

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO BALSANELLI

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III
DE ENDÓFITOS DO GÊNERO *Herbaspirillum***

CURITIBA

2007

EDUARDO BALSANELLI

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III
DE ENDÓFITOS DO GÊNERO *Herbaspirillum***

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Bioquímica como requisito parcial à conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Emanuel Maltempi de Souza

Orientadora: Rose Adele Monteiro

CURITIBA

2007

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

Agradeço muito aos meus orientadores, Emanuel Maltempi de Souza e Rose Adele Monteiro, pela formação intelectual em uma verdadeira iniciação científica. Ao professor Leonardo Magalhães Cruz, pela iniciação na pesquisa *in silico*. Aos professores e coordenadores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, pela manutenção e melhoria da ótima qualidade de pesquisa desenvolvida no grupo. Aos colegas de laboratório, pela mão-de-obra que gera esta ótima qualidade, e pelo constante auxílio científico e pessoal. Aos técnicos, pelo empenho em todas as pesquisas de todos os integrantes do grupo. Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	1
1.2. ILHAS GENÔMICAS.....	4
1.3. SISTEMAS DE SECREÇÃO.....	6
1.3.1. Sistema de Secreção do Tipo III.....	9
1.3.1.1. Sistema de Secreção do Tipo III em fitopatógenos.....	12
1.3.1.2 Sistema de Secreção do Tipo III em microrganismos simbiotes.....	17
1.4. <i>HERBASPIRILLUM</i> SPP.	18
1.4.1. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	19
1.4.2. <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	21
1.5. COMPARAÇÃO GENÔMICA.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. BACTÉRIAS.....	26
3.2. PLASMÍDEOS	27
3.3. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO.....	28
3.3.1. Antibióticos.....	29
3.3.2. Estocagem das Bactérias.....	29
3.4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	29
3.4.1. Purificação de DNA genômico de <i>Herbaspirillum</i> spp.....	29
3.4.2. Purificação de DNA plasmidial.....	30
3.4.3. Extração de DNA a partir de gel de agarose a baixo ponto de fusão (LMP).....	30
3.5. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA.....	30
3.5.1. Eletroforese de DNA.....	30
3.5.2. Clivagem de DNA por enzimas de restrição.....	31
3.5.3. Ligação de fragmentos de DNA em vetores.....	31
3.5.4. Reação de transposição <i>in vitro</i>	31
3.5.5. Amplificação de DNA.....	31
3.5.6. Seqüenciamento de DNA.....	32

3.6. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO.....	32
3.6.1. Preparo de células eletrocompetentes.....	32
3.6.2. Transformação bacteriana.....	32
3.7. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA DO TTSS DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	33
3.7.1. Identificação de seqüências de DNA do TTSS de <i>H. rubrisubalbicans</i>	33
3.7.2. Análise de seqüências de DNA do TTSS de <i>H. rubrisubalbicans</i>	33
3.8. SOUTHERN BLOT.....	35
3.8.1. Transferência do DNA genômico digerido do gel de agarose para a membrana de náilon.....	35
3.8.2. Marcação das sondas <i>hrcC</i> , <i>hrpG</i> e <i>hrpL</i> de <i>H. seropedicae</i> com fluoresceína-dUTP	36
3.8.3. Revelação	36
3.9. OBTENÇÃO DO MUTANTE <i>hrcV</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1.....	36
3.9.1. Isolamento do cassete <i>nptI-sacB-sacR</i>	37
3.9.2. Inserção do cassete <i>nptI-sacB-sacR</i> no vetor dos plasmídeos selecionados	37
3.9.3. Reação de transposição <i>in vitro</i>	37
3.9.4. Seleção da construção com o gene nocauteado.....	37
3.9.5. Confirmação da recombinação homóloga dupla.....	37
3.10. OBTENÇÃO DO MUTANTE <i>hrpE</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1.....	38
3.11. SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA SUBTRATIVA	38
3.11.1. Construção da biblioteca.....	38
3.11.2. Seqüenciamento e análise da biblioteca.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA DO TTSS DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	40
4.1.1. Comparação do <i>cluster hrp/hrc</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> e outros fitopatógenos.....	43
4.1.2. Comparação do <i>cluster hrp/hrc</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> e de <i>H. seropedicae</i>	45
4.1.3. Evolução da proteína HrcN de <i>H. rubrisubalbicans</i> e de outras bactérias fitopatogênicas, simbioses, associativas e patógenos animais.....	46

