

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THALITA REGINA TULESKI

**Identificação de genes de *Herbaspirillum sp.* envolvidos na
Interação Planta-bactéria**

CURITIBA
2010

THALITA REGINA TULESKI

**Identificação de genes de *Herbaspirillum* sp. envolvidos na
Interação Planta-bactéria**

Monografia apresentada ao
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular como requisito parcial à conclusão
do curso de Bacharelado em Ciências
Biológicas do Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rose Adele Monteiro

Co-orientadora: Maria Augusta Schmidt

CURITIBA
2010

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mauro e Sônia. Antes de mais nada, agradeço o amor e o carinho que vocês dedicam a mim todos os dias. Obrigada por terem zelado pela minha educação e por terem tornado meu sonho possível. Obrigada por compreenderem tantas vezes a minha ausência e, ainda assim, por me apoiarem nos projetos que escolhi. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

Aos meus irmãos, Aline e Álvaro pela companhia, apoio e por vibrarem comigo em cada vitória, desde o banho de lama.

A toda minha família, avós, tios e primos por me apoiar sempre e me incentivar na busca dos meus objetivos se orgulhando das minhas conquistas.

A todos os professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, pelo auxílio intelectual e pela oportunidade de desenvolver trabalho relevantes.

Em especial, a Professora Rose Adele Monteiro, por me orientar no momento mais importante, por me apoiar em todos os projetos de pesquisa que trabalhei e por me incentivar nos momentos de desânimo e cansaço. Ao Professor Emanuel Maltempi de Souza, pela orientação durante os 3 anos de Iniciação Científica e por me incentivar a ser sempre melhor.

A todos os funcionários do Núcleo de FBN, em especial ao Valter e a Roseli Prado, pela dedicação a todos os alunos e por zelar pela qualidade do nosso trabalho.

A todos os colegas de laboratório, pelo apoio e pelas piadas de todos os dias. Ao Marco Aurélio, Marco Antônio, Anne, Adriano e Tuca; em especial, ao Helisson por me iniciar no mundo das bibliotecas e das mini-preps em bloco, e ao Eduardo e a Michelle por me ensinarem a trabalhar com as minhas tão queridas plantinhas. A Vivi e ao Arnaldo por compartilhar o espaço e pelo incentivo nos momentos difíceis

Aos meus amigos, tão importantes durante todo este tempo.

Lu e Ká, obrigado por estarem comigo sempre, por terem permanecido ao meu lado por estes 4 anos, sempre me apoiando e me distraindo.

Ao Diegão pelos 4 anos de amizade, risadas e discussões sobre a licenciatura. Ao Toni, Samuel e Ana Carol pela amizade e pelas conversas na cantina. Ao Vini, a Van e a Ligia por serem parte da nossa turma e por estarem sempre presentes.

Aos meus amigos, não biólogos, que perto ou longe me deram tanta força e incentivo. Luiza, Felipe e Thaíse, meus grandes amigos de sempre!

A Cami, por toda a amizade, companhia, conversas e por me amparar em todos os momentos.

A Joyce, por toda amizade e carinho dedicados a mim. Obrigada por sempre ficar ao meu lado nos momentos que eu mais precisei.

A Carol, obrigada por ficar comigo em todas as situações, por ser tão importante pra mim e por ser a amiga que você é. Minha velinha-mor, sempre!

Ao Japa, obrigada por tudo. Desde as caronas até a dedicação e o carinho que você tem por mim. Obrigada por ser a pessoa que mais me apoiou durante estes 4 anos.

Agradeço a todos, que de alguma forma, me auxiliaram no trabalho ou que, simplesmente, estiveram presentes durante este tempo. Com certeza, não teria conseguido sozinha.

Ao CNPq, INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio e Fundação Milênio pelo suporte financeiro.

RESUMO

Organismos diazotróficos são capazes de converter o nitrogênio atmosférico em amônio, forma assimilável pelas plantas. Entre estes organismos encontramos as bactérias do gênero *Herbaspirillum*. O gênero *Herbaspirillum* pertence a classe β do Filo das Proteobactérias e compreende microrganismos gram-negativos e geralmente vibrióides. Dentre as várias espécies já descritas estão *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, que possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico sob condições de microaerofilia e são encontradas em associação com plantas de interesse econômico, como milho, arroz e cana-de-açúcar. *Herbaspirillum seropedicae* é capaz de aumentar em até 120% os níveis de nitrogênio acumulado na planta, promovendo assim o crescimento vegetal. Já *Herbaspirillum rubrisubalbicans* é conhecido por ser o causador da doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar e da estria vermelha em variedades suscetíveis de sorgo. O estudo das diferenças fenotípicas e genotípicas dessas duas bactérias pode esclarecer por que o *H. rubrisubalbicans* pode se comportar como fitopatógeno em determinadas plantas e o *H. seropedicae* não. O estudo dos genes exclusivos de cada uma destas espécies pode ajudar a encontrar os fatores responsáveis pela alteração nos mecanismos de interação planta-bactéria. Através da construção de uma Biblioteca Subtrativa, pudemos obter genes presentes na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* e ausentes na estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*. Entre os genes encontrados está o gene *AmpG*, que codifica para uma muopeptídeo permease. Através de experimentos de colonização verificou-se que a estirpe mutante no gene *AmpG* possui uma menor capacidade de colonizar os tecidos internos de milho. Isso mostra que este gene pode estar relacionado com os processos de interação planta-bactéria, mesmo que indiretamente, já que o seu produto é conhecido por atuar nos processos de reciclagem de proteoglicanos da parede celular. Neste projeto também foi verificado se uma mutação no gene *hrcN* (codifica para ATPase do SST3) de *H. rubrisubalbicans* afetaria a colonização de raízes de milho por esta bactéria. Nossos resultados mostraram que o número de células desta estirpe mutante de *H. rubrisubalbicans* colonizando endofiticamente as raízes de milho é menor do que o número de bactérias das estirpe selvagem (M1) de *H. rubrisubalbicans*. Estes resultados indicam que o SST3 está envolvido na colonização do milho por *H. rubrisubalbicans*. Com o objetivo de comparar o padrão de adesão e colonização de raízes de milho pelas bactérias *H. rubrisubalbicans* M1 e *H. seropedicae* RAM10 nós realizamos experimentos de inoculação dessas bactérias separadas e em conjunto. Os resultados mostram que, quando consorciadas, a estirpe RAM10 de *H. seropedicae* aderiu menos e não foi capaz de colonizar os tecidos internos, sendo totalmente suprimida pela presença da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*. Estes resultados mostram que existem vários fatores envolvidos nos processos de interação planta-bactéria e que as bactérias, quando inoculadas em conjunto, podem ter um padrão de interação diferenciado e inesperado.

ABSTRACT

Diazotrophic organisms are capable of converting atmospheric nitrogen into ammonia, forms assimilated by plants. Between these bacteria is the genus *Herbaspirillum*. The genus *Herbaspirillum* belongs to the β class of the phylum Proteobacteria and includes gram-negative and generally vibrioides. Among the several species already described are *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, which have the ability to fix atmospheric nitrogen under microaerobic conditions and are found in association with plants of economic interest, such as corn, rice and cane sugar. *Herbaspirillum seropedicae* is capable of up to 120% increase in the levels of nitrogen accumulated in the plant, thus promoting plant growth. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* already is known to be the cause of mottled stripe disease in B-4362 variety of cane sugar and red stripe in susceptible varieties of sorghum. The study of phenotypic and genotypic differences of these two bacteria may explain why *H. rubrisubalbicans* can behave as a pathogen in certain plants and *H. seropedicae* not. The study of genes unique to each species may help to find the factors responsible for changes in the mechanisms of plant-bacteria interaction. Through the construction of a subtractive library, we could obtain genes present in strain SMR1 *H. seropedicae* and absent in the M1 strain of *H. rubrisubalbicans*. Among the genes found *AmpG* is the gene that encodes for a muropeptide permease. Through experiments of colonization was found that the mutant strain has a gene *AmpG* less able to colonize the inner tissues of maize. This shows that this gene may be related to the processes of plant-bacteria interaction, even indirectly, since their product is known to act in recycling processes of cell wall proteoglycans. This project was also verified that a mutation in the gene *hrcN* (encoding ATPase SST3) *H. rubrisubalbicans* affect the colonization of maize roots by this bacterium. Our results showed that the number of cells in this mutant strain of *H. rubrisubalbicans* colonizing endophyte of maize roots is smaller than the number of bacteria of wild type (M1) of *H. rubrisubalbicans*. These results indicate that T3SS is involved in colonization of maize by *H. rubrisubalbicans*. Aiming to compare the pattern of adherence and colonization of maize roots by the bacteria *H. rubrisubalbicans* M1 and *H. seropedicae* RAM10 we performed experiments of inoculation of bacteria separate and together. The results show that, when associated, the strain of *H. seropedicae* RAM10 adhered less and was not able to colonize the inner tissues, being totally suppressed by the presence of the M1 strain of *H. rubrisubalbicans*. These results show that there are several factors involved in the processes of plant-bacteria and bacteria, when inoculated together, may have a different pattern of interaction and unexpected.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Colonização por <i>H. seropedicae</i> em tecidos de milho e trigo.....	14
FIGURA 2 - Doença da estria mosqueada causada por <i>Herbaspirillum</i> <i>rubrisubalbicans</i> em cana-de-açúcar.....	15
FIGURA 3 – <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> colonizando feixes vasculares de folha de sorgo.....	16
FIGURA 4 - Complexo supramolecular do SST3.....	21
FIGURA 5 – Perfil eletroforético da mini-preparação dos plasmídeos da biblioteca SM1.....	34
FIGURA 6 – Distribuição das seqüências obtidas de acordo com a similaridade com o genoma de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Herbaspirillum</i> <i>rubrisubalbicans</i>	35
FIGURA 7 – Categorização funcional das proteínas encontradas na Biblioteca SM1.....	36
GRÁFICO 1: Colonização interna das raízes de milho com as estirpes de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> SmR1, 13C43 e 9E3.....	43
GRÁFICO 2: Colonização interna de raízes de milho com as estirpes de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> SmR1, T2B10, 13C9 e 39B7.....	44
GRÁFICO 3: Ensaio de colonização interna de raízes de milho (cultivar SHS 3031) com as estirpes de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e mutante <i>hrcN</i>	46
GRÁFICO 4: Ensaio de adesão com os organismos M1 e RAM10 em raízes de milho (cultivar SHS 5055).....	48
GRÁFICO 5: Ensaio de adesão com co-inoculação das estirpes M1 e RAM10 em raízes de milho (cultivar SHS 5055).....	49
GRÁFICO 6: Ensaio de Colonização interna das raízes de milho (cultivar SHS 5055) 1, 3 e 7 dia após a inoculação (d.a.i.).....	50
GRÁFICO 7: Ensaio de Competição interna em raízes de milho (cultivar SHS 5055) 1 dias após a inoculação com as estirpes RAM10 e M1.....	52
GRÁFICO 8: Ensaio de Competição interna em raízes de milho (cultivar SHS 5055) 3 dias após a inoculação com as estirpes RAM10 e M1.....	53
GRÁFICO 9: Ensaio de Competição interna em raízes de milho (cultivar SHS 5055) 7 dias após a inoculação com as estirpes RAM10 e M1.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES BACTERIANAS.....	22
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DOS ORGANISMOS MUTANTES UTILIZADOS.....	23
TABELA 3: MEIO NFbHP-MALATO	24
TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADOS.....	26
TABELA 5 - SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS PLANT MEDIUM.....	30
TABELA 6 – DIFERENTES PRODUTOS ENCONTRADOS DURANTE A ANÁLISE DA BIBLIOTECA SM1.....	37
TABELA 7 – PROTEÍNAS QUE APRESENTAM IDENTIDADE COM <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	41.
TABELA 8 – ORGANISMOS MUTANTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE COLONIZAÇÃO	42

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	13
2.2 <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	14
2.3 Fatores envolvidos no processo de Interação Planta:Bactéria.....	16
2.3.1 Lipopolissacarídeos (LPS).....	17
2.3.2 Exopolissacarídeos (EPS)	17
2.3.3 Sistemas de Secreção.....	17
2.3.3.1 Sistema de Secreção do Tipo III.....	19
2.3.3.2 O SST3 em <i>Herbaspirillum sp.</i>	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Bactérias.....	22
3.2 Estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i>	22
3.3 Meios de cultivo.....	23
3.3.1 Meios de cultivo para <i>E. coli</i>	23
3.3.1 Meios de cultivo para <i>Herbaspirillum SP</i>	24
3.4 Antibióticos.....	25
3.5 Construção da Biblioteca Subtrativa (SSH).....	26
3.6 Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i> estirpe DH10B... ..	26
3.6.1 Transformação bacteriana	26
3.7 Coleta dos clones obtidos após a transformação.....	27
3.7.1 Estocagem dos clones.....	27
3.8 Purificação do DNA plasmidial em placas de 96 poços.....	27
3.9 Eletroforese de DNA.....	28
3.10 Sequenciamento dos clones da Biblioteca SM1.....	28
3.11 Comparação das seqüências obtidas da Biblioteca SM1 com banco de dados.....	29
3.12 Experimentos de interação entre as estirpes SmR1, M1 e mutantes de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> em plântulas de milho (<i>Zea mays</i>).....	29
.3.12.1 Cultivares vegetais.....	29
3.12.2 Desinfecção das plântulas e sementes.....	30
3.12.3 Condições de cultivo das plântulas de milho.....	30

3.12.4	Preparação dos inoculo de <i>Herbaspirillum sp.</i>	31
3.12.5	Inoculo das estirpes bacterianas em milho.....	31
3.12.6	Ensaio de adesão das estirpes de <i>Herbaspirillum sp.</i> às raízes de milho.....	31
3.12.7	Ensaio de colonização das estirpes de <i>Herbaspirillum sp.</i> às raízes de milho.....	31
3.12.8	Ensaio de competição das estirpes de <i>Herbaspirillum sp.</i> às raízes de milho.....	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	Construção da biblioteca subtrativa SM1.....	33
4.2	Mini-preparação dos Plasmídeos da Biblioteca SM1.....	33
4.3	Sequenciamento da Biblioteca SM1	34
4.4	Comparação das seqüências obtidas a partir da Biblioteca SM1 com os bancos de dados Genopar e GenBank.....	35
4.5	Experimentos de Colonização interna das plântulas de milho com as estirpes SmR1 e mutantes.....	41
4.5.1	Ensaio de Colonização interna de milho pelas estirpes mutantes 13C43, 9E3, T2B10, 13C9 e 39B7	42
4.5.2	Experimentos de Colonização interna das raízes de milho com as estirpes de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e mutante <i>hrcN</i>	46
4.5.3	Experimentos de Adesão as raízes de milho com as estirpes M1 de <i>H. rubrisubalbicans</i> e RAM10 de <i>H. seropedicae</i>	47
4.5.4	Experimentos de Colonização interna de raízes de milho pelas estirpes M1 de <i>H. rubrisubalbicans</i> e RAM10 de <i>H. seropedicae</i>	50
5.	CONCLUSÃO.....	56
6.	REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos genes envolvidos no processo de interação planta-bactéria tem grande importância para que seja possível entender os diferentes mecanismos de ação dos microrganismos sobre a planta.

