína encontrada faz parte do secretoma desta bactéria na presença de extrato de cana de açúcar.

A proteína conservada hipotética Hrubri4387 e a proteína Hrubri1260 da família dos reguladores transcricionais XRE (elemento de resposta a xenobióticos) tiveram a sua expressão aumentada na presença do extrato de cana de açúcar. Os ativadores transcricionais da família XRE contém um motivo HTH de ligação ao DNA similar ao da proteína repressora C1 e ao das proteínas Cro de bacteriófago (Sauer et al., 1982) e da proteína SinR de *Bacillus subtilis* (Gaur et al., 1991). Proteínas dessa família podem ter diversas funções, a proteína MrpJ é um regulador transcricional da família XRE, que controla a motilidade de *Proteus mirabilis* (Pearson & Mobley, 2008).

Novas análises são necessárias para confirmar se essas proteínas são realmente secretadas ou podem ter sido liberadas devido a lise celular. Também é necessário estudo para determinar se essas proteínas estão envolvidas na interação entre o *H. rubrisubalbicans* e a cana de açúcar e qual seria o papel delas nessa interação.

7. DISCUSSÃO

O Sistema de secreção do tipo III das bactérias fitopatogênicas do gênero *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* e *Erwinia* é essencial para o desenvolvimento das doenças causadas por estes organismos (Alfano & Collmer, 1997). O *H. rubrisubalbicans* estabelece uma interação não patogênica com *Poaceae* mas também causa doença nas variedades B-4362 e Taiwang de cana de açúcar e em algumas variedades de sorgo (Olivares et al, 1997; James & Olivares, 1998; James et al, 1997).

As bactérias fitopatogênicas podem ser divididas em dois grupos baseados na homologia dos genes, organização estrutural e padrão de regulação do SST3 (Alfano & Collmer, 1997). A organização estrutural dos genes *hrcUhrpXhrcShrcRhrcQ* e *hrpBhrcJhrpDhrpE* de *H. rubrisubalbicans* é idêntica a de *H. seropedicae* (Pedrosa et al, 2011) e é semelhante a de *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, e *Pantoea stewartii*, componentes do grupo I. *H. rubrisubalbicans* contém o gene *hrpL*, característico do grupo I; e o gene *hrpG*, característico do grupo II. Esse dado juntamente com a localização intermediária de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* entre os grupos I e II observada a partir da árvore filogenética para o gene *hrcN* sugerem que o *H. rubrisubalbicans* possui um sistema híbrido entre os dois grupos. Na região promotora dos genes *orf1*, *orf6*, *hrpO*, *orf8*, *hrpB* e *orf10* foram encontradas sequências conservadas similares as sequências *hrp* box que são reconhecidas pela HrpL de *P. syringae* (Wei & Beer, 1995; Fouts et al, 2002; Ferreira et al, 2006), sugerindo a presença de no mínimo seis operons dependentes de HrpL. Esse resultado é consistente com os dados obtidos a partir da análise de grupamentos *hrp/hrc* de outras bactérias que mostram que esses grupamentos são formados por várias unidades transcricionais. *P. syringae* pv. *syringae* e *E. amylovora* possuem um grupamento gênico de 25 Kb contendo oito unidades transcricionais (Lindgren, 1997).

Análises utilizando o programa Blast e o programa EffectiveT3 permitiram a identificação de cinco possíveis candidatas a proteínas efetoras em *H. rubrisubalbicans*: Hrop1, Hrop2, HropAV1, HropAN1 e HropF1. Somente HropAN1 tem homologia com uma proteína encontrada em *H. seropedicae*, as outras proteínas são únicas de *H. rubrisubalbicans* e podem estar envolvidas com o fenótipo patogênico dessa bactéria em algumas variedades de cana de açúcar e sorgo.