4.2. CONSERVAÇÃO DOS GENES <i>hrcC</i> , <i>hrpG</i> e <i>hrpL</i> ENTRE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i>	48
4.2.1. Identificação do gene <i>hrcC</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> por hibridização....	48
4.2.2. Identificação do gene <i>hrpG</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> por hibridização....	50
4.2.3. Identificação do gene <i>hrpL</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> por hibridização.....	52
4.3. OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1.....	54
4.3.1. Obtenção do mutante <i>hrpE</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1.....	54
4.3.2. Obtenção da estirpe mutante <i>hrcV</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1.....	55
4.4. SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DA BIBLIOTECA SUBTRATIVA.....	56
5. CONCLUSÕES.....	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ARRANJO HIPOTÉTICO DAS PROTEÍNAS DOS SISTEMAS DE SECREÇÃO DO TIPO II (a) E III (b).....	07
FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DO GRUPO I.....	16
FIGURA 3 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DO GRUPO II.....	16
FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>Rhizobium</i> sp.....	17
FIGURA 5 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. seropedicae</i>	20
FIGURA 6 – SINTOMAS TÍPICOS DA DOENÇA DA ESTRIA MOSQUEADA.....	22
FIGURA 7 – <i>HERBASPIRILLUM RUBRISUBALBICANS</i> (a) E <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> (b) COLONIZANDO FEIXES VASCULARES DE FOLHA DE SORGO.....	23
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DA MONTAGEM DE CONTIGS UTILIZANDO O PACOTE PHRED/CAP3/CONSED.....	35
FIGURA 9 – ORGANIZAÇÃO DO CLUSTER <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i>	41
FIGURA 10 – COMPARAÇÃO DO CLUSTER <i>hrp/hrc</i> DE FITOPATÓGENOS.....	44
FIGURA 11 – COMPARAÇÃO DO CLUSTER <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E DE <i>H. seropedicae</i>	45
FIGURA 12 – MONTAGEM DO cluster <i>hrp/hrc</i> DE <i>H. rubrisubalbicans</i> BASEADA NA SEQÜÊNCIA DE <i>H. seropedicae</i>	46
FIGURA 13 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS BASEADA NA CONSERVAÇÃO DA PROTEÍNA HrcN.....	47
FIGURA 14 – HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> COM O GENE <i>hrcC</i>	49
FIGURA 15 – HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> COM O GENE <i>hrpG</i>	51
FIGURA 16 – HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> COM O GENE <i>hrpL</i>	53
FIGURA 17 – ESQUEMA DO PLASMÍDEO HR02-MF-00-000-057.H09.TET.....	54
FIGURA 18 – ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pHR <i>hrcV</i>	55
FIGURA 19 – DISTRIBUIÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS EM GRUPOS FUNCIONAIS....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FATORES DE VIRULÊNCIA ENCONTRADOS EM ILHAS DE PATOGENICIDADE.....	5
TABELA 2 – PROTEÍNAS Hrc DE FITOPATÓGENOS E SEUS CORRESPONDENTES HOMÓLOGOS EM PATÓGENOS ANIMAIS E NO SISTEMA DE BIOSÍNTESE FLAGELAR.	14
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> UTILIZADAS.....	26
TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE <i>HERBASPIRILLUM RUBRISUBALBICANS</i> UTILIZADAS.....	26
TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> UTILIZADAS.....	26
TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	27
TABELA 7 – ANTIBIÓTICOS.....	29
TABELA 8 – SIMILARIDADE ENTRE OS PRODUTOS DOS GENES CODIFICANTES PARA PROTEÍNAS SECRETADAS VIA TTSS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E DE OUTRAS BACTÉRIAS.....	41
TABELA 9 – SEQUÊNCIAS OBTIDAS POR HIDRIZAÇÃO SUBTRATIVA.....	56