O conjunto estudado de genes e fatores envolvidos no processo de interação planta-bactéria pode esclarecer porque diferenças fenotípicas marcantes se manifestam entre organismos semelhantes e pertencentes ao mesmo gênero, como *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

O presente trabalho tem como objetivo encontrar diferenças genotípicas e fenotípicas entre esses dois organismos. Durante este projeto construímos uma Biblioteca Subtrativa que contem genes espécie-específicos de *Herbaspirillum seropedicae*, realizamos experimentos de adesão e colonização interna de raízes de milho usando organismos mutantes nos gene *AmpG* e em genes que codificam para proteínas hipotéticas de *H. seropedicae* e no gene *hrcN* de *H. rubrisubalbicans*; realizamos também experimentos de competição entre estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O nitrogênio está presente nos aminoácidos, proteínas, DNA, RNA e em outras estruturas celulares. Apesar de ser o mais abundante dos elementos do ar atmosférico - aproximadamente 80% do ar é composto por nitrogênio - os animais e as plantas não são capazes de metabolizá-lo na forma gasosa e retirá-lo diretamente do ar.

As plantas não conseguem utilizar o nitrogênio atmosférico, precisando de auxílio de bactérias fixadoras de nitrogênio (MYLONA *et al.*, 1995). A transformação do nitrogênio existente no ar atmosférico em formas assimiláveis é chamada de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), sendo realizada por bactérias fixadoras de nitrogênio.

As bactérias fixadoras de Nitrogênio estabelecem uma interação benéfica com a planta hospedeira, muitas delas são promotoras do crescimento vegetal, além de contribuir com o N₂ fixado também produzem fitohormônios.

As bactérias fixadoras de nitrogênio se dividem em dois grandes grupos principais: as formadoras de nódulos e as endofíticas. Entre as formadoras de nódulos estão os gêneros *Rhizobium*, *Bradirhizobium* e *Azorhizobium*. Já entre as endofíticas – microrganismos que passam a maior parte do seu ciclo de vida dentro de tecidos da plantas – encontramos o gênero *Herbaspirillum* (MERCANTE *et al.*, 2002).

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe β do Filo das Proteobactérias e compreende microrganismos gram-negativos e geralmente vibrióides. As células tem diâmetro estimado em 0,6 e 0,7μm, comprimento entre 1,5 e 5μm e podem apresentar de 1 a 3 flagelos. Estes organismos fixam nitrogênio atmosférico sob condições de microaerofilia, são aeróbios e não fermentam açúcares (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992).

Aparentemente, a associação entre *Herbaspirillum* e gramíneas ocorre com a adesão da bactéria à superfície radicular, seguida pela colonização de pontos das raízes secundárias e ferimentos da epiderme, penetração e espalhamento através dos espaços intercelulares da raiz, aerênquima, feixes vasculares e por fim as porções aéreas (JAMES *et al.*, 1997).

Já foram descritas dez espécies de *Herbaspirillum*: *H. rizosphaerae*, *H. autotrophicum*, *H. chlorophenolicum*, *H. frisingense*, *H. hiltneri*, *H. huttiense*, *H. lusitanum*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. aquaticum* (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996; DING & YOKOTA, 2004; IM *et al.*, 2004; KIRCHHOF *et al.*, 2001; ROTHBALLER *et al.*, 2006; VALVERDE *et al.*, 2003;; JUNG *et al.*, 2007 Dobrists, A. P. 2009)

2.1 *Herbaspirillum seropedicae*

O *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica encontrada em associação com várias plantas de interesse econômico como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992).

Estas associações podem trazer benefícios mútuos, aumentando de 34 a 120% o nitrogênio acumulado sem causar danos à planta, e assim, aumentando significativamente o crescimento vegetal (BALDANI *et al.*, 2000), indicando grande potencial desta bactéria como biofertilizante nitrogenado. A colonização ocorre freqüentemente nos espaços intercelulares e nos feixes vasculares (JAMES *et al.*, 1997) (Figura 1).

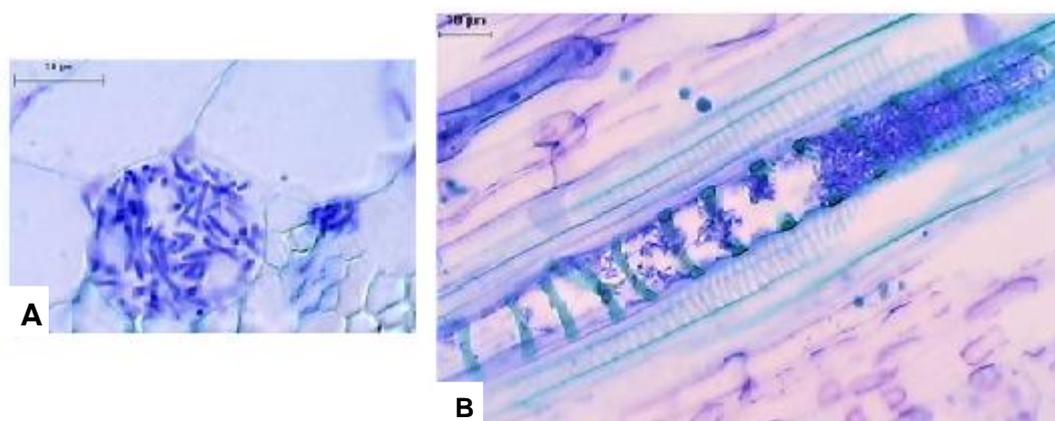


FIGURA 1 – Colonização por *H. seropedicae* em tecidos de milho e trigo- *Herbaspirillum seropedicae* colonizando (A) colonizando os vasos do xilema de milho 15 dias após a inoculação e (B) Corte longitudinal dos vasos do xilema de trigo mostrando a colonização por *H. seropedicae*, após 15 dias de inoculação. Fonte: Roncato, L.D., *et a*, (2003)

2.2 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Herbaspirillum rubrisubalbicans foi inicialmente descrito como *Pseudomonas rubrisubalbicans* e, mais tarde, com base em estudos moleculares foi incluído no gênero *Herbaspirillum* (BALDANI *et al.*, 1996).

H. rubrisubalbicans é uma espécie fitopatogênica, causadora da doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar (FIGURA 2) e estria vermelha em variedades susceptíveis de sorgo. Um sintoma da estria mosqueada é o desenvolvimento de estrias vermelhas com manchas brancas nas folhas de cana-de-açúcar. A bactéria coloniza os vasos do meta e protoxilema e o bloqueio destes vasos causa necrose ao redor do ponto de inoculação. A estria mosqueada aumenta desde o ponto de inoculação em direção ao topo da folha, à medida que a bactéria avança no interior dos vasos da folha (OLIVARES *et al.*, 1997).



FIGURA 2 - Doença da estria mosqueada causada por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar. A figura mostra sintomas típicos da doença da estria mosqueada em cana de açúcar. A estrela indica o ponto de inoculação da bactéria, nota-se o desenvolvimento de estrias vermelhas e necrose do tecido. As flechas indicam os sintomas da doença se manifestando em regiões acima do ponto de inoculação, indicando o avanço das bactérias no interior dos vasos da folha. (FONTE: OLIVARES *et al.* 1997)

Estas doenças são de pouca importância econômica, afetam poucas variedades e não matam a planta, porém diminuem a área fotossintética e a vida útil da folha (CHRISTOPHER & EDGERTON, 1992; OLIVARES *et al.*, 1997).

Um grande número de células de *H. rubrisubalbicans* pode ser encontrado no interior dos tecidos das folhas, dentro dos vasos do protoxilema, associado a lacunas, e aparentemente bloqueando os vasos completamente. Já a interação com *H. seropedicae* apresenta um número controlado de bactérias (Figura 3) (JAMES *et al.*, 1997). *H. rubrisubalbicans* age como promotor de crescimento em estirpes não susceptíveis.

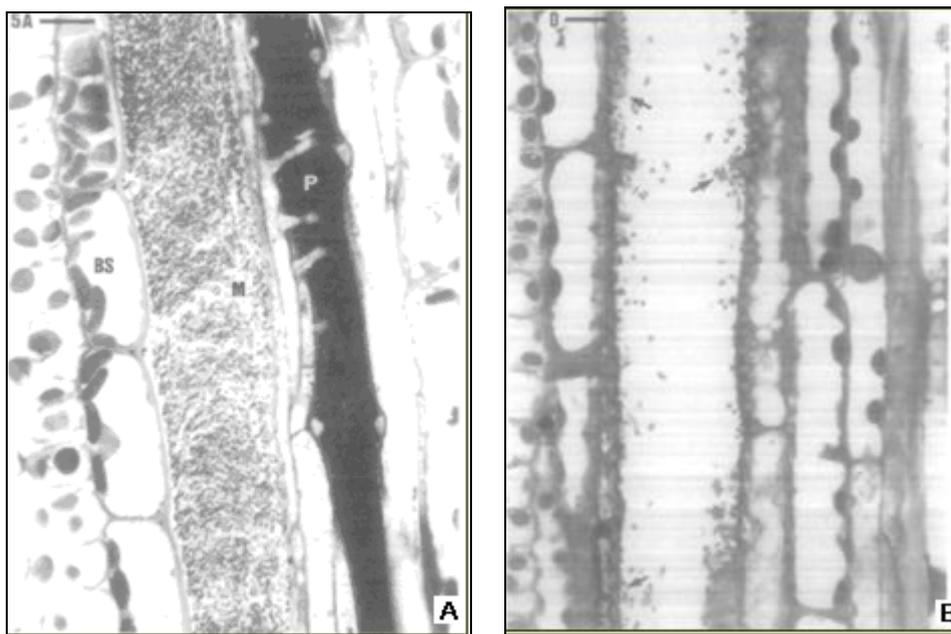


FIGURA 3 – *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (a) e *Herbaspirillum seropedicae* (b) colonizando feixes vasculares de folha de sorgo. Seções retiradas de áreas de folhas de sorgo mostrando sintomas da doença após 14 dias de inoculação com *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, (A) seção longitudinal mostrando o xilema e o floema (P) fortemente colonizados por bactérias, onde M = metaxilema e BS = bainha de células. EM B, seção longitudinal de protoxilema de uma folha de sorgo 14 dias após a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. As bactérias estão concentradas nas paredes dos vasos (setas) e o lúmen do vaso permanece sem células bacterianas. FONTE: JAMES *et al.*, 1997.

2.3 Fatores envolvidos no processo de Interação Planta:Bactéria

Vários fatores estão envolvidos nos processo de interação planta:bactéria. Entre estes fatores podemos citar os lipopolissacarídeos, os exopolissacarídeos e os Sistemas de Secreção.

Durante todos esses passos do processo de colonização, a comunicação da bactéria com o hospedeiro depende dos exopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares (KPS), sistemas de secreção de proteínas e lipopolissacarídeos (MARIE *et al.*, 2004; BROUGHTON *et al.*, 2006; LE QUÉRÉ *et al.*, 2006).

2.3.1 Lipopolissacarídeos (LPS)

As células bacterianas possuem uma estrutura chamada de parede celular que protege a célula de choques mecânicos e de variações osmóticas (TORTORA ET al., 2005). Além de proteger, a parede celular possui função no reconhecimento celular por outros organismos e na captação de moléculas do meio extracelular (SINGLETON, 1992). A parede celular bacteriana é formada por moléculas de peptideoglicanos, que recobrem toda superfície celular formando uma rede de polissacarídeos que confere rigidez à estrutura (GLASER, 1973). Bactérias gram-positivas são as que possuem peptideoglicanos como principal constituinte da parede celular. Já as bactérias gram-negativas apresentam uma fina camada de peptideoglicano e uma membrana externa a esta camada. Este conjunto é denominado envelope celular. A membrana apresenta em sua composição proteínas, fosfolipídeos e lipoproteínas. A maior parte das moléculas correspondem a lipopolissacarídeos (LPS) (COLLINS & FERRIER, 1995).

Os LPS exercem uma importante função nos processos de reconhecimento e comunicação celular por possuir regiões (cadeias polissacarídicas) que se encontram na membrana externa e entram em contato com outros organismos (KANNENBERG et al., 1998).

2.3.2 Exopolissacarídeos (EPS)

Os exopolissacarídeos são polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias (KANG, K. S., 1979). Dependendo do sistema microbiano, alguns exopolissacarídeos formam cápsulas ao redor da célula tornando-se parte da parede celular (SILVA, M. L. C., 2006)

Durante o processo de colonização, a comunicação da bactéria com o hospedeiro depende dos exopolissacarídeos, entre outros fatores.

2.3.3 Sistemas de Secreção

Os sistemas de secreção descrevem o transporte ativo de proteínas do citoplasma bacteriano, através da membrana para a superfície ou ainda no interior das células eucarióticas (HUECK, 1998).

Os sistemas de Secreção encontrados em bactérias gram-negativas podem ser divididos em grupos. (CORNELIS e VAN GIJSEGEM, 2000)

Tipo I, sistema de secreção simples baseado em 3 proteínas, entre elas os transportadores ABC. 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 (GERLACH & HENSEL, 2007).

Tipo II, apresenta-se como um aparato complexo da via secretora geral (Sec); transferindo enzimas ou toxinas do periplasma para o meio extracelular. Pode estar envolvido com a patogênese. Muitas das enzimas secretadas através deste sistema têm funções degradativas e podem estar envolvidas com danos às células hospedeiras. (CIANCIOTTO, 2005).

Tipo III, Sistema de secreção está envolvido na secreção de proteínas envolvidas com a patogenicidade. As proteínas bacterianas são secretadas diretamente nas células hospedeiras e alteram os processos celulares em favor da bactéria. (HUECK, 1998).

Tipo IV, sistema complexo onde pode haver transferência de proteínas ou DNA diretamente dentro da célula receptora. O SST4 consiste de um canal de translocação de substrato intermembranar e de um *pilus* que se ancora na membrana externa e faz contato com a célula alvo (DEHIO, 2008).

Tipo V, complexo de via secretora geral (Sec). O SST5 pode ser subdividido em 3 outros sistemas ou sub-sistemas: o sistema de autotransporte (Va), o sistema de secreção de dois componentes (Vb) e o sistema Vc. As proteínas que fazem parte do sistema Va são capazes de se translocar através da membrana externa sem a ajuda de proteínas acessórias (HENDERSON ET al, 2004). O sistema Vb é composto por duas proteínas membros da família TpsA e TpsB (JACOB-DUBISSON et al, 2004). O sistema Vc tem suas proteínas secretadas de modo alternativo, devido a sua estrutura terciária. (GELARCH et al, 2007)

Tipo VI, transporte extracelular de fatores de virulência e translocação para a célula eucariótica (PUKATZKI et al, 2006).

2.3.3.1 Sistema de Secreção do Tipo III

O Sistema de secreção do Tipo III (SST3) está presente em aproximadamente 25 organismos gram-negativos (CORNELIS, 2006).