Estirpes mutantes nos genes *hrcN* e *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* não foram capazes de causar a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana de açúcar (Schmidt, 2012). Mutantes *hrcN* de *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859, *X. campestris* pv. *vesicatoria* strain 85 e *R. solanacearum* perderam a sua capacidade virulenta quando testados em algumas plantas (Xho et al, 1997; Lorenz & Buttner, 2009; van Gijsegen et al, 2007). O mutante *hrpE* de *P. syringae* foi incapaz de causar uma resposta hipersensitiva em plantas de *Nicotiana tabacum* (Ramos et al, 2007). Schmidt et al., 2012 mostrou que os mutantes *hrcN* e *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* não causam a doença da estria mosqueada em cana de açúcar B-4362 e nem elicitam o desenvolvimento de lesões nas folhas de *Vigna unguiculata*.

Nossos resultados mostram que além das estirpes mutantes *hrcN* e *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* não causarem a doença da estria mosqueada na variedade B-4362, elas também são menos eficientes na colonização endofítica de arroz e milho, indicando que estes genes do T3SS tem diferentes funções dependendo do hospedeiro. Em hospedeiros suscetíveis o SST3 desencadeia o desenvolvimento da doença, em hospedeiros que não desenvolvem a doença o SST3 seria importante para inibir a resposta da planta, permitindo a colonização bacteriana. A inoculação de estirpes mutantes nos genes do SST3 de *Rhizobium* sp. NGR234 também produz efeitos diferentes quando inoculadas em diferentes plantas (Marie, Broughton & Deakin, 2001). Uma estirpe mutante no gene *hrcN* de *Rhizobium* sp. NGR234 nodula algumas plantas mais eficientemente do que a estirpe selvagem, já em outras plantas a

nodulação é inibida. Algumas análises mostraram que as proteínas efetoras estão relacionadas com esse tipo de comportamento, elas podem ter um efeito positivo, negativo ou neutro sobre o hospedeiro, o que vai influenciar no comportamento da bactéria sobre a planta quando essa proteína estiver ausente (Kambara et al, 2009). Podemos sugerir que o SST3 de *H. rubrisubalbicans* é importante para desencadear a doença na cana de açúcar B-4362 e que a ausência deste sistema faz com que a bactéria colonize esta variedade de cana de açúcar sem causar a doença. Nas plantas, aonde a inoculação do *H. rubrisubalbicans* é potencialmente benéfica, o SST3 é importante para uma colonização eficiente e para a promoção do crescimento vegetal. A ausência deste sistema pode fazer com que a promoção do crescimento vegetal não ocorra.

8. CONCLUSÕES

A organização estrutural dos genes *hrp/hrc*, a presença dos genes *hrpL* e *hrpG* e o posicionamento do *H. rubrisubalbicans* na árvore filogenética da proteína HrcN mostram que este organismo apresenta características similares aos organismos do grupo I e do grupo II, sugerindo que o *H. rubrisubalbicans* e o *H. seropedicae* possuem um sistema híbrido entre os dois grupos.

Baseado na disposição morfológica das células reveladas nos experimentos de microscopia observou-se que a estirpe selvagem M1 provoca mudanças na disposição das células do feixe vascular, estômatos e cloroplastos. Estas mudanças não são observadas na presença das estirpes mutantes TSE e TSN, indicando que o SST3 pode estar relacionado com a capacidade da bactéria de invadir e interferir na disposição e morfologia das células vegetais.

Nossos resultados mostram que ocorre uma diminuição da eficiência de colonização endofítica de arroz e milho pelas estirpes mutantes *hrcN* e *hrpE* de *H. rubrisubalbicans*, indicando que o SST3 está envolvido na colonização destas plantas.