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE I – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA Hpa4 DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E PROTEÍNAS HOMÓLOGAS	
APÊNDICE II – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA hop1 DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E PROTEÍNAS HOMÓLOGAS	
APÊNDICE III – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA AvrE DE <i>H. rubrisubalbicans</i> E PROTEÍNAS HOMÓLOGAS	

APÊNDICE IV – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA
PROTEÍNA GALA DE *H. rubrisubalbicans* E PROTEÍNAS
HOMÓLOGAS

APÊNDICE V – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA
PROTEÍNA HrpB DE *H. rubrisubalbicans* E PROTEÍNAS
HOMÓLOGAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa - aminoácidos

Amp – ampicilina

ATP – 5'-trifosfato de adenosina

bp – pares de bases nucleotídicas

DNA – ácido desoxirribonucléico

dUTP - 5'-trifosfato de desoxiuridila

kb – kilopares de bases nucleotídicas

Km – canamicina

LMP – *low melting point*

LPS - lipopolissacarídeos

mRNA – RNA mensageiro

orf – *open reading frame*

PAIs – ilhas de patogenicidade

PCR – reação em cadeia da polimerase

RNA – ácido ribonucléico

SDS – dodecilsulfato de sódio

SSH – *suppressive subtractive hybridization*

Tc – tetraciclina

TTSS – sistema de secreção do tipo III

Tris – Tris(hidroximetil)-aminometano

tRNA – RNA transportador

UV – luz ultravioleta

RESUMO

Proteínas extracelulares promovem a virulência de patógenos bacterianos em animais e plantas, e as proteínas efetoras injetadas nas células do hospedeiro pelo Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS) são particularmente importantes na virulência de fitopatógenos Gram-negativos. Este sistema utiliza uma maquinaria altamente conservada para translocar proteínas através do envelope bacteriano e uma maquinaria mais variável para translocar proteínas através de barreiras do hospedeiro, como a parede celular vegetal e a membrana plasmática. Os genes codificadores deste sistema de secreção, *hrp* e *hrc*, são encontrados agrupados nos organismos em que foram descritos. Os genes *hrp* e *hrc* de patógenos vegetais são necessários para causar doenças em plantas sensíveis e induzir uma resposta de hipersensibilidade de defesa em plantas resistentes. Genes homólogos aos genes *hrp* foram identificados em *Herbaspirillum seropedicae* e em *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. O gênero *Herbaspirillum* pertence à Classe β do Filo Proteobacteria. Estes microrganismos são diazotróficos endofíticos e associam-se com várias plantas de interesse econômico, como milho, arroz, sorgo, trigo, e cana-de-açúcar. *H. rubrisubalbicans* causa a doença da estria mosqueada em variedades de cana-de-açúcar e estrias vermelhas em variedades de sorgo. Entretanto, a inoculação de *H. seropedicae* nestas plantas não produziu sintomas da doença, pelo contrário, promoveu o desenvolvimento do vegetal e aumento de produtividade. Desta forma, comparações estruturais e funcionais das seqüências genômicas desses organismos devem permitir uma melhor compreensão da associação endofítica e mecanismo de patogenicidade. O *cluster hrp/hrc* destes organismos apresenta semelhanças na organização gênica e conteúdo protéico codificado. A regulação deste *cluster* em *H. seropedicae* parece ocorrer em dois estágios, em que a proteína HrpG percebe mudanças ambientais e ativa a transcrição de HrpL, uma subunidade sigma da RNA polimerase, que por sua vez promove a transcrição dos genes *hrp*. Em *H. rubrisubalbicans*, o gene codificador para HrpL não foi identificado, sugerindo que a proteína HrpG ativaria outro promotor global de transcrição. Além disso, em *H. seropedicae* não foram identificados genes codificantes para proteínas secretadas via TTSS. A presença destes em *H. rubrisubalbicans* sugere sua participação no caráter fitopatogênico desta bactéria. A construção de mutantes *hrp*⁻ de *H. rubrisubalbicans* possibilitará a determinação do fenótipo desta bactéria sem um TTSS funcional. Visando identificar outras diferenças gênicas entre *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, uma biblioteca subtrativa, contendo segmentos de DNA de *H. rubrisubalbicans* ausentes em *H. seropedicae*, foi seqüenciada e analisada, revelando a presença de elementos de transposição, seqüências sem homologia, reguladores transcricionais, genes codificadores para proteínas de transporte, entre outros. O nocaute destas seqüências identificadas permitirá determinar suas funções e importância para *H. rubrisubalbicans*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. INTERAÇÃO PLANTA – BACTÉRIA