O SST3 é conhecido por translocar proteínas bacterianas, chamadas de efetoras, para o citoplasma de células hospedeiras eucarióticas. Essas proteínas efetoras podem alterar os processos celulares do organismo hospedeiro permitindo que os agentes patogênicos modulem diretamente as respostas celulares contra este patógeno. (YIP & STRYNADKA, 2006)

O SST3 já foi descrito em bactérias patogênicas e pode ser encontrado, assim como os demais sistemas, em vários microrganismos de interesse clínico, como a *Salmonella spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nem sempre o SST3 está restrito a patogênese, mas pode atuar modulando os processos de simbiose em *Rhizobium sp.* (CORNELIS e VAN GIJSEGEM, 2000).

O SST3 não está envolvido apenas nos mecanismos de doenças, que podem se caracterizar de diferentes formas, como lesões localizadas ou sistêmicas, pragas ou morte; mas também no desenvolvimento dos mecanismos de defesa das plantas que levam à resistência a esses patógenos. Muitas vezes, a resistência é acompanhada pela ocorrência de uma resposta chamada de hipersensibilidade (HR), que é definida como a morte rápida de células da planta no local da infecção levando à colonização restrita do potencial patógeno. (CORNELIS e VAN GIJSEGEM, 2000)

Os genes que codificam para o sistema de secreção do Tipo III foram chamados de genes *hrp*.

A maioria dos genes *hrp* conservados, conhecidos como *hrc*, se apresentam como componentes do sistema de secreção do tipo III, sendo usados por várias bactérias patogênicas para secretar proteínas de virulências (BRITO, B. *et al.* 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 (CORNELIS, 2006). A agulha do injectiossoma, atravessa as

membranas interna e externa, fazendo contato com a membrana do hospedeiro (Figura 4) (LI et al., 2002; HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; THANASSI & HULTGREN, 2000; BÜTTNER & BONAS, 2002).

Uma 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).

2.3.3.2 O SST3 em *Herbaspirillum* sp.

Foram identificados 14 genes *hrp/hrc* em *H. seropedicae*. Foram identificados também 15 proteínas hipotéticas na mesma região do genoma. Aparentemente estes genes formam uma unidade de transcrição e podem estar envolvidos com a interação planta-bactéria.

O grupo de genes *hrp/hrc* de *H. seropedicae* apresenta uma organização de genes e operons parcialmente conservada se comparada com fitopatógenos como *Pseudomonas syringae* e *Ralstonia solanacearum*. Esta semelhança aponta indícios de que estes genes formam uma unidade de transcrição e que podem estar envolvidos no processo de interação entre o *H. seropedicae* e a planta hospedeira (SILVA, 2008).

Em *H. rubrisubalbicans* foram identificados genes homólogos aos do SST3, sugerindo sua presença nestes organismos. Foram observados os genes *HrcN* (ATPase) e *HrpE* (proteína de membrana interna/citoplasma), entre outros. (GENOPAR)

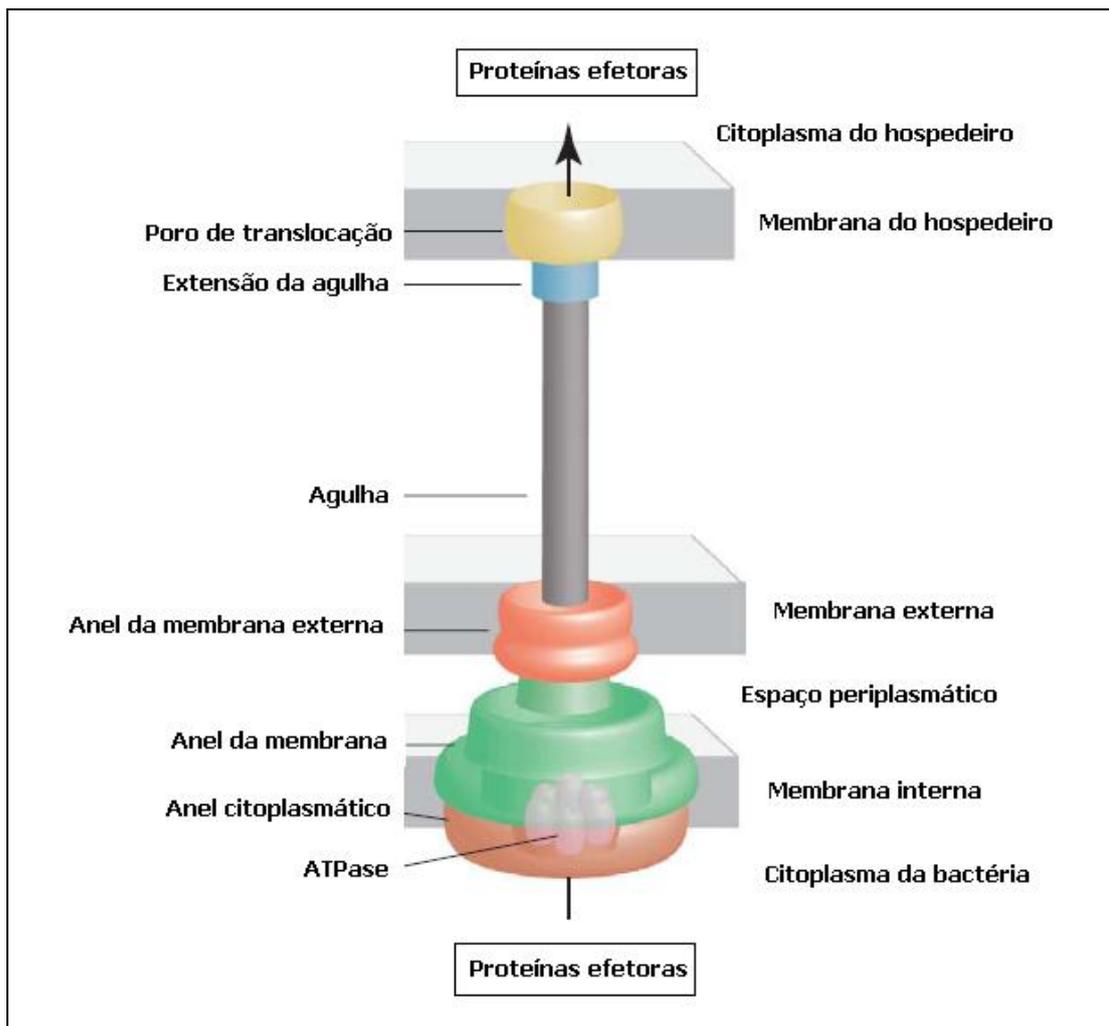


FIGURA 4 - Complexo supramolecular do SST3. Em conjunto o SST3 transloca proteínas bacterianas diretamente no citoplasma das células hospedeiras eucarióticas (seta), um processo que requer a agulha e uma poro de translocação (amarelo). (THANASSI & HULTGREN, 2000)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho estão descritas na TABELA 1.

A estirpe DH10B de *Escherichia coli* foi utilizada para transformação das ligações e obtenção dos clones.

As estirpes SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* e M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foram utilizadas nos experimentos de colonização, adesão e competição.

TABELA 1 – ESTIRPES BACTERIANAS

Estirpe	Característica	Referência
DH10B	F ⁻ mcrA Δ(mcrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara,leu) 7697 galU galK λ ⁻ rpsL (Str ^r) nupG λ ⁻	INVITROGEN
M1	Estirpe selvagem	BALDANI <i>et al.</i> , 1996
SmR1	Estirpe tipo Z78 Sm ^R , Nif ⁺	MACHADO <i>et al.</i> , 1996
RAM10	Estirpe tipo Z78Sm ^R ,Nif ⁺ , expressando GFP, Km ^R	MONTEIRO <i>et al.</i> ,2008

3.2 Estirpes mutantes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*

As estirpes mutantes utilizadas neste trabalho estão descritas na TABELA 2.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DOS ORGANISMOS MUTANTES UTILIZADOS:

Proteína codificada	Mutante	Organismo	Descrição/Função	Referência
<i>hrcN</i>	TSN	M1 (<i>H. rubrisubalbicans</i>)	ATPase do SST3	Schimidt, M. A., não publicado
<i>AmpG</i> (Muropeptídeo Permease)	13C43	SmR1 (<i>H. seropedicae</i>)	Transporte de Carboidratos e Metabolismo	Tadra-Sfeir, não publicado

TABELA 2 - Continuação

Proteína codificada	Mutante	Organismo	Descrição/Função	Referência
Prot. hipotética	39B7	SmR1 (<i>H. seropedicae</i>)	Função desconhecida	Tadra-Sfeir, não publicado
Prot. hipotética	9E3	SmR1 (<i>H. seropedicae</i>)	Função desconhecida	Tadra-Sfeir, não publicado
Prot. hipotética	T2B10	SmR1 (<i>H. seropedicae</i>)	Função desconhecida	Tadra-Sfeir, não publicado
Prot. hipotética	13C9	SmR1 (<i>H. seropedicae</i>)	Função desconhecida	Tadra-Sfeir, não publicado
AmpG (Muropeptídeo Permease)	13C43	SmR1 (<i>H. seropedicae</i>)	Transporte de Carboidratos e Metabolismo	Tadra-Sfeir, não publicado

3.3 Meios de cultura

3.3.1 Meios de cultivo para *E. coli*

As estirpes de *E. coli* foram crescidas em meio Luria Broth (LB) (SAMBROOK et al., 1989) ou Terrific broth (TB) (SAMBROOK et al., 1989) sob agitação de 160 rpm ou em meio sólido LA, sempre a 37°C.

A estirpe de *E. coli* DH10B, utilizada para o preparo de células eletrocompetentes, foi cultivada em meio SOB a 37°C sob agitação de 120 rpm. Após o choque elétrico, as células de *E. coli* foram mantidas em recuperação por 30 minutos em meio SOC modificado a 37°C.

Meio Luria-Broth (LB) e Luria-Broth Agar (LA).

O meio sólido (LA) é obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB).

- O meio LB possui a seguinte composição:

Extrato de levedura.....5 g/L

Cloreto de sódio.....10 g/L

Triptona.....10 g/L

- Meio Terrific Broth (TB) – (SAMBOOK et al., 1989)

Bacto triptona.....12g/L

Extrato de levedura.....24g

Glicerol.....4 mL

- Meio SOB

Bacto triptona.....12g/L

Extrato de Levedura.....5g/L

NaCl.....10g/L

Agar.....15g/l

- Meio SOC

Triptona20g/L

Extrato de Levedura.....5g/L

NaCl.....0,6 g/L

KCl.....0,19 g/L

MgCl₂0,94 g/L

MgSO₄1,2 g/L

Glicose.....3,6 g/L

Água destilada q.s.q1L

4.3.1 Meios de cultivo para *Herbaspirillum sp.*

As estirpes de *Herbaspirillum sp.* foram crescidas em meio NFbHP malato (KLASSEN *et al.*, 1997) (Tabela 3) contendo como fonte de nitrogênio 20 mmol/L de NH₄Cl. As culturas foram crescidas sob agitação (120 rpm) por 18 a 24h a 30°C.

TABELA 3: MEIO NFbHP-MALATO

	Gramas/Litro
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Malato de potássio	5,0
CaCl ₂	0,02

Ácido nitrilo triacético	0,056
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Biotina	0,0001
Solução de Oligonutrientes	10mL
Solução de fosfatos	50mL

Solução de Oligonutrientes:

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

No momento do uso foi misturado 20 mmol/L cloreto de amônio (1 mmol/L) e então o meio passou a ser denominado NFbHPN-malato.

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

Todos os meios são autoclavados a 120°C por 20 minutos.

3.4 Antibióticos

Os antibióticos utilizados neste trabalho estão descritos na TABELA 4.

TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADOS

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>E. coli</i>	Concentração final para culturas de <i>H. seropedicae</i>
Ampicilina (Amp)	500 µg/mL	-
Canamicina (Km)	100 µg/mL	500 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	20 µg/mL	-

3.5 Construção da Biblioteca Subtrativa (SSH)

A metodologia SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) é baseada em hibridizações entre os genomas fragmentados das espécies de interesse, e posterior amplificação dos fragmentos não hibridizados de uma das espécies. Assim os fragmentos genômicos, presentes em apenas uma das espécies, podem ser clonados. Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pCR 2.1, e eletrotransformados em estirpe de *E. coli* – DH10B. A suspensão de células foi plaqueada em meio LA contendo Ampicilina, canamicina e XGAL (30 µg/mL).

As bibliotecas deste projeto foram construídas por Rose Adele Monteiro, utilizando o kit PCR-Select™ Bactérial Genome Substraction Kit (Clontech), conforme instruções do fabricante.

3.6 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli* estirpe DH10B

200µL da estirpe DH10B foi crescida em meio LB e Estreptomicina (Sm) 20 µg/mL por 24 horas, 37°C e 120 rpm. Foram inoculados em 200 ml de meio SOB até atingir D.O. de aproximadamente 0,6. A cultura foi então incubada em banho de gelo por 30 minutos e centrifugada em tubos Falcon de 50 ml a 5000 rpm, por 5 minutos a 4°C. O precipitado de células foi lavado 2 vezes com água Milli Q estéril gelada e 1 vez com Glicerol 15% gelado. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 15% e armazenadas a -70°C.

3.6.1 Transformação bacteriana

Para eletrotransformação foram utilizados 100µL de células de *E. coli* – DH10B eletrocompetentes misturadas a 1µL de ligação.

A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação previamente resfriada. As amostras foram submetidas a um choque elétrico de 2,5 kV. As células eletroporadas foram recuperadas em 1 mL de meio SOC por 30 minutos – a 37°C e 120 rpm.

Após a recuperação as bactérias foram plaqueadas em meio LA, contendo canamicina (100 µg/mL), ampicilina (500 µg/mL) e X-gal como substrato para a enzima β-galactosidase na concentração de 30 µg/mL.

3.7 Coleta dos Clones obtidos após a transformação

Após a transformação da biblioteca Sm1 pCR2.1, foram coletadas aproximadamente 1600 colônias brancas com o auxílio de palitos de madeira - organizadas em grupos de 96 amostras - em placas contendo meio LA, ampicilina e canamicina.

3.7.1 Estocagem de Clones

Os clones foram inoculados em 100µL de meio TB com antibióticos, em placas de Elisa de 96 poços. Foram então incubados a 37°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano adicionou-se 100µL de Glicerol 87% estéril. Os clones foram armazenados a -20°C.

3.8 Purificação de DNA plasmidial em placas de 96 poços

Para o crescimento bacteriano foram utilizados blocos de 96 poços com capacidade de 2 mL. Os clones foram inoculados em 1,25 mL de meio TB contendo ampicilina e canamicina, e incubados a 37°C, sob agitação de 180 rpm durante 24 horas.