A inoculação de *H. rubrisubalbicans* M1 em plantulas de cana de açúcar e milho promove o crescimento, fato esse que não é observado após a inoculação com a estirpe mutante. Podemos sugerir que o SST3 é importante para uma colonização eficiente e para a promoção do crescimento vegetal de plantas que respondem positivamente a esta bactéria. A ausência deste sistema na bactéria inoculada pode causar um efeito negativo no crescimento da planta.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDON D, BRITO B, BOUCHER C, GENIN S.** A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. **EMBO J.** v. 19(10) P.2304-14, 2000.
- ALFANO JR, COLLMER A.** The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. **J Bacteriol**, 179:5655–5662, 1997.
- ALVES BJR, BODDEY RM, URQUIAGA S.** The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant Soil** 252:1–9, 2003.
- ARNOLD R, BRANDMAIER S, KLEINE F, TISCHLER P, HEINZ E, BEHRENS S, NIINIKOSKI A, MEWES HW, HORN M, RATTEI T.** Sequence-based prediction of type III secreted proteins. **PLoS Pathog**, 5:e1000376, 2009.
- BALDANI JI, POT B, KIRCHHOF G, FALSEN E, BALDANI VLD, OLIVARES FL, HOSTE B, KERSTERS K, HARTMANN A, GILLIS M, 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 J Syst Bacteriol** 46:802–810, 1996.
- BALDANI VLD, BALDANI JI, OLIVARES F, DÖBEREINER J.** Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI JI, BALDANI VLD, SELDIN L, DÖBEREINER J.** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.
- BLOCKER AJ, DEANE JE, VEENENDAAL AK, ROVERSI P, HODGKINSON JL, JOHNSONS, LEASM.** What's the point of the type III secretion system needle? **Proc Natl Acad Sci U S A.** 105(18):6507-13, 2008.
- BODDEY RM, OLIVEIRA OC, URQUIAGA S, REIS VM, OLIVARES FL, BALDANI VLD, DOBEREINER J.** Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil.** v.174., p. 195-209, 1995.

- BRADFORD MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUTINELED, YAHRTL.** Control of gene expression by type III secretory activity **Curr Opin Microbiol.** v.11(2):128-33, 2008.
- BROUGHTON WJ, DILWORTH MJ.** Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochem J.**125(4):1075-80 1971.
- DE BUCK E, LAMMERTYN E, ANNÉ J.** The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. **Trends Microbiol.** 16(9):442-53, 2008.
- BÜTTNER D, BONAS U.** Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **EMBO J.** vol.15, n. 21:5313-22, 2002.
- BUTTNER D, GURLEBECK D, NOEL LD, BONAS U.** HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. **Mol Microbiol**, 54:755–768, 2004.
- BÜTTNER D, HE SY.** Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. **Plant Physiol.** v. 150(4):1656-64, 2009.
- CASCALESE, CHRISTIE PJ.** The versatile bacterial type IV secretion systems. **Nat Rev Microbiol.** v. 1(2):137-49, 2003.
- CHAMI M, GUILVOUT I, GREGORINI M, RÉMIGY HW, MÜLLER SA, VALERIO M, ENGEL A, PUGSLEY AP, BAYAN N.** Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. **J Biol Chem.** 280(45):37732-41, 2005.
- CHO HJ, PARK YJ, NOH TH, KIM YT, KIM JG, SONG ES, LEE DH, LEE BM.** Molecular analysis of the *hrp* gene cluster in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10859. **Microb Pathogenesis**, 44:473–483, 2008.
- CIANCIOTTO NP.** Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends Microbiol.**13(12):581-8, 2005.
- CORDES FS, KOMORIYA K, LARQUET E, YANG S, EGELMAN EH, BLOCKER A, LEA SM.** Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. **J Biol Chem.**;278(19):17103-7, 2003.
- CORNELIS GR, van GIJSEGEM F.** Assembly and function of type III secretory systems. **Annu. Rev. Microbiol.**; 54:735-74, 2000.
- CHRISTOPHER WN, EDGERTON CW.** Bacterial stripe diseases of sugarcane

in Louisiana. **J. Agricult. Res.** v. 41, p. 259, 1992.

CLINE K, MCCAFFERY M. Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. **EMBO J.** 26(13):3039-49. 2007.

CORNELIS GR. The type III secretion injectisome, **Nature**, vol. 2, p. 811-825, 2006.