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

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

Praticamente todas as plantas vivem em íntima associação com microrganismos, os quais podem colonizar sua superfície (colonização epifítica) ou ocupar espaços em tecidos internos (colonização endofítica) (BRENCIC & WINANS, 2005). Plantas de arroz podem estabelecer associações com várias bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas (DÖBEREINER *et al.*, 1992; BARRAQUIO *et al.*, 1982; MALIK *et al.*, 1997). Todas ou algumas destas bactérias podem ser responsáveis pelo suprimento de nitrogênio fixado à planta (LADHA & REDDY, 1995). Além dos microrganismos cultiváveis associados externamente e internamente ao arroz, uma grande diversidade de fixadores de nitrogênio foi

encontrada, baseado em análise de seqüências parciais dos genes *nif* (*nitrogen fixation genes*) obtidas de amplificado de DNA das raízes (UEDA *et al.*, 1995). Entretanto, a contribuição de bactérias diazotróficas associadas externamente ao arroz é insuficiente para sustentar o desenvolvimento da planta e alta produtividade (LADHA *et al.*, 1995). Infere-se, então, que as bactérias endofíticas estão mais bem protegidas das mudanças ambientais que sofrem as bactérias da rizosfera, apresentando uma competição diminuída e um maior potencial de fornecimento de nitrogênio para a planta hospedeira (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998).

Entre os microrganismos diazotróficos endofíticos encontram-se representantes dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* (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.*, 1995), implicando, portanto, que o uso destes na agricultura brasileira representará uma economia anual de US\$ 1,339 bilhão em fertilizantes nitrogenados (DEL VILLAR, GAMEIRO & DABAT, 2004; EMBRAPA; CNA).

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

O estímulo efetivo do crescimento vegetal, a fixação de nitrogênio *in planta* e a transferência deste nitrogênio fixado para a planta dependem de uma colonização eficiente. Entretanto, a natureza da colonização pelo endófito não é claramente compreendida, devido em parte à dispersão da bactéria por todo o corpo da planta. Esta situação contrasta, por exemplo, com a colonização localizada que ocorre na simbiose rizóbio - legume, na qual a bactéria fica confinada em estruturas

morfo-genéticas (nódulos) desenvolvidas com a finalidade específica de abrigar as células colonizadoras (PÜHLER *et al.*, 2004; HALVERSON & STACEY, 1986).