Depois de crescidas, as bactérias foram centrifugadas a 3700 rpm, por 7 minutos para sedimentação das células e descarte do meio de cultura. Após centrifugado o precipitado foi novamente ressuspenso em 80µL de GET contendo 2,5 µg/mL de RNase. A suspensão de células foi transferida para uma microplaca de 250µL de polipropileno contendo 96 poços. Foi adicionado 80µL de solução de lise preparada na hora – NaOH 0,2 mol/L, SDS 1% e Água Milli Q q.s.q. . A placa foi homogeneizada por inversão e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após os 5 minutos foi adicionado a cada poço 80µL de acetato de potássio 3M. A placa foi novamente misturada por inversão e deixada por 10 minutos à temperatura ambiente, então foi incubada a 90°C por exatos 30 minutos. Após os 30 minutos, a placa foi resfriada em banho de gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 3700 rpm por 5 minutos a 4°C. Todo o volume do sobrenadante foi transferido e filtrado por uma placa Millipore (MAGV N22).

Ao filtrado, foi adicionado 100 μ L de Isopropanol e centrifugado por 45 minutos a temperatura ambiente. Foi então adicionado 150 μ L de etanol 70% preparado no mesmo dia. Centrifugou-se mais 15 minutos a 3700 rpm e temperatura ambiente. A placa foi invertida em papel absorvente para que a maior parte do etanol fosse eliminada.

Depois de seco a temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas, o DNA foi dissolvido em 30 μ L de água Milli Q.

3.9 Eletroforese de DNA

A determinação do perfil eletroforético do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os géis de agarose foram preparados na concentração de 1% em tampão TBE 1x (Tris-base 40 mmol/L pH 8,0, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2,5 mmol/L). A corrida eletroforética foi efetuada com o gel submerso em tampão TBE, aplicando-se 50 a 60 V durante 2 a 4 horas.

Três microlitros de corante para eletroforese (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol, glicerol 50%, SDS 1% em tampão TBE) foram adicionados a 3 μ L do DNA, que foi então submetido á eletroforese.

Após a eletroforese, os géis foram incubados com uma solução de brometo de etídio (EtBr) a 0,5 μ g/mL. O complexo DNA-EtBr foi observado em transiluminador de ultravioleta e registrado.

3.10 Sequenciamento dos clones da biblioteca subtrativa SM1

O Sequenciamento dos clones da Biblioteca Subtrativa de DNA foi realizado em placas de 96 poços utilizando o método descrito por SANGER *et al* (1977). Foram utilizados dideoxinucleotídeos fluorescentes, separação em eletroforese capilar e detecção de fluoróforos após excitação com laser em seqüenciador automático MegaBACE 1000.

A reação foi feita com aproximadamente 250ng de DNA, 3,25pmol de primer Universal ou Reverso, 3 μ L de reativo ET terminador Mix e água Milli Q para completar a reação para 7,5 μ L. A reação de Sequenciamento foi feita em

termociclador sob as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos e 62°C por 2 minutos.

O produto da reação foi precipitado com adição de 12,5 µL de água Milli Q, 60 µL de Isopropanol e 3 µL de Acetato de Amônio 7,5M. Depois de centrifugado por 45 minutos, o DNA foi lavado com 150µL de Etanol 70% e centrifugado por mais 15 minutos.

Depois de completamente seco, as amostras foram ressuspensas em solução adequada e aplicadas no seqüenciador automático.

3.11 Comparação das seqüências obtidas da Biblioteca SM1 com banco de dados

As seqüências resultantes foram comparadas com o banco de dados do GenBank, através do programa Blastx (YE, McGINNIS & MADDEN, 2006; ALTSCHUL et al., 1990), para busca de produtos gênicos similares e identificação gênica.

As seqüências também foram comparadas com o genoma de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* (www.genopar.org) utilizando o programa BlastX e BlastN.

3.12 Experimentos de interação entre as estirpes SmR1, M1 e mutantes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em plântulas de milho (*Zea mays*).

Foram realizados experimentos de colonização interna, adesão e competição com as estirpes SmR1, M1 e organismos mutantes para os genes *AmpG* (*H. seropedicae*) e *HrcN* (*H. rubrisubalbicans*).

3.12.1 Cultivares vegetais

Neste trabalho foram utilizadas plântulas de milho das variedades SHS 3031 e SHS 5055.

3.12.2 Desinfecção das plântulas e sementes

As sementes foram desinfetadas por 20 minutos em uma solução de hipoclorito 1%, 0,4% de tween 20% e água Milli Q estéril q.s.q 100mL e por mais 5 minutos em Etanol 70%. As sementes foram então lavadas 2 vezes com água MilliQ por um tempo de aproximadamente 1 minuto.

As plântulas foram desinfetadas superficialmente por uma lavagem com hipoclorito 1% por 2 minutos; seguida de uma lavagem com Etanol 70% por 2 minutos e, por fim, duas lavagens sucessivas com água MilliQ estéril por 2 minutos.

3.12.3 Condições de cultivo das plântulas de milho

Depois de desinfetadas as sementes foram germinadas em blocos contendo envelopes de papel filtro embebidos em 3mL de solução Plant Medium (Tabela 5) por 2-3 dias.

TABELA 5: SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS PLANT MEDIUM

	1L
MgSO ₄ . H ₂ O – 10%	0,2g
NaCl – 10%	0,1g
CaCl ₂ . 2. H ₂ O – 1%	0,026g
Solução de Microelementos	1mL
Fe-EDTA – 1,64%	1mL
K ₂ HPO ₄	1,5g
KH ₂ HPO ₄	1,5g

Solução de microelementos:

Na ₂ MoO ₄ 2.H ₂ O	1g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175g/L

H ₃ BO ₃	1,4g/L
CuSO ₄ . 5.H ₂ O	0,04g/L
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,12g/L

3.12.4 Preparação dos inoculo de *Herbaspirillum* sp.

As estirpes de *Herbaspirillum* sp. foram crescidas em meio NFbHPN-malato e antibiótico por aproximadamente 24 horas até atingirem D.O. 600 de 1,0. Foram então diluídas até a concentração de 10⁵ células/mL.

3.12.5 Inoculo das estirpes bacterianas em milho

Após 1, 3 e 7 dias de germinação das sementes as plântulas foram submersas por 30 minutos sem agitação em meio de cultura bacteriano contendo 10⁵ células por mL. As plântulas foram então lavadas com solução salina (NaCl 0,9%) e colocadas novamente nos blocos contendo os envelopes individuais de papel filtro embebidos em solução nutritiva (Plant Medium).

As plantas foram mantidas sob temperatura aproximada de 20°C e sob luz artificial. No primeiro, terceiro e sétimo dia após o inoculo as plântulas foram retiradas para os experimentos de colonização e competição.

3.12.6 Ensaio de adesão das estirpes de *Herbaspirillum* sp. às raízes de milho

Imediatamente após a inoculação, as amostras de raiz (aproximadamente 0,03 g de raiz úmida) foram cortadas, pesadas e lavadas duas vezes por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), foram então vortexadas vigorosamente por 15 segundos em 1 mL da mesma solução. O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz de milho úmida através de diluição seriada e contagem em meio sólido.

3.12.7 Ensaios de colonização interna das raízes de milho pelas estirpes de *Herbaspirillum* sp.

A determinação do número de bactérias endofíticas foi realizada 1, 3 e 7 dias após inoculação. As raízes foram superficialmente desinfetadas, cortadas e pesadas como descrito acima. As amostras foram então maceradas em grau estéril com 1mL de solução salina (NaCl 0,9%). Os extratos foram utilizados para determinar o número de bactérias endofíticas colonizando os tecidos radiculares internos de milho, através de diluição seriada e contagem em meio sólido

3.12.8 Ensaios de competição das estirpes de *Herbaspirillum* sp. pela colonização dos tecidos internos das raízes de milho

Ensaios de competição pela colonização de milho foram realizados utilizando as estirpes RAM10 (GFP, Sm, Km), de *H. seropedicae* e M1 de *H. rubrisubalbicans* em proporção de 1:1 e 1:10, mantendo o total de 10^5 UFC.mL⁻¹ de inóculo por planta. A determinação das UFC foi realizada como descrito anteriormente, e a resistência a antibióticos e produção de GFP foram utilizadas para identificar as estirpes. Os valores obtidos representam a média de pelo menos dois experimentos independentes.

Foram realizados experimentos de competição com os organismos M1 e RAM10 nas seguintes proporções:

- RAM10 1 : 1 M1
- RAM10 1 : 10 M1
- RAM10 10 : 1 M1

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção da biblioteca subtrativa SM1

Para construção da Biblioteca SM1 foi utilizada a técnica SSH (*Supressive Subtractive Hybridization*), baseada em hibridizações sucessivas entre os genomas das estirpes a serem comparadas e posterior amplificação dos fragmentos não hibridizados de uma das espécies.

As amostras da biblioteca que contém fragmentos presentes em *H. seropedicae* SmR1 e ausentes em *H. rubrisubalbicans* M1 (SM1) foram seqüenciadas e analisados posteriormente.

Após o processo de hibridização, os insertos foram clonados no vetor pCR2.1 (Invitrogen).

Este vetor possui resistência aos antibióticos ampicilina e canamicina. Possui, também, o gene repórter *lacZ*, o que tornou possível a seleção das colônias contendo o vetor com inserto.

Foram obtidos, coletados e estocados aproximadamente 1630 clones, totalizando, em estoque, 17 placas de 96 poços.

4.2. Mini-preparação dos Plasmídeos da Biblioteca SM1

O processo de purificação de DNA plasmidial foi realizado com aproximadamente 700 dos clones estocados. Depois da extração do DNA, foi feita uma corrida eletroforética (FIGURA 5) para a visualização dos plasmídeos purificados durante a mini-preparação.

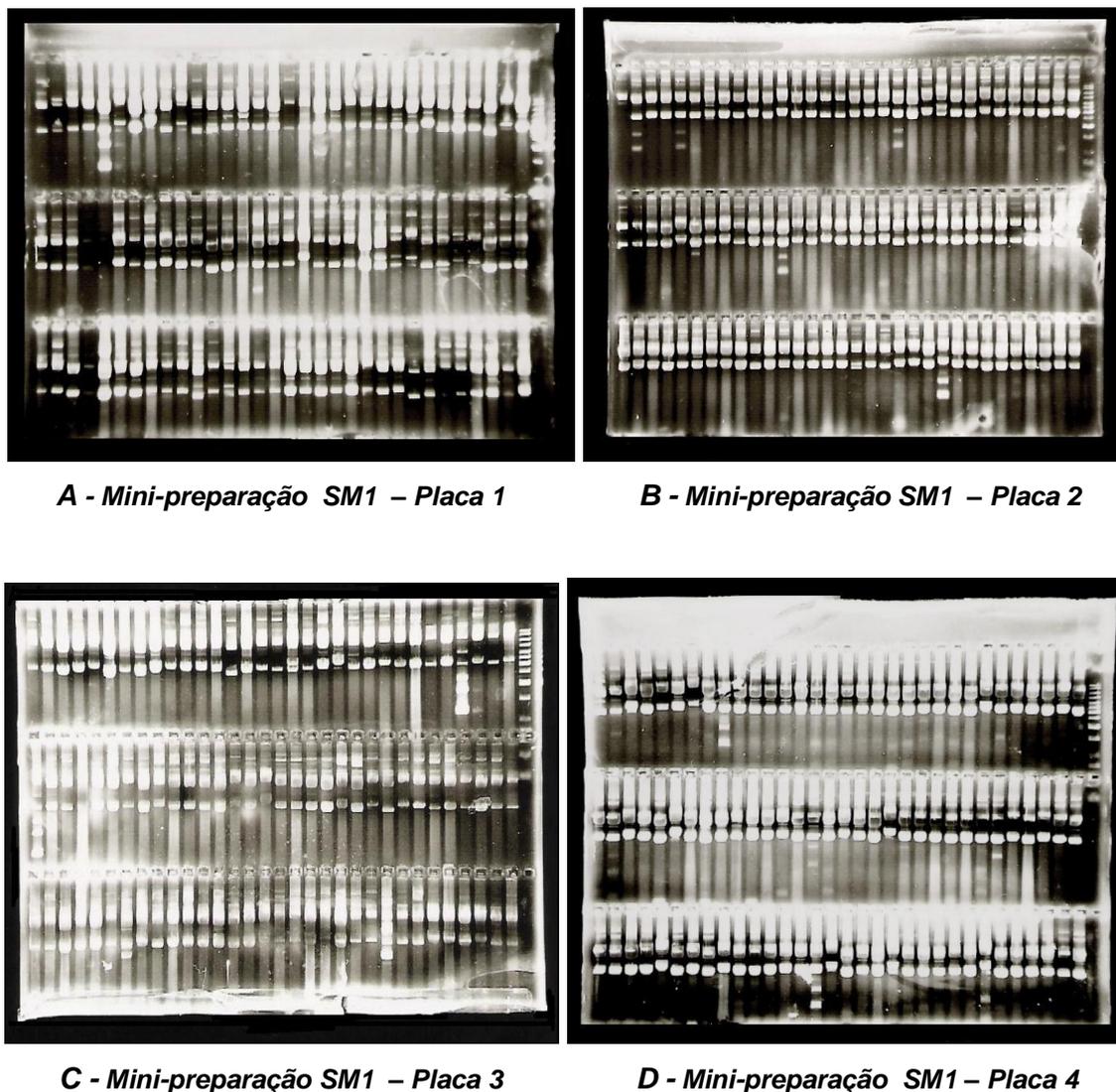


FIGURA 5 – Perfil eletroforético da mini-preparação dos plasmídeos da biblioteca SM1. A mini-preparação dos plasmídeos foi analisada através do perfil eletroforético em gel de agarose 1% e tampão TBE 1x. Foram aplicados 3 μ L de amostra de DNA e 3 μ L de corante para eletroforese. Os géis foram incubados em solução de brometo de etídio (EtBr) a 0,5 μ g/mL. O complexo DNA-EtBr foi observado em transiluminador de ultravioleta. As 384 amostras foram distribuídas em 4 placas de 96 amostras, sendo a FIGURA A (Placa 1), B (Placa 2), C (Placa 3) e D (Placa 4).

4.3 Sequenciamento da Biblioteca SM1

Todos os clones que tiveram seus plasmídeos purificados foram seqüenciados. Foram obtidas aproximadamente 300 seqüências, com insertos de tamanhos que chegam até a 500pb.

4.4 Comparação das seqüências obtidas a partir da Biblioteca SM1 com os bancos de dados Genopar e GenBank

Duzentas e noventa e seis seqüências da biblioteca SM1 foram comparadas com o banco de dados do GenBank, através do programa Blastx (YE, MCGINNIS & MADDEN, 2006; ALTSCHUL et al., 1990), para busca de produtos gênicos similares e identificação gênica; e com o genoma de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, através do banco de dados GENOPAR e do programa BlastN.

Entre as 296 seqüências de DNA analisadas foram encontrados 96 produtos gênicos diferentes.

Dentre as seqüências comparadas com o GenBank e GENOPAR foram encontradas seqüências que não apresentam identidade com as seqüências depositadas nos bancos de dados (13%), seqüências que apresentam identidade com *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (4,3%) e seqüências que apresentam identidade apenas com *Herbaspirillum seropedicae* (82,3%) (Figura 8)

Entre as seqüências que apresentam identidade apenas com *Herbaspirillum seropedicae* foram encontrados genes com função desconhecida (proteínas hipotéticas), e genes envolvidos em diferentes processos celulares (FIGURA 9).