CORNELIS GR, VAN GIJSEGEM F. Assembly and function of type III secretory systems. **Ann Rev Microbiol**, 54:735–774, 2000.

CUNNAC S, BOUCHER C, GENIN S. Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. **J Bacteriol.** 186(8):2309-18, 2004.

CHRISTOPHER WN, EDGERTON CW. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **J. Agricult. Res.** v. 41, p. 259, 1992.

CRUZ LM, SOUZA EM, WEBER OB, BALDANI JI, DÖBEREINER J, PEDROSA FO 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **App. Envir. Microbiol.** v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DEANE JE, ROVERSI P, CORDES FS, JOHNSON S, KENJALE R, DANIELL S, BOOY F, PICKING WD, PICKING WL, BLOCKER AJ, LEA SM. Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. **Proc Natl Acad Sci** 103(33):12529-33; 2006.

DEHIO C. Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. **Cell Microbiol.** 10(8):1591-8, 2008.

DEREWENDA U, MATEJA A, DEVEDJIEV Y, ROUTZAHN KM, EVDOKIMOV AG, DEREWENDA ZS, WAUGH DS. The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. **Structure.** (2):301-6. 2004.

DINGZ, ATMAKURIK, CHRISTIEPJ. The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. **Trends Microbiol.** (11):527-35, 2003.

DING L, YOKOTA A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus*

comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 54, n. 6, p. 2223-30. 2004.

DEREWENDA U, MATEJA A, DEVEDJIEV Y, ROUTZAHN KM, EVDOKIMOV AG, DEREWENDA ZS, WAUGH DS. The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. **Structure.** (2):301-6. 2004.

EDGAR RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res,** 32:1792–1797, 2004.

ESER M, EHRMANN M. SecA-dependent quality control of intracellular protein localization. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.100(23):p13231-4, 2003.

FERREIRA AO, MYERS CR, GORDON JS, MARTIN GB, VENCATO M, COLLMER A, WEHLING MD, ALFANO JR, MORENO-HAGELSIEB G, LAMBOY WF, DECLERCK G, SCHNEIDER DJ, CARTINHOOR SW. Whole-genome expression profiling defines the HrpL regulon of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, allows de novo reconstruction of the Hrp cis element, and identifies novel coregulated genes. **Mol Plant Microbe In,** 19:1167–1179, 2006.

FILLOUX A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. **Biochim Biophys Acta.** v 1694(1-3):163-79, 2004.

FILLOUXA, HACHANIA, BLEVESS. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology.** 154 (6):1570-83, 2008.

FREDERICK RD, AHMAD M, MAJERCZAK DR, ARROYO-RODRÍGUEZ AS, MANULIS S, COPLIN DL. Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. **Mol Plant Microbe Interact.** v. 14(10):1213-22, 2001.

FOUTS DE, ABRAMOVITCH RB, ALFANO JR, BALDO AM, BUELL CR, CARTINHOOR S, CHATTERJEE AK, D'ASCENZO M, GWINN ML, LAZAROWITZ SG, LIN NC, MARTIN GB, REHM AH, SCHNEIDER DJ, VAN DIJK K, TANG X, COLLMER A. Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. **P Natl Acad Sci USA,** 19:2275–2280, 2002.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLEO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic

acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.

GENIN S, BOUCHER CA. A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. **Mol Gen Genet.** 243(1):112-8, 1994.

GENIN S, GOUGH CL, ZISCHEK C, BOUCHER CA. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. **Mol Microbiol.**6(20):3065-76,1992.

GALÁN JE.; COLLMER A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. **Science.** v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GAZI AD, BASTAKI M, CHAROVA SN, GKOUKOULIA EA, KAPELLIOS EA, PANOPOULOS NJ, KOKKINIDIS M. Evidence for a Coiled-coil Interaction Mode of Disordered Proteins from Bacterial Type III Secretion Systems. **J Biol Chem.** 283(49):34062-8; 2008.