Questiona-se se as associações entre plantas e microrganismos endofíticos seriam realmente tão harmônicas como aparentam. Baron e Zambryski (1995) observaram respostas similares de plantas hospedeiras frente a diferentes estímulos: ferimentos físicos abióticos, associações simbióticas e situações fitopatogênicas. Genes e vias metabólicas similares são induzidos nestes três casos, levando os autores a sugerirem que a percepção e transdução de sinais nas plantas hospedeiras ocorrem de modo semelhante em decorrência destes fatores. A indução de enzimas que atuam na resposta de defesa da planta ao ataque de fitopatógenos (DIXON & LAMB, 1990) foi detectada nos primeiros estágios da interação de *Bradyrhizobium japonicum* e soja (ESTABROOK & SENGUPTA-GOPALAN, 1991), sugerindo que bactérias simbiontes sejam inicialmente reconhecidas como patógenos invasores (BARON & ZAMBRYSKI, 1995).

Desta forma, para que o microrganismo seja capaz de colonizar as raízes das plantas intercelularmente é necessário primeiramente que seja capaz de superar os mecanismos de defesa da planta (QUISPEL, 1992). Nestas interações associativas e simbióticas, o evento chave parece ser a colonização da rizosfera (PÜHLER *et al.*, 2004). Dentre os estágios deste processo estão a percepção da planta pelo microrganismo, a quimiotaxia em direção à raiz, a aderência e a colonização da superfície da mesma. *Pseudomonas fluorescens* exibe quimiotaxia em resposta a exudatos de plantas, como flavonóides, que são considerados dirigentes da interação planta-microrganismo (DE WEERT *et al.*, 2002). A adesão e colonização de raízes de milho por *Azospirillum brasilense* exigem a presença do flagelo, biossíntese de lipopolissacarídeos e polissacarídeos fibrilares, além da secreção de exopolissacarídeos (JOFRÉ *et al.*, 2004).

As bactérias fitopatogênicas, no entanto, utilizam uma gama de estratégias para a invasão e a colonização do hospedeiro (ALEGRIA *et al.*, 2004). Estudos bioquímicos, genéticos e celulares destes fitopatógenos demonstraram que os mecanismos utilizados envolvem fatores como adesinas, pili, fatores de sinalização bacteriana, fatores de transcrição especializados como fatores sigma alternativos, receptores de fatores externos ou derivados de plantas, proteínas envolvidas em transdução de sinais, e proteínas que constituem ou regulam sistemas de secreção de macromoléculas e fatores de patogenicidade (ALDON *et al.*, 2000; BRITO *et al.*,

2002; FRANCIS, WOLF-WATZ & FORSBERG, 2002; HUECK, 1998; SLATER *et al.*, 2000). Este processo normalmente acarreta no comprometimento da homeostase do tecido invadido ou até da planta inteira.

Qualquer que seja o tipo da interação planta-bactéria, o crescimento competitivo e a sobrevivência do microrganismo em diversas partes do hospedeiro necessitam de respostas adaptativas por parte da bactéria. Esta e outras pressões seletivas parecem ter direcionado a evolução de sistemas especializados de regulação que controlam a expressão de fatores de colonização e virulência (MILLER, MEKALANOS & FALKOW, 1989).

1.2. ILHAS GENÔMICAS

Análises realizadas com diferentes microrganismos, cujo genoma foi seqüenciado, mostraram que eles apresentam uma seqüência principal caracterizada por um conteúdo C+G uniforme, e uma freqüência de utilização de códons homogênea (HACKER & KAPER, 2000; HECKER *et al.*, 1997). Entretanto, existem regiões do genoma, com tamanhos variando entre 10 a 40kb, que apresentam um conteúdo C+G e uma freqüência no uso dos códons diferente da seqüência principal (HACKER & KAPER, 2000; HECKER *et al.*, 1997). Essas regiões, que aparentemente foram adquiridas por transferência horizontal, codificam sistemas com funções acessórias que fornecem vantagens para o microrganismo. Essas funções podem ser exemplificadas como resistência à antibióticos e sistemas envolvidos na simbiose ou patogenicidade. Estas regiões foram denominadas ilhas genômicas, sendo classificadas de