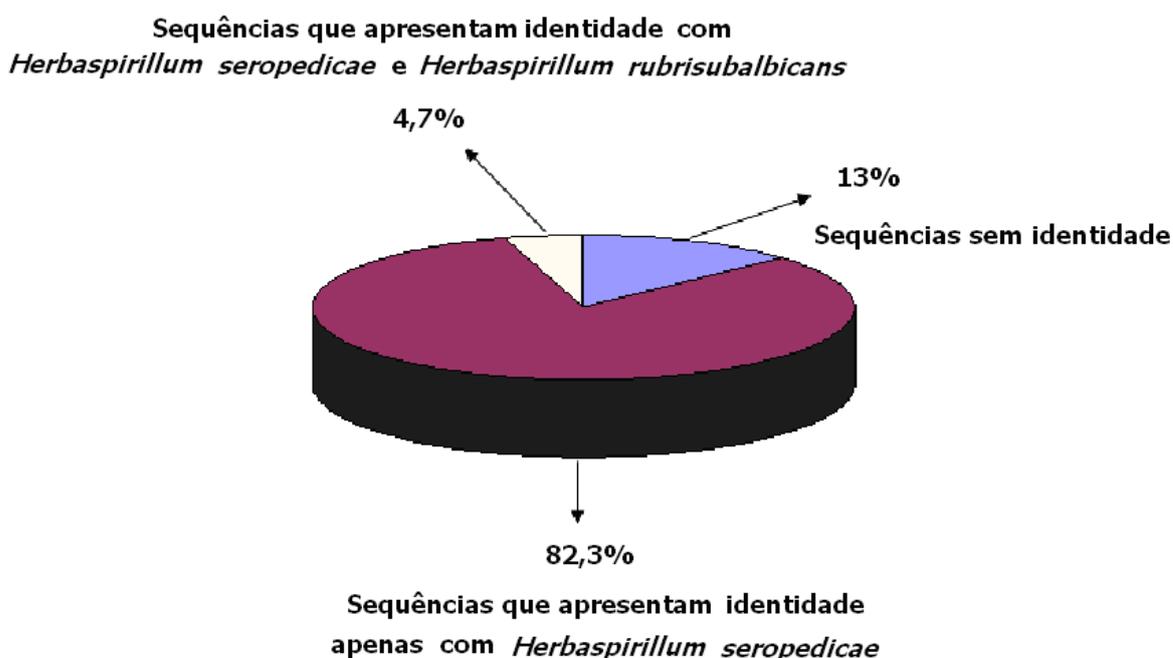


FIGURA 6 – Distribuição das seqüências obtidas de acordo com a similaridade com o genoma de *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Fonte: GenBank

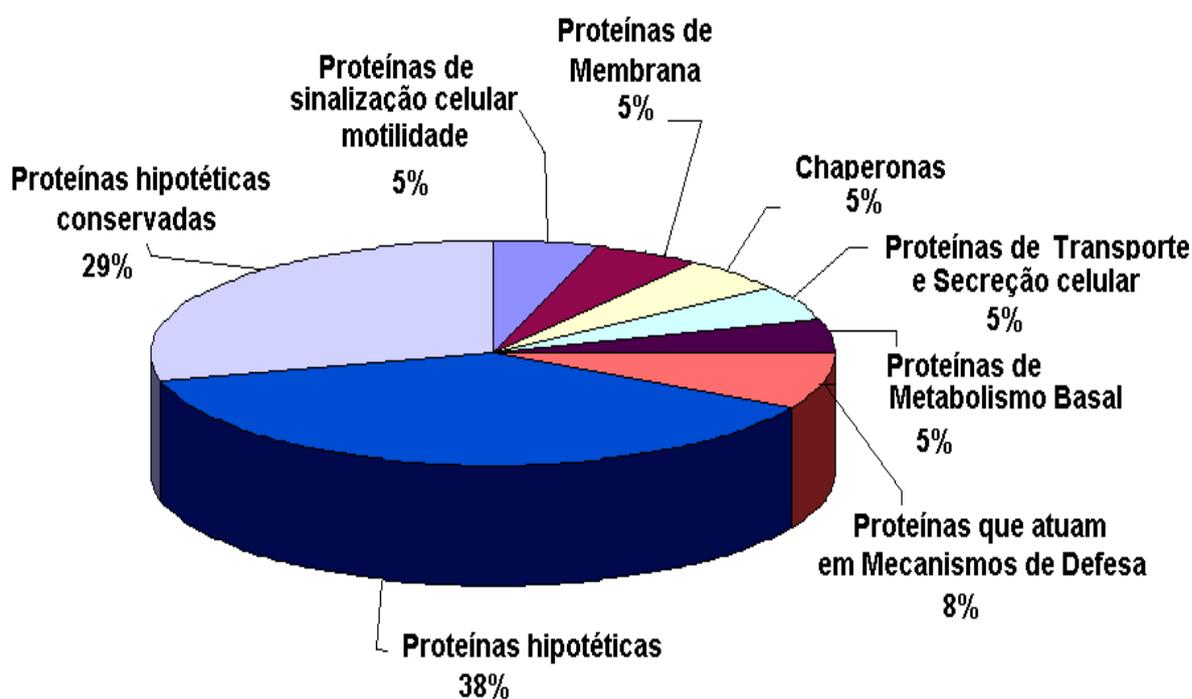


FIGURA 7 – Categorização funcional das proteínas encontradas na Biblioteca SM1. A categorização foi feita com base na análise gerada pelo programa Blastx/GENOPAR

A maioria dos genes exclusivos de *Herbaspirillum seropedicae* encontrados codificam para proteínas hipotéticas e conservadas hipotéticas, entretanto foram encontrados genes que codificam para proteínas envolvidas no sistema de transporte de açúcar e nitrato, como as do tipo ABC; glicosiltransferases do grupo 1, exoproteínas envolvidas com a adesão planta-bactéria, β -lactamase de classe C – que confere resistência a antibióticos β -lactâmicos, proteínas associadas à peptídeoglicanos, proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa, como as de efluxo de drogas e proteínas envolvidas com a biossíntese de exopolissacarídeos (TABELA 6).

Clone	Produto	Função	Número de pb	Identidade com <i>H. seropedicae</i>
1	Provável 'subtilisin-like protease'	Modificação pós-traducional, chaperonas	228	98%
2	Proteína hipotética	Função desconhecida	133	100%
3	Proteína hipotética	Função desconhecida	199	99%
4	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	271	97%
5	Provável transmembrana	Função desconhecida	262	99%
6	Provável aerotaxis sensor receptor transmembrana	Mecanismos de transdução de sinal, motilidade celular	30	100%
7	Proteína hipotética	Função desconhecida	319	99%
8	Proteína hipotética	Função desconhecida	393	99%
9	Proteína hipotética	Função desconhecida	219	100%
10	Proteína hipotética	Função desconhecida	79	99%
11	B- subunidade malonato decarboxilase	Transporte de lipídeos e metabolismo	20	100%
12	Provável sistema do tipo ABC de transporte de açúcar	Transporte de carboidrato e metabolismo	20	100%
13	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	122	98%
14	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	133	98%
15	Provável homoserina O-acetiltransferase	Transporte de aminoácido e metabolismo	23	100%
16	Provável "two-component system", reguladora de transcrição	Transcrição, mecanismos de transdução de sinal	104	97%
17	Proteína hipotética	Função desconhecida	62	91%
18	Provável Deoxirribonuclease sitio específica Tipo I	Mecanismos de Defesa	178	95%
19	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	151 / 273	100% / 95%
20	Provável proteína de membrana	Função desconhecida	428	98%
21	Sistema de transporte D-ribose tipo ABC, ATPase	Transporte de carboidrato e metabolismo	45	99%
22	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	158	97%
23	Proteína hipotética	Função desconhecida	247	99%
24	Provável endonuclease de restrição 5-metilcitosina	Mecanismos de Defesa	207	97%

25	Provável “cII phage-related”	Função desconhecida	270	100%
26	Provável β -lactamase de classe C	Mecanismos de defesa	278	95%
27	Proteína hipotética	Função desconhecida	382	99%
28	Proteína hipotética	Função desconhecida	161	100%
29	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	399	99%
30	Proteína hipotética	Função desconhecida	193	100%
31	Proteína hipotética	Função desconhecida	176	99%
32	Proteína hipotética	Função desconhecida	602	99%
33	Provável “Large exoproteins” ou adesão	Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas	40	100%
34	Provável Lipoproteína de efluxo de drogas	Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas	62	98%
35	Proteína de membrana	Função Desconhecida	69	100%
36	Proteína hipotética	Função desconhecida	72	100%
37	Proteína hipotética	Função desconhecida	127	100%
38	Provável proteína de Membrana	Função desconhecida	269	95%
39	Proteína hipotética	Função desconhecida	340	98%
40	Provável proteína transmembrana	Função desconhecida	474	99%
41	Provável “inner membrane” proteína transmembrana	Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas	170	98%
42	Proteína hipotética	Função desconhecida	94	97%
43	Proteína hipotética	Função desconhecida	251	99%
44	Provável “outer membrane protein” associada a peptideoglicano	Biogênese de membrana celular/ envelope	266	100%
45	Provável “D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase protein”	Produção e conversão de energia, Coenzima de transporte e metabolismo	20	100%
46	Proteína hipotética	Função desconhecida	358	96%
47	Proteína hipotética	Função desconhecida	40	100%
48	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	53	95%
49	Provável “DNA mismatch repair protein”	Replicação, recombinação e reparo	485	99%
50	Provável glicosiltransferase de grupo 1	Biogênese de membrana celular/ envelope	128	99%

51	Provável “ competence protein F-related”	Função Geral	25	95%
52	Provável aerotaxis sensor receptor transmembrana	Mecanismo de transdução de sina; motilidade celular	20	100%
53	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	38	100%
54	Proteína hipotética	Função desconhecida	376	98%
55	Provável proteína transmembrana de efluxo de drogas	Mecanismos de defesa	20	100%
56	Provável “cytochrome c oxidase polypeptide precursor transmembrane”	Produção e conversão de energia	21	100%
57	Provável proteína regulatória do operon da Xilose	Transcrição	20	100%
58	Proteína hipotética	Função desconhecida	357	99%
59	Proteína hipotética	Função desconhecida	220	96%
60	Provável Sistema de transporte tipo ABC, lipoproteína periplasmática	Função Geral	20	100%
61	Provável proteína transmembrana	Função desconhecida	304	99%
62	Provável “SEL 1 subfamily FOG: TPR repeatcontaining protein”	Função desconhecida	20	100%
63	Proteína hipotética	Função desconhecida	171	92%
64	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	67	100%
65	Provável adenosilhomocisteinase	Coenzima de transporte e metabolismo	22	100%
66	Provável “outer membrane drug efflux”	Secreção, transporte de vesículas, tráfego intracelular	20	100%
67	Provável “muropeptide permease of the major facilitator superfamily	Transporte de carboidratos e metabolismo	70	98%
68	Provável sistema de transporte nitrato/sulfato/bicarbonato do tipo ABC	Transporte de íons inorgânicos e metabolismo	23	100%
69	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	69	100%
70	Provável “methyl-accepting chemotaxis transducer transmembrane	Mecanismos de transução de sinal, motilidade celular	21	100%
71	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	262	99%
72	Provável “acetylornithine deacetylase/uccinyldiaminopimelate desuccinylase	Transporte de aminoácido e metabolismo	24	100%

TABELA 6 – Continuação

73	Proteína hipotética	Função desconhecida	21	100%
74	Provável DNA metiltransferase	Replicação, recombinação e reparo	21	100%
75	Provável hemoaglutinina/hemolisina	Função Geral	196	100%
76	Provável proteína transmembrana	Função desconhecida	20	100%
77	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	429	99%
78	Provável aminotransferase	Coenzima de transporte e metabolismo	21	100%
79	Provável “selenophosphate synthase	Coenzima de transporte e metabolismo	20	100%
80	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	215	100%
81	Provável DNA polimerase IV	Replicação, recombinação e reparo	208	100%
82	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	21	100%
83	Proteína hipotética	Função desconhecida	20	100%
84	Provável “ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, permease component”	Transporte de aminoácidos, íons inorgânicos e metabolismo	21	100%
85	Provável proteína de membrana	Função desconhecida	69	100%
86	Provável Translocase Sec-independente	Tráfego intracelular e secreção	20	100%
87	Proteína hipotética	Função desconhecida	183	100%
88	Provável acetil-coenzima A carboxilase carboxiltransferase	Transporte de lipídeos e metabolismo	100	97%
89	Provável proteína envolvida com a biossíntese de exopolissacarídeos	Biogênese de membrana/envelope	20	100%
90	Provável dehidrogenase	Função Geral	254	97%
91	Provável Arilesterase	Função Geral	20	100%
92	Provável carboxilesterase	Função Geral	25	100%
93	Provável proteína reguladora de transcrição	Transcrição	20	100%
94	Provável proteína transmembrana	Função desconhecida	125	88%
95	Proteína conservada hipotética	Função desconhecida	133	100%
96	Provável peptídeo-sinal	Função desconhecida	104	98%

Quando comparadas com o genoma de *H. rubrisubalbicans*, somente 7 das seqüências analisadas apresentaram alta identidade. (TABELA 7)

Estas seqüências foram retiradas das análises já que provavelmente são provenientes de fragmentos de DNA remanescentes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

TABELA 7 – PROTEÍNAS QUE APRESENTAM IDENTIDADE COM *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Clone	Produto	Função	Identidade com <i>H. seropedicae</i>	Identidade com <i>H. rubrisubalbicans</i>
1	Proteína Conservada hipotética	Desconhecida	98%	94%
2	Proteína Hipotética	Desconhecida	99%	92%
3	Peptídeo sinal	Desconhecida	98%	89%
4	Proteína Hipotética	Desconhecida	100%	89%
5	Proteína Hipotética	Desconhecida	99%	88%
6	Proteína Hipotética	Desconhecida	99%	100%
7	Lipoproteína de efluxo de drogas	Envelope, tráfego intracelular, secreção celular	98%	91%

4.5 Experimentos de Colonização interna das plântulas de milho com as estirpes SmR1 e mutantes

Através da análise de bibliotecas subtrativas que comparam a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* e a estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* notou-se que o gene *ampG* está presente apenas na estirpe SmR1, estando, portanto, ausente em *H. rubrisubalbicans* M1. Foram realizados experimentos de colonização utilizando estirpes de *H. seropedicae* mutantes em genes encontrados durante a análise da Biblioteca Subtrativa (TABELA 8) para identificar se estas estirpes têm mutações em genes envolvidos nos mecanismos de interação planta-bactéria. Os experimentos foram feitos com intervalos de 1 (24 horas) e 3 (72 horas) dias para as estirpes mutantes 13C43 e 9E3 e com intervalos de 3 dias (72 horas) para as estirpes mutantes 39B7, T2B10 e 13C7.