GHOSH P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, vol.68, p. 771–795, 2004.

GENIN S, GOUGH CL, ZISCHEK C, BOUCHER CA. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. **Mol Microbiol.** v. 6(20):3065-76, 1992.

GERLACH RG, HENSEL M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. **International Journal of Medical Microbiology.** v. 297, p. 401-415, 2007.

GOODMAN RN, NOVACKY A. The hypersensitive defense reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon. **American Phytopathological Society Press.** p. 7–8, 1994.

GREENBERG JT, VINATZER BA. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. **Curr Opin Microbiol.** 6(1):20-8, 2003.

GYANESHWAR P, JAMES EK, REDDY PM, LADHA JK. Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytol**, v. 154, p.131–145, 2002.

HENDERSON IR, NAVARRO-GARCIA F, DESVAUX M, FERNANDEZ RC, ALA'ALDEEN D Type V protein secretion pathway: the autotransporter story **Microbiol Mol Biol Rev.** 68(4):692-744, 2004.

- HENDRICKSON EL, GUEVERA P, AUSUBEL FM.** The alternative sigma factor RpoN is required for hrp activity in *Pseudomonas syringae* pv. maculicola and acts at the level of *hrpL* transcription. **J Bacteriol**, 182:3508–3516, 2000.
- HOAGLAND DR, ARNON DI** The water culture method for growing plants without soil. **Cal Agr Exp Station**, 1938.
- HOICZYK E, ROGGENKAMP A, REICHENBECHER M, LUPAS A, HEESEMANN J.** Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. **EMBO J**. 19(22):5989-99, 2000.
- HUECK CJ.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v 62, p. 379-433, 1998.
- IM WT, YOKOTA A, KIM MK, LEE ST.** *Kaistia adipata* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium. **J Gen Appl Microbiol.**, v. 50, p. 249-254, 2004.
- JAMES EK, REIS VM, OLIVARES FL, BALDANI JI, DÖBEREINER J.** Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J Exp Bot** v. 45:757–766, 1994.
- JAMES EK, OLIVARES FL, BALDANI JI, DOBEREINER J.** *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n 308, p. 785-797, 1996.
- JAMES EK, OLIVARES FL.** Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci.** v.17, p.77-119, 1998.
- JACOB-DUBUISSON F, FERNANDEZ R, COUTTE L.** Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. **Biochim Biophys Acta.** v. 1694(1-3):235-57, 2004.
- JOHNSON TL, SCOTT ME, SANDKVIST M.** Mapping critical interactive sites within the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* type II secretion protein EpsM. **J Bacteriol.** v. 189(24):9082-9, 2007.
- JOHNSON S, BLOCKER A.** Characterization of soluble complexes of the *Shigella flexneri* type III secretion system ATPase. **FEMS Microbiol Lett.** 286(2):274-8; 2008.
- JUNG SY, LEE MH, OH TK, YOON J. H.** *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 57, p. 2284-2288, 2007.

KAMBARA K, ARDISSONE S, KOBAYASHI H, SAAD MM, SCHUMPP O, BROUGHTON WJ, DEAKIN WJ. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. **Mol Microbiol**, 71:92–106, 2009.

KENNEDY IR, CHOUDHURY ATMA, KECSKE´ SML. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biol. Biochem**, v. 36,p.1229–1244, 2004.

KIRCHHOF G, ECKERT B, STOFFELS M, BALDANI JI, REIS VM, HARTMANN A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 157-168, 2001.

KUBORI T, SUKHAN A, AIZAWA SI, GALÁN JE. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v 97(18):10225-30, 2000.

KLASSEN G, PEDROSA FO, SOUZA EM, FUNAYAMA S, RIGO LU. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 887-891, 1997.

KUBORI T, SUKHAN A, AIZAWA SI, GALÁN JE. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v 97(18):10225-30, 2000.

LAEMMLI UK. SDS-PAGE. **Nature**, 227, 680-685, 1970.

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

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

LINDGREN PB: The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. **Ann Rev Phytopathol**, 35:129–152, 1997.

LORENZ C, BÜTTNER D. Functional characterization of the type III secretion ATPase HrcN from the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **J Bacteriol**, 191:1414–1428, 2009.

MARCHLER-BAUER A, ANDERSON JB, CHITSAZ F, DERBYSHIRE MK, DEWEESE-SCOTT C, FONG JH, GEER LY, GEER RC, GONZALES NR,

- GWADZ M, HE S, HURWITZ DI, JACKSON JD, KE Z, LANCZYCKI CJ, LIEBERT CA, LIU C, LU F, LU S, MARCHLER GH, MULLOKANDOV M, SONG JS, TASNEEM A, THANKI N, YAMASHITA RA, ZHANG D, ZHANG N, BRYANT SH:** CDD specific functional annotation with the Conserved Domain Database. **Nucleic Acids Res**, 37:205–210, 2009.
- MARIE C, BROUGHTON WJ, DEAKIN WJ:** Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? **Curr Opin Plant Biol**, 4:336–342, 2001.
- MARLOVITS TC, KUBORI T, SUKHAN A, THOMAS DR, GALÁN JE, UNGER VM.** Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. **Science**. 306(5698):1040-2, 2004.
- MORAES TF, SPRETER T, STRYNADKA NC.** Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. **Curr Opin Struct Biol**;18(2):258-66. 2008.
- MOTA LJ, SORG I, CORNELIS GR.** Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. **FEMS Microbiol Lett**. v. 252(1):1-10, 2005.
- MUDGETT MB, STASKAWICZ BJ.** Protein signaling via type III secretion pathways in phytopathogenic bacteria. **Curr. Opin. Microbiol**. v. 1, p. 109-114, 1998.
- MUELLER CA, BROZ P, CORNELIS GR.** The type III secretion system tip complex and translocon. **Mol Microbiol**. v. 68(5):1085-95, 2008.
- MÜLLER SA, POZIDIS C, STONE R, MEESTERS C, CHAMI M, ENGEL A, ECONOMOU A, STAHLBERG H.** Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. **Mol Microbiol**. 61(1):119-25; 2006.
- NEUWALD AF, ARAVIND L, SPOUGE JL, KOONIN EV.** AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. **Genome Res**. v. 9(1):27-43 1999.
- OLIVARES FL, BALDANI VLD, REIS VM, BALDANI JI, DÖBEREINER J.** Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of gramineae. **Biol. Fertil Soils**, 21, 197- 200, 1996.
- OLIVARES FL, JAMES EK, BALDANI JI, DOBEREINER J.** Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol**. v.135, p. 723-737, 1997.
- OLIVEIRA ALM, URQUIAGA S, DOBEREINER J, BALDANI JI.** The effect of

inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA ALM, CANUTO EL, URQUIAGA S, REIS VM, BALDANI JI. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

PALLEN MJ, CHAUDHURI RR, HENDERSON IR. Genomic analysis of secretion systems. **Curr Opin Microbiol.** v. 6(5):519-27, 2003.

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

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

PAPANIKOU E., KARAMANOU S., ECONOMOU A. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. **Nat Rev Microbiol.** 5(11):839-51, 2007.

PEABODY CR, CHUNG YJ, YEN MR, VIDAL-INGIGLIARDI D, PUGSLEY AP, SAIERMHJr. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. **Microbiology.** v. 149 (11):3051-72, 2003.