TABELA 8 – ORGANISMOS MUTANTES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE COLONIZAÇÃO

Proteína codificada	Mutante	Descrição/Função	Referência
Prot. hipotética	39B7	Função desconhecida	Tadra-Sfeir, não publicado
Prot. hipotética	9E3	Função desconhecida	Tadra-Sfeir, não publicado
Prot. hipotética	T2B10	Função desconhecida	Tadra-Sfeir, não publicado
Prot. hipotética	13C9	Função desconhecida	Tadra-Sfeir, não publicado
AmpG (Muropeptídeo Permease)	13C43	Transporte de Carboidratos e Metabolismo	Tadra-Sfeir, não publicado

4.5.1 Ensaios de Colonização interna de milho pelas estirpes mutantes 13C43, 9E3, T2B10, 13C9 e 39B7

Foram realizados ensaios de colonização com as estirpes mutantes 13C43, 9E3, T2B10, 13C9 e 39B7 e com a estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae*. (GRÁFICOS 1 e 2)

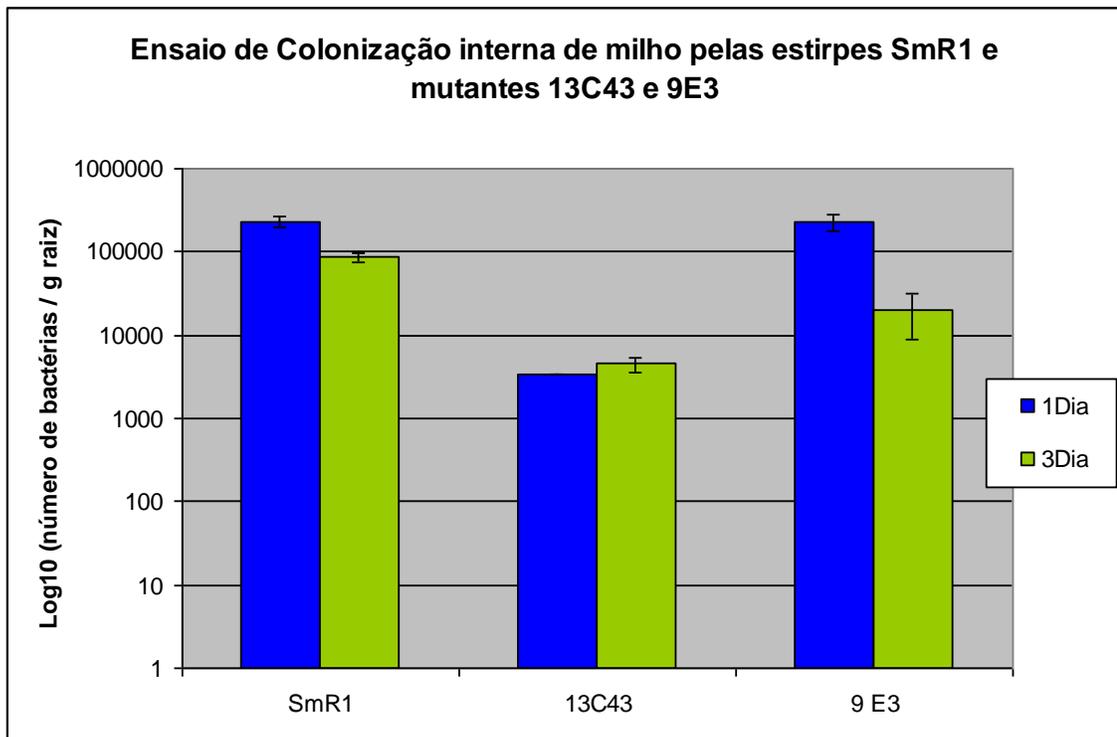


GRÁFICO 1: Colonização interna das raízes de milho com as estirpes de *H. seropedicae* SmR1, 13C43 e 9E3. As raízes de milho foram inoculadas com *H. seropedicae* estirpe selvagem e mutantes 13C43 e 9E3. O número de endófitos presentes nas raízes inoculadas foi determinado 1 dia (azul) e 3 dias (verde) após a inoculação. Os resultados mostram a média de, pelo menos, dois ensaios com 3 plantas em cada condição.

Os ensaios de colonização interna das raízes de milho com as estirpes selvagem SmR1 e mutantes T2B10, 13C9 e 39B7 foram realizados após 3 dias de inoculação (GRÁFICO 2).

Ensaio de Colonização interna das raízes de milho pelas estirpes SmR1 e mutantes T2B10, 13C9 e 39B7 de *H. seropedicae*

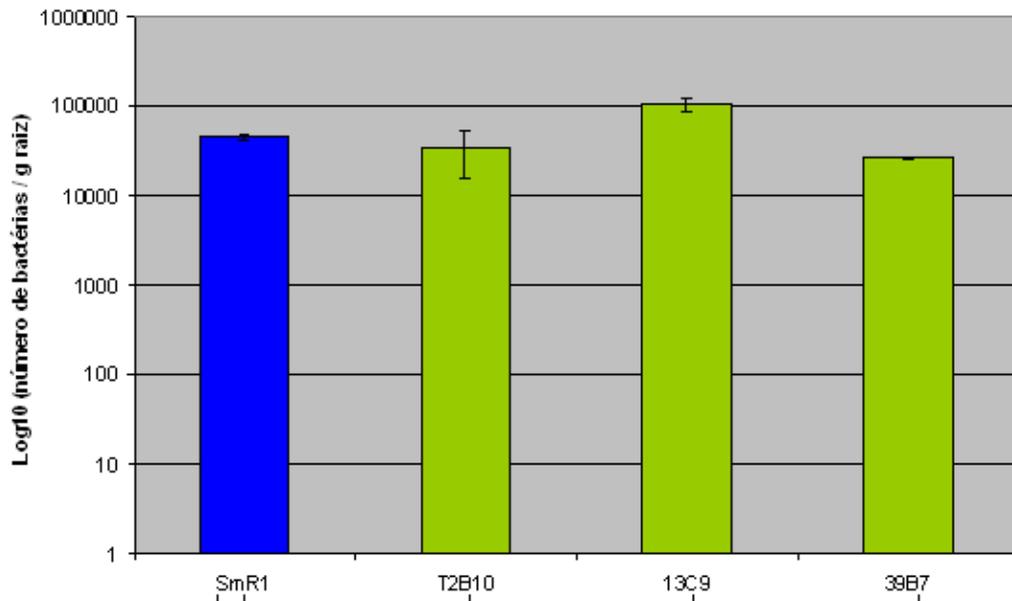


GRÁFICO 2: Colonização interna de raízes de milho com as estirpes de *H. seropedicae* SmR1, T2B10, 13C9 e 39B7. As raízes de milho foram inoculadas com *H. seropedicae* estirpe selvagem e mutantes T2B10, 13C9 e 39B7. O número de endofíticos presentes nas raízes inoculadas foi determinado 3 dias após a inoculação. Os resultados mostram a média de, pelo menos, dois ensaios com 3 plantas em cada condição.

Nossos resultados mostram uma diminuição no número de bactérias que colonizaram internamente a raiz de milho inoculada com a estirpe 13C43. Esta estirpe contém uma mutação, quando comparada com a estirpe selvagem, no gene *AmpG* que codifica para uma Muropeptídeo permease. Esta proteína participa do transporte de carboidratos e do metabolismo celular. Sendo responsável por regular os níveis de beta-lactamases e agir nas vias de reciclagem dos proteoglicanos presentes na parede celular dos organismos gram-negativos.

A muropeptídeo permease é uma proteína transmembrana (LINDQUIST, S. e WESTON-HAFER, K., *et al.*, 1993) de um único componente e está envolvida com o transporte dependente da força motriz de prótons. (CHENG, Q.; PARK, J. T., 2002)

Foi originalmente descrita como um regulador essencial para a expressão de altos níveis de ampC (beta-lactamase), sendo responsável por sua ativação através de outras proteínas. (KORFMANN, G., SANDERS, C. C., 1989)

As bactérias possuem uma parede celular rígida essencial para a sobrevivência e esta parede tem em sua composição heteropolímeros conhecidos como mureínas ou peptídeoglicanos (cadeias de N-acetilglucosamina ou ácido N-acetilmurâmico freqüentemente ligadas umas as outras por peptídeos).

O gene estudado está envolvido no monitoramento do status dos peptídeoglicanos da parede celular pelas bactérias. Este monitoramento é sugerido pela convergência de dois fenômenos: reciclagem dos peptídeoglicanos e indução de beta-lactamases. O gene *ampG* é essencial para a regulação de beta-lactamases e, também, se mostra necessário no processo de reciclagem.

Alguns estudos sugerem que os proteoglicanos são degradados no periplasma e a mureína tripeptídeo derivada é então transportada para o citoplasma através da proteína ampG e reutilizada na síntese de novos peptídeoglicanos. (JACOBS C., 1994)

Vários organismos gram-negativos reciclam grande parte destes componentes com o auxílio da muropeptídeo permease - ampG. Alguns estudos sugerem que o fenômeno da indução de beta-lactamases é regulado pelo nível de muropeptídeos no citoplasma. Este pode ser um tipo de sinalização externa que oferece informações sobre a maturação ou danos da parede celular e divisão celular (JACOBS C., 1994).

Células sem qualquer ampG podem perder até 40% do seus peptídeoglicanos por geração.

Estes resultados indicam que este gene pode estar envolvido direta ou indiretamente com a capacidade de colonização da estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae*. Uma mutação deste gene faz com que a bactéria seja menos capaz de colonizar os tecidos internos de raízes de milho já que deve haver um maior gasto energético para a manutenção da parede e divisão celular.

4.5.2 Experimentos de Colonização interna das raízes de milho com as estirpes de *H. rubrisubalbicans* M1 e mutante *hrcN*

Foram realizados experimentos de colonização interna em raízes de milho com a intenção de identificar diferenças no padrão de colonização da estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* – M1 e da estirpe mutante para o gene *hrcN* que codifica para a ATPase do sistema de secreção do tipo III. Os experimentos foram feitos com intervalos de 1(24 horas), 3 (72 horas) dias e 7 dias (168 horas). Os resultados obtidos encontram-se no GRÁFICO 3.

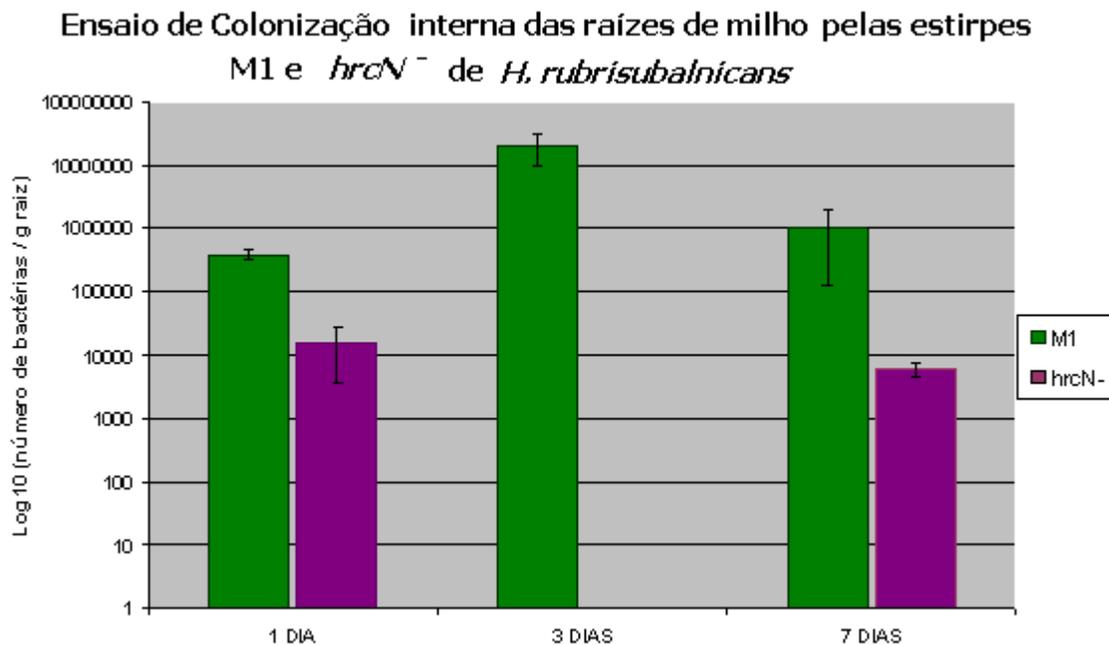


GRÁFICO 3: Ensaio de colonização interna de raízes de milho (cultivar SHS 3031) com as estirpes de *H. rubrisubalbicans* M1 e mutante *hrcN*. As raízes de milho foram inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe selvagem M1 e mutante *hrcN*⁻. O número de endofíticos, presentes nas raízes inoculadas com foi determinado 1, 3 e 7 dias após a inoculação. Os resultados mostram a média de, pelo menos, 2 ensaios com 3 plantas em cada condição.

Os dados mostram que o número de células de *Herbaspirillum rubrisubalbicans hrcN* colonizando internamente a raiz de milho é menor quando comparado com a colonização interna pela estirpe selvagem.

Estes resultados indicam que o T3SS de *H. rubrisubalbicans* está envolvido no processo de colonização interna das raízes de milho.

Quando o gene *hrcN* é mutado o T3SS não funciona corretamente já que esse gene codifica para a ATPase que é responsável por fornecer energia pela hidrólise do ATP favorecendo a passagem da proteína efetora pelo sistema.

Esse fato pode alterar a resposta da planta em relação a bactéria, fazendo com que a secreção de proteínas seja alterada. Desta forma, uma mutação no gene *hrcN* pode acarretar a perda da patogenicidade desta bactéria.

4.5.3 Experimentos de Adesão as raízes de milho com as estirpes M1 de *H. rubrisubalbicans* e RAM10 de *H. seropedicae*.

Foram realizados experimentos pela adesão a raiz de milho utilizando as estirpes M1 e RAM10 separadamente ou co-inoculando estas estirpes na proporção 1:1, 1:10 e 10:1 (GRÁFICOS 4 e 5).