PEDROSA FO, MONTEIRO RA, WASSEM R, CRUZ LM, AYUB RA, COLAUTO NB, FERNANDEZ MA, FUNGARO MH, GRISARD EC, HUNGRIA M, MADEIRA HM, NODARI RO, OSAKU CA, PETZL-ERLER ML, TERENCEZ H, VIEIRA LG, STEFFENS MB, WEISS VA, PEREIRA LF, ALMEIDA MI, ALVES LR, MARIN A, ARAUJO LM, BALSANELLI E, BAURA VA, CHUBATSU LS, FAORO H, FAVETTI A, FRIEDERMANN G, GLIENKE C, KARP S, KAVACORDEIRO V, RAITTZ RT, RAMOS HJ, RIBEIRO EM, RIGO LU, ROCHA SN, SCHWAB S, SILVA AG, SOUZA EM, TADRA-SFEIR MZ, TORRES RA, DABUL AN, SOARES MA, GASQUES LS, GIMENES CC, VALLE JS, CIFERRI RR, CORREA LC, MURACE NK, PAMPHILE JA, PATUSSI EV, PRIOLI AJ, PRIOLI SM, ROCHA CL, ARANTES OM, FURLANETO MC, GODOY LP, OLIVEIRA CE, SATORI D, VILAS-BOAS LA, WATANABE MA, DAMBROS BP, GUERRA MP, MATHIONI SM, SANTOS KL, STEINDEL M, VERNAL J, BARCELLOS FG, CAMPO RJ, CHUEIRE LM, NICOLÁS MF, PEREIRA-FERRARI L, SILVA JL, GIOPPO NM, MARGARIDO VP, MENCK-SOARES MA, PINTO FG, SIMÃO RDE C, TAKAHASHI EK, YATES MG,

- SOUZA EM.** Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genet**, e1002064, 2011.
- PIMENTEL JP, OLIVARES FL, PITARD R, URQUIAGA S, AKIBA F, DÖBEREINER J.** Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil** 137:61–65, 1991.
- POSTGATE JR.** The Fundamentals of Nitrogen Fixation. **New York, NY: Cambridge University Press**, 1982.
- POZIDIS C, CHALKIADAKI A, GOMEZ-SERRANO A, STAHLBERG H, BROWN I, TAMPAKAKI AP, LUSTIG A, SIANIDIS G, POLITOU AS, ENGEL A, PANOPOULOS NJ, MANSFIELD J, PUGSLEY AP, KARAMANOU S, ECONOMOU A.** Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. **J Biol Chem**.278(28):25816-24, 2003.
- PUKATZKI S, MA AT, STURTEVANT D, KRASTINS B, SARRACINO D, NELSON WC, HEIDELBERG JF, MEKALANOS JJ.** Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 31;103(5):1528-33. 2006.
- PUGSLEY AP, FRANCETIC O, POSSOT OM, SAUVONNET N, HARDIE KR.** Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria--a review. **Gene**. v. 11;192(1):13-9, 1997.
- RAHME LG, MINDRINOS MN, PANOPOULOS NJ.** Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. **J. Bacteriol**. v. 174, p. 3499-3507, 1992.
- RAMOS AR, MORELLO JE, RAVINDRAN S, DENG WL, HUANG HC, COLLMER A.** Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. **J Bacteriol**. 189(15):5773-8; 2007.
- REDDY PM, JAMES EK, LADHA JK.** Nitrogen fixation in rice. In: Leigh GJ (ed) Nitrogen fixation at the millennium. **Elsevier** 421–445, 2002.
- ROTHBALLER M, SCHMID M, KLEIN I, GATTINGER A, GRUNDMANN S,**