Ensaio de Adesão a superfície radicular de plântulas de milho pelas estirpes M1 de *H. rubrisubalbicans* e RAM10 de *H. seropedicae*

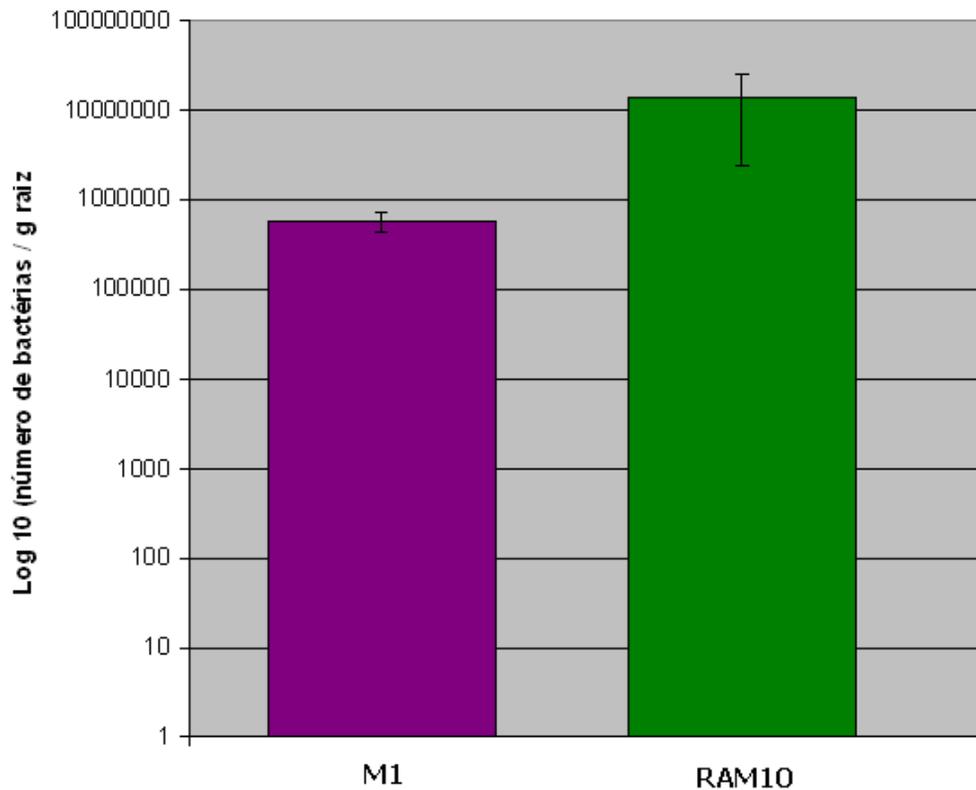


GRÁFICO 4: Ensaio de adesão com os organismos M1 e RAM10 em raízes de milho (cultivar SHS 5055). As raízes de milho foram inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe selvagem M1 e *H. seropedicae* estirpe selvagem RAM10. O número de endofíticos presente na superfície radicular foi determinado imediatamente após a inoculação. Os resultados mostram a média de, pelo menos, 2 ensaios com 3 plantas em cada condição.

Ensaio de Adesão a superfície radicular de plântulas de milho pelas estirpes M1 de *H. rubrisubalbicans* e RAM10 de *H. seropedicae*

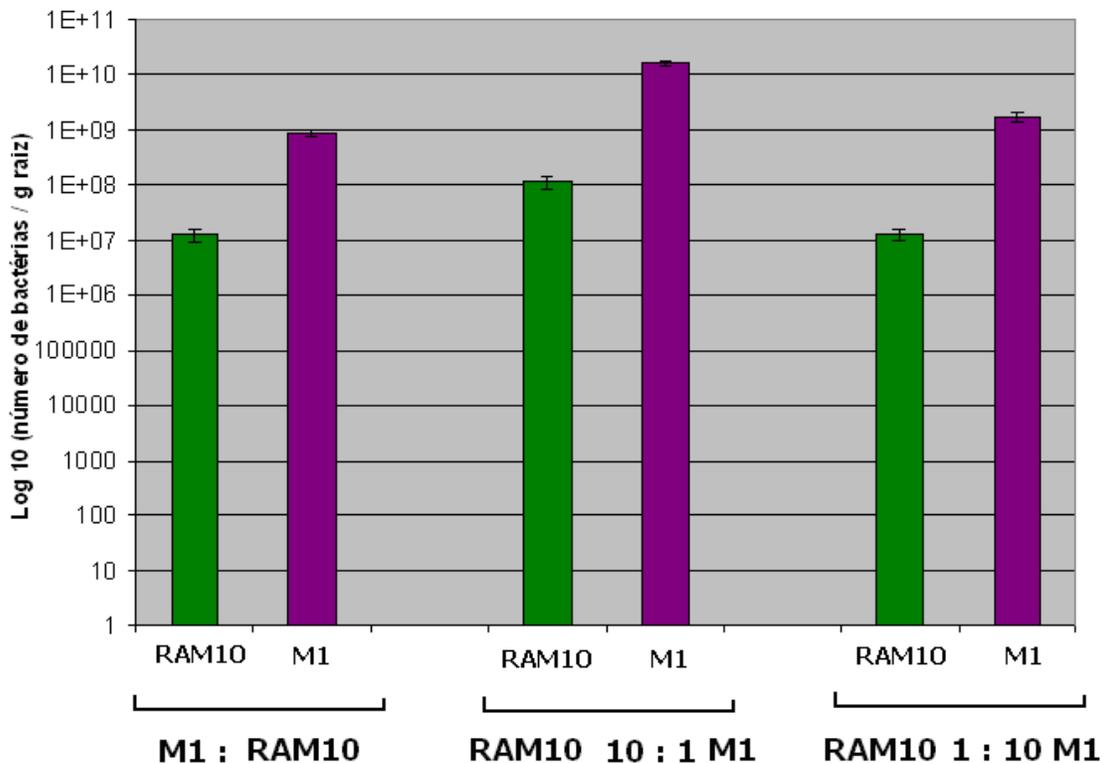


GRÁFICO 5: Ensaio de adesão com co-inoculação das estirpes M1 e RAM10 em raízes de milho (cultivar SHS 5055). As raízes de milho foram inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe selvagem (M1) e *H. seropedicae* estirpe selvagem RAM10. O número de endofíticos presente na superfície radicular foi determinado imediatamente após a inoculação. O inoculo foi feito nas proporções de RAM10 1:1 M1, RAM10 10:1 M1 e RAM10 1:10 M1, respectivamente. Os resultados mostram a média de, pelo menos, 2 ensaios com 3 plantas em cada condição.

Nossos resultados mostram que o número de células de *H. seropedicae* aderidas às raízes de milho é maior que o número de células de *H. rubrisubalbicans*.

Quando as duas estirpes são co-inoculadas a estirpe M1 parece influenciar na adesão da estirpe RAM10 de *H. seropedicae*. Em todas as proporções analisadas, até mesmo quando o RAM10 é inoculado em uma proporção 10 vezes maior, há uma adesão mais eficiente (cerca de 100 vezes maior) por parte da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*.

4.5.4 Experimentos de Colonização interna de raízes de milho pelas estirpes M1 de *H. rubrisubalbicans* e RAM10 de *H. seropedicae*.

Foram realizados experimentos de colonização interna inoculando as estirpes RAM10 e M1 separadas e também foi feita a co-inoculação das estirpes nas proporções de RAM10 1:1 M1, RAM10 1:10 M1 e RAM10 10:1 M1.

Os resultados obtidos durante os ensaios de colonização dos tecidos internos das raízes de milho com inoculação isolada das estirpes RAM10 e M1 são mostrados no GRÁFICO 6.

Ensaio de Colonização interna das raízes de milho pela estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* e RAM10 de *H. seropedicae*

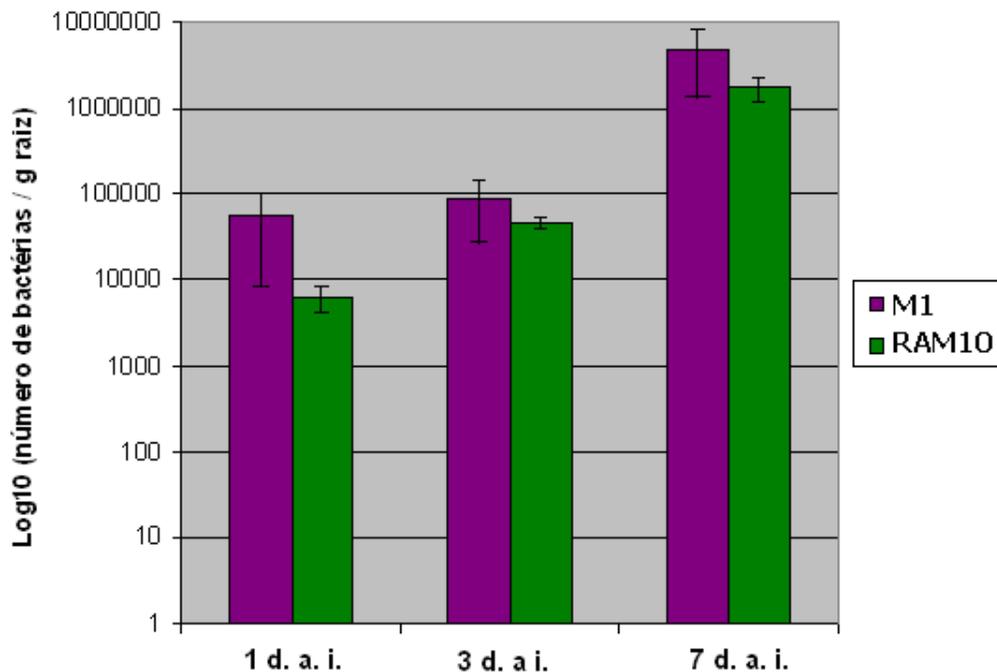


GRÁFICO 6: Ensaio de Colonização interna das raízes de milho (cultivar SHS 5055) 1, 3 e 7 dia após a inoculação (d.a.i.). As raízes de milho foram inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe selvagem (M1) e *H. seropedicae* estirpe selvagem RAM10 isoladamente na concentração de 10^5 células/mL. O número de endofíticos presente nos tecidos internos foi determinado 1, 3 e 7 dias após a inoculação. Os resultados mostram a média de, pelo menos, 2 ensaios com 3 plantas em cada condição.

Os resultados mostram que o número de células de *H. rubrisubalbicans* M1 colonizando internamente as raízes de milho é semelhante ao número de células de *H. seropedicae*.

Nota-se que há uma colonização equivalente entre os organismos M1 e RAM10 após 1, 3 e 7 dias de inoculação.

Através dos resultados da inoculação isolada percebe-se que os organismos M1 e RAM10 possuem níveis de colonização semelhantes quando inoculados separadamente.

Quando as duas bactérias foram co-inoculadas somente células de *H. rubrisubalbicans* foram recuperadas na maioria dos tratamentos. Células de *H. seropedicae* foram observadas somente no experimento de 3 dias após a inoculação na condição de RAM10 1:1 M1. (GRÁFICOS 7 – 8 e 9)

**Competição pela colonização de raízes de milho entre as bactérias
M1 de *H. rubrisubalbicans* e RAM10 de *H. seropedicae***

1 dia após a inoculação

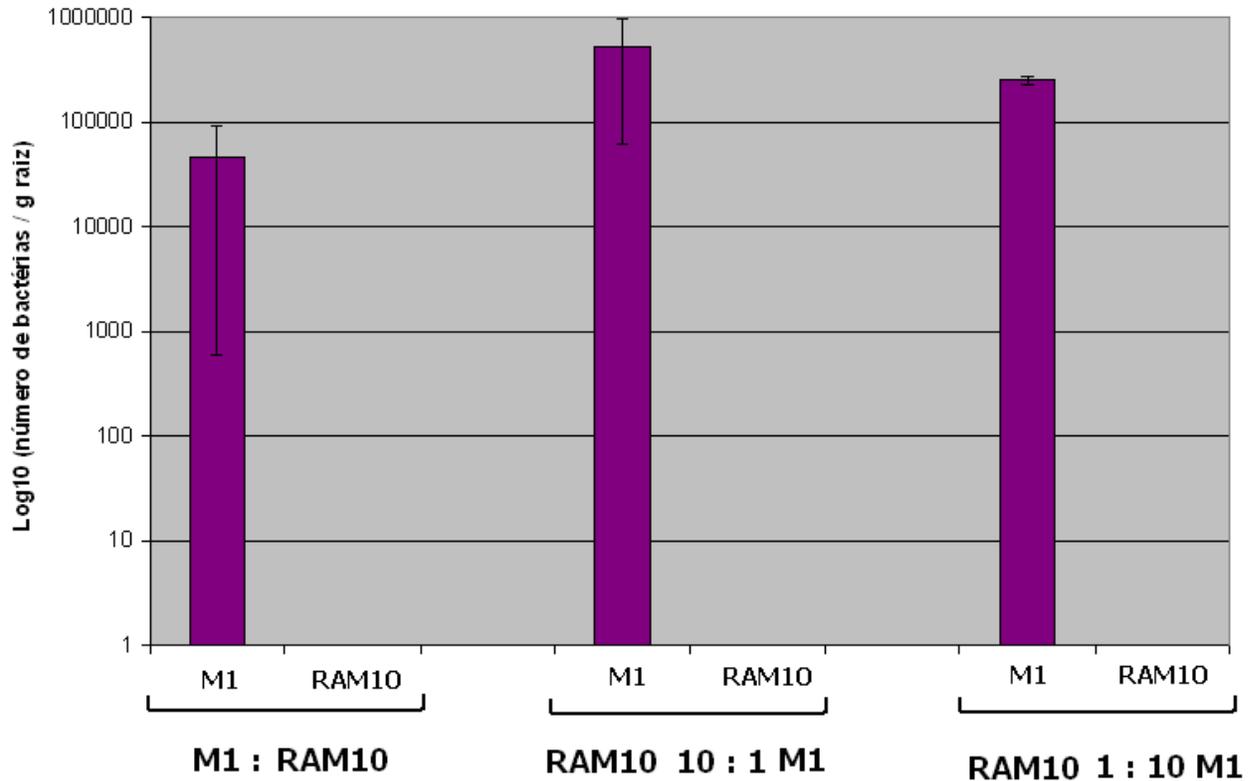


GRÁFICO 7: Ensaio de Competição interna em raízes de milho (cultivar SHS 5055) 1 dia após a inoculação com as estirpes RAM10 e M1. As raízes de milho foram inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe selvagem (M1) e *H. seropedicae* estirpe selvagem RAM10. O número de endofíticos presente nos tecidos internos foi determinado imediatamente após a inoculação. O inóculo foi feito nas proporções de RAM10 1:1 M1, RAM10 10:1 M1 e RAM10 1:10 M1, respectivamente. Os resultados mostram a média de, pelo menos, 2 ensaios com 3 plantas em cada condição.

Este resultado indica que a bactéria M1 de *H. rubrisubalbicans* interfere na Colonização interna do milho pelo *H. seropedicae* RAM10 e parece suprimir totalmente o crescimento deste nos tecidos internos das raízes de milho.