- HARTMANN A.** Characterization of *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov. isolated from surface sterilised wheat roots. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 56, p. 1341-1348, 2006.
- SAIER MH JR.** Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. **J Membr Biol**. 214(2):75-90. 2006.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T.** Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANDKVIST M.** Type II secretion and pathogenesis. **Infect Immun**. v. 69(6):3523-35, 2001.
- SARGENT F.** The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. **Biochem Soc Trans**. 35(Pt 5):835-47, 2007.
- SCHMIDT MA.** Dissertação de mestrado. **envolvimento do sistema de secreção do tipo III de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* na interação fitopatogênica.** UFPR, 2009.
- SCHMIDT MA, SOUZA EM, BAURA VA, WASSEM R, YATES MG, PEDROSA FO, MONTEIRO RA.** Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz J Med Biol Res** 44:182–185, 2011.
- SCHMIDT MA, BALSANELLI E, FAORO H, CRUZ LM, WASSEM R, DE BAURA VA, WEISS V, YATES MG, MADEIRA HM, PEREIRA-FERRARI L, FUNGARO MH, DE PAULA FM, PEREIRA LF, VIEIRA LG, OLIVARES FL, PEDROSA FO, DE SOUZA EM, MONTEIRO RA.** The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. **BMC Microbiol**. v. 6;12:98, 2012.
- SHUKLA HD.** Proteomic analysis of acidic chaperones, and stress proteins in extreme halophile *Halobacterium* NRC-1: a comparative proteomic approach to study heat shock response. **Proteome Sci**. v. 4, 4-6, 2006.
- SHUTINOSKI B, SCHMIDT MA, HEUSIPP G.** Transcriptional regulation of the Yts1 type II secretion system of *Yersinia enterocolitica* and identification of secretion substrates. **Mol Microbiol**. 75(3):676-91, 2010.
- STONE CB, JOHNSON DL, BULIR DC, GILCHRIST JD, MAHONY JB.** Characterization of the putative type III secretion ATPase CdsN (Cpn0707) of *Chlamydomonas reinhardtii*. **J Bacteriol**. 190(20):6580-8; 2008.

SUKHANA, KUBORIT, WILSONJ, GALÁNJE. Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex **J Bacteriol.** v.183(4):1159-67, 2001.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. **Mol Biol Evol**, 28:2731–2739, 2011.

TAN ZQ, MEN R, ZHANG RY, HUANG Z. First report of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* causing mottled stripe disease on sugarcane in China. **Am Phytopathol Soc** 94:379.2–379.2, 2010.

TANG X, XIAO Y, ZHOU JM. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. **Mol Plant Microbe In**, 19:1159–1166, 2006.

THANASSI DG, HULTGREN SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 420-30, 2000.

TSENG TT, TYLER BM, SETUBAL JC. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology **BMC Microbiol.** v. 19;9 , 2009.

URQUIAGA S, CRUZ HS, BODDEY RM. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p.105-114, 1992.

VALVERDE A, VELAZQUEZ E, GUTIERREZ C, CERVANTES E, VENTOSA A, IGUAL JM. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VAN GIJSEGEM F, VASSE J, DE RYCKE R, CASTELLO P, BOUCHER C. Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. **Mol Microbiol**, 44:935–946, 2002.

WANG Y, OUELLETTE AN, EGAN CW, RATHINAVELAN T, IM W, DE GUZMAN RN Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL, and MxiH. **J Mol Biol.** 31;371(5):1304-14, 2007.

WEI ZM, BEER SV. *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. **J Bacteriol**, 177:6201–

6210, 1995.

WOESTYN S, ALLAOUI A, WATTIAU P, CORNELIS GR. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. **J Bacteriol.** 176(6):1561-9; 1994.

WOESTYN S, OLIVÉ N, BIGAIGNON G, AVESANI V, DELMÉE M. Study of genotypes and virB4 secretion gene of *Bartonella henselae* strains from patients with clinically defined cat scratch disease. **J Clin Microbiol.** v. 42(4):1420-7, 2004.

XIAO Y, LU Y, HEU S, HUTCHESON SW. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster. **J. Bacteriol.** vol.174, n. 6, p. 1734-1741, 1992.

XIAO Y, HEU S, YI J, LU Y, HUTCHESON SW. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. **J Bacteriol**,176:1025–1036, 1994.

YIP CK, STRYNADKA NC. New structural insights into the bacterial type III secretion system. **Trends Biochem Sci.** p. 223-30, 2006.

YIP CK, KIMBROUGH TG, FELISE HB, VUCKOVIC M, THOMAS NA, PFUETZNER RA, FREY EA, FINLAY BB, MILLER SI, STRYNADKA NC. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. **Nature.** 435(7042):702-7, 2005.

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