**Competição pela colonização de raízes de milho entre as bactérias
M1 de *H. rubrisubalbicans* e RAM10 de *H. seropedicae***

3 dias após a inoculação

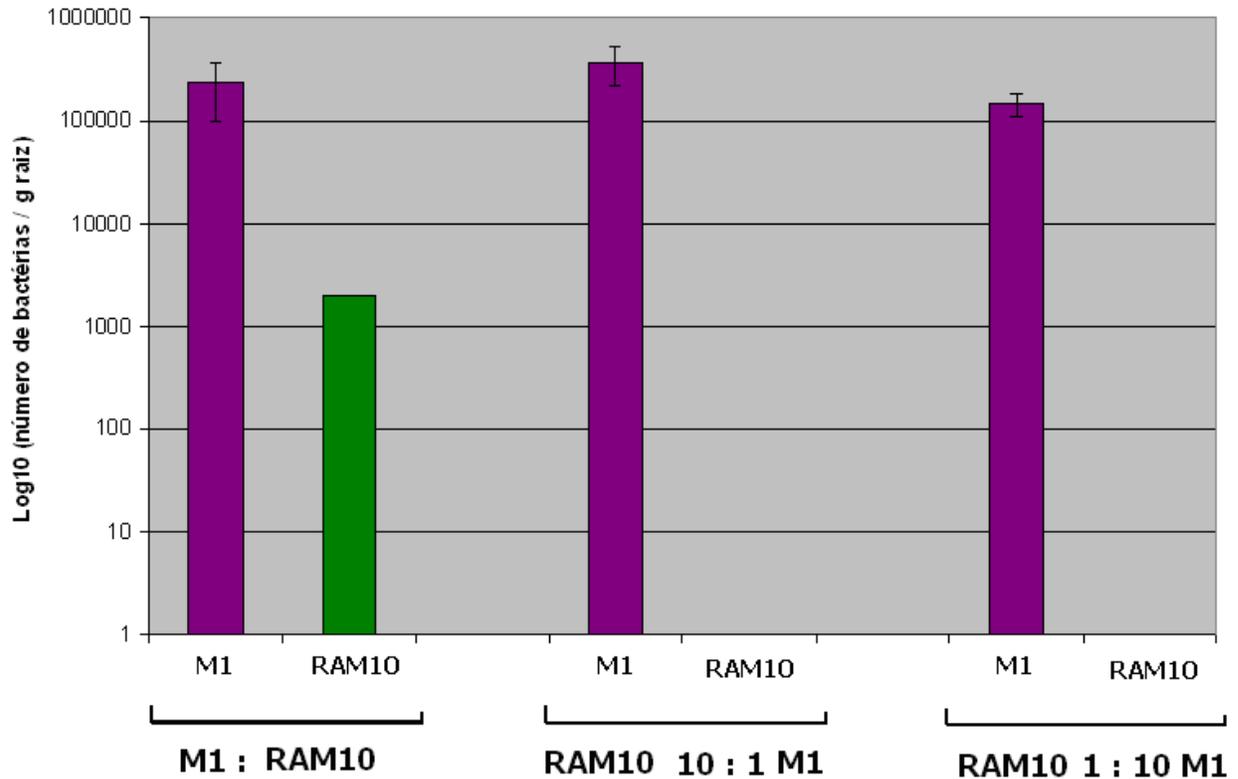


GRÁFICO 8: Ensaio de Competição interna em raízes de milho (cultivar SHS 5055) 3 dias após a inoculação com as estirpes RAM10 e M1. As raízes de milho foram inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe selvagem (M1) e *H. seropedicae* estirpe selvagem RAM10. O número de endofitos presente nos tecidos internos foi determinado 3 Dias após a inoculação. O inoculo foi feito nas proporções de RAM10 1:1 M1, RAM10 10:1 M1 e RAM10 1:10 M1, respectivamente. Os resultados mostram a média de, pelo menos, 2 ensaios com 3 plantas em cada condição.

**Competição pela colonização de raízes de milho entre as bactérias
M1 de *H. rubrisubalbicans* e RAM10 de *H. seropedicae***

7 dias após a inoculação

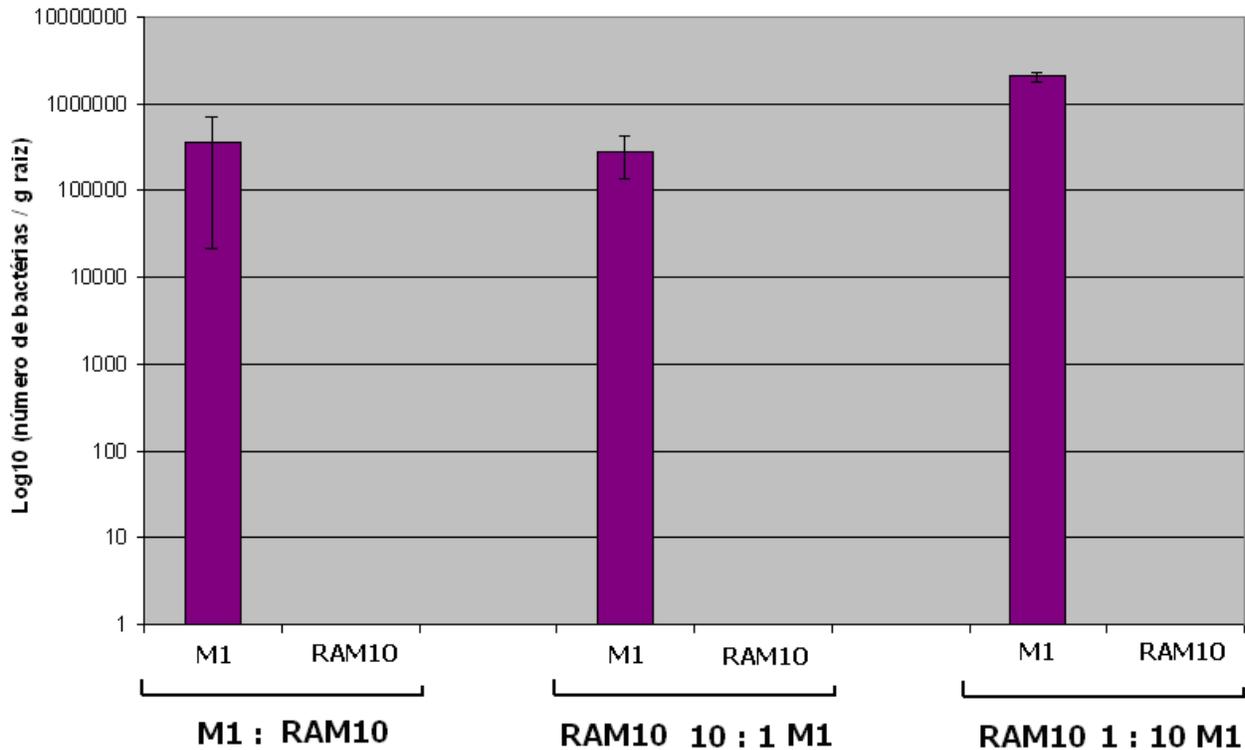


GRÁFICO 9: Ensaio de Competição interna em raízes de milho (cultivar SHS 5055) 7 dias após a inoculação com as estirpes RAM10 e M1. As raízes de milho foram inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe selvagem (M1) e *H. seropedicae* estirpe selvagem RAM10. O número de endofíticos presente nos tecidos internos foi determinado 7 Dias após a inoculação. O inoculo foi feito nas proporções de RAM10 1:1 M1, RAM10 10:1 M1 e RAM10 1:10 M1, respectivamente.

Nota-se em todos os experimentos de competição realizados que o organismo RAM10 tem seu crescimento totalmente suprimido pela presença do organismo M1.

O organismo M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* parece ter uma influência acentuada sobre o crescimento e colonização do organismo RAM10, tendo este seu crescimento, poder de adesão e de colonização diminuídos drasticamente quando há co-inoculação.

Estes dados indicam também a necessidade de estudar mais as reações dos organismos diazotróficos quando inculados em conjunto. Vários consórcios de bactérias

tem sido criados, utilizados como inoculantes e obtido grande sucesso, porém a ação de alguns organismos em conjunto pode ter a eficiência alterada, como foi mostrado nos experimentos realizados neste trabalho.

5. CONCLUSÃO

Herbaspirillum rubrisubalbicans é causador das doenças da estria mosqueada e da estria vermelha em algumas variedades de cana-de-açúcar e sorgo (OLIVARES *et al.*, 1997). *H. seropedicae* é um endofítico que aumenta o crescimento vegetal através da fixação de nitrogênio, contribuindo significativamente para o crescimento da planta (BALDANI *et al.*, 2000), sendo assim o estudo dos genes que os diferenciam torna-se interessante e de grande importância para que se entendam os diferentes mecanismos de interação planta-bactéria.

Neste trabalho foi construída uma biblioteca denominada SM1 aonde foram encontrados fragmentos de DNA presentes na estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* e ausentes na estirpe M1 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Como esperado, as 96 seqüências dos fragmentos obtidos revelaram alta identidade quando comparados com o genoma de *H. seropedicae*.

Durante a análise destas seqüências únicas de *H. seropedicae* foram encontrados genes que codificam para proteínas hipotéticas e conservadas hipotéticas,. O grande número destas proteínas indica que muitos dos genes espécie-específicos de SmR1 ainda não têm função conhecida. Foram encontradas também proteínas envolvidas no sistema de transporte de açúcar e nitrato, glicosiltransferases do grupo 1, peptídeo-sinal, exoproteínas envolvidas com a adesão planta-bactéria, β -lactamase de classe C, proteínas associadas a proteoglicanos, proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa, como as de efluxo de drogas e proteínas envolvidas com a biossíntese de exopolissacarídeos.

Estirpes mutantes de *H. seropedicae* nos genes que codificam para proteínas hipotéticas foram testados quanto a capacidade de colonizar raízes de milho. Somente a estirpe mutante no gene *ampG* apresentou uma taxa de colonização menor quando comparado ao organismo parental – SmR1. Esse resultado pode ter relação com as funções da proteína AmpG: sinalizar situações externas, como maturação ou danos na parede celular e divisão celular e realizar a captação e reciclagem de fragmentos de proteoglicanos (mureína de peptídeo) para nova síntese. Estas deficiências podem causar maior dificuldade durante a replicação e síntese contínua de novos

proteoglicanos, o que pode estar relacionado com o menor número de colonização observado nos resultados.

Foi testada também uma estirpe mutante para o Gene *hrcN* de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Este gene pertence ao aparato de Sistema de Secreção do tipo III e notou-se nos experimentos que esta estirpe mutante teve uma menor capacidade de colonização quando comparada a estirpe selvagem M1. Esta diferença pode estar relacionada ao aporte de proteínas da bactéria para a célula/tecido da planta, fazendo com que a planta tenha uma resposta de controle da colonização mais eficiente.

Foram feitos experimentos de adesão e colonização interna das raízes de milho com a inoculação e coinoculação das estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, RAM10 e M1, respectivamente. Notou-se que a estirpe M1 tem um grande poder de influenciar a adesão e a colonização da estirpe RAM10 de *H. seropedicae*, sendo que quando as 2 bactérias são consorciadas há uma diferença notável na adesão. Ainda que existam células da estirpe RAM10 aderindo a superfície radicular, estes são encontrados em um número consideravelmente menor em qualquer proporção, quando comparados com as células da estirpe M1.

6. REFERÊNCIAS

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 36. P. 86-93. 1986.

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

BALDANI B., POT G., KIRCHHOF E., FALSEN V. L. D., BALDANI F. L., OLIVARES, B. HOSTE, K. KERSTERS, A. HARTMANN, M. GILLIS, J. DÖBEREINER. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **Int J Syst Bacteriol**, v. 46, p.802- 810, 1996.

BRITO B, ALDON D, BARBERIS P, BOUCHER C, GENIN S. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contactdependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes. **Mol Plant Microbe Interact.**15(2):109-19; 2002.

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.

CHENG, Q.; PARK, J. T., Substrate Specificity of the AmpG Permease Required for Recycling of Cell Wall Anhydro-Muropeptides. **Journal of Bacteriology**, p. 6434-6436, Vol. 184, No. 23. December 2002.

CHRISTOPHER, W.N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **J. Agricult. Res.** v. 41, p. 259, 1992.

CIANCIOTTO NP. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **Trends Microbiol.**;13(12):581-8. Epub 2005.

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

CORNELIS G. R.; van GIJSEGEM F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annu. Rev. Microbiol.**; 54:735-74, 2000.

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

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.

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

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em www.embrapa.br . Acesso em 01/08/2010.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Inoculantes para leguminosas. Disponível em www.embrapa.br . Acesso em 01/12/2010.

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

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

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

HENDERSON IR, NAVARRO-GARCIA F, DESVAUX M, FERNANDEZ RC, ALA'ALDEEN D Type V protein secretion pathw

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

IM, W.T.; YOKOTA, A.; KIM, M.K.; LEE, S.T. *Kaistia adipata* gen. nov., sp. nov., a novel alpha-proteobacterium. **J Gen Appl Microbiol.**, v. 50, p. 249-254, 2004.

JACOBS C., HUANG L.J., BARTOWSKY E., NORMARK S., PARK J.T., Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. **The EMBO Journal**. 1994 Oct 3;13(19):4684-94.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**. v. 48. n. 308. p. 785-797. 1997.

JUNG, S. Y., LEE, M. H., OH, T. K., & YOON, J. H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 57, p. 2284-2288, 2007

Kang, K. S; Cottrell, I. W. Em ***Polysaccharides in Microbial Technology***, Pepler, H. J.; Perlman, D., eds.; Academic Press: New York, 1979, p. 417.

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

KORFMANN, g., SANDERS, C. C., AmpG is essential for high-level expression of AmpC β -lactamase in *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1989. V. 33. N. 1946-1951.

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

LANDGRAF, L. Embrapa e UFPR desenvolvem primeiro inoculante para milho e trigo
Embrapa Soja; 2009

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

LINDQUIST, S., WESTON-HAFER K., SCHMIDT H., PUL C., KORFMANN G., ERICKSON J., SANDERS K., MARTIN H. H., NORMAK S., AmpG, a signal transducer in chromosomal β -lactamase induction. 1993. **Molecular Microbiology**. 9:703-715.

MERCANTE, F.M.; GOI, S.R.; FRANCO, A.A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Ver. Univ. Rural**. v. 22, p.65-81, 2002.

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

MYLONA, P.; PAWLOSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**. v. 7. P. 869-885. 1995.

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

POZIDIS C., CHALKIADAKI A., GOMEZ-SERRANO A., STAHLBERG H., BROWN I., TAMPAKAKI A.P., LUSTIG A., SIANIDIS G., POLITOU A.S., ENGEL A., PANOPOULOS N.J., MANSFIELD J., PUGSLEY A.P., KARAMANOU S., ECONOMOU A.. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. **J Biol Chem.** 278(28):25816-24, 2003.

PUKATZKI S, MA AT, STURTEVANT D, KRASTINS B, SARRACINO D, NELSON WC, HEIDELBERG JF, MEKALANOS JJ Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 31;103(5):1528-33. 2006.

RONCATO-MACCARI, L. D. B., Ramos, H. J.O., Pedrosa, F. O., Alquini, Y., CHUBATSU, L. S., YATES, M.G., RIGO, L.U., STEFFENS, M.B., SOUZA, E. M. – Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology ecology**, 45(37-47), 2003

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.

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

SCHMIDT M. A., Envolvimento do sistema de secreção do tipo III de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* na interação fitopatogênica. **Dissertação de mestrado.** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular UFPR, 2009

SILVA, E. B.; ALENCAR, C. A., FERNANDES, P. I.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Avaliação do consórcio de estirpes para inoculação em feijão-caupi; **XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo**; Guarapari – ES, setembro de 2010

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. C.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M.; Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Quím. Nova** vol.29 no.1 São Paulo Jan./Feb. 2006

SILVA V. C. H., Expressão e purificação de proteínas do sistema de secreção do tipo III de *Herbaspirillum seropedicae*. **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR. 2008.

TADRA, M. Z., Obtenção de genes mutagenizados da estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide narigenina. **Monografia** apresentada ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

THANASSI D. G.; HULTGREN S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 12, p. 420-30, 2000.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-crop legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 19-28, 1991.

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

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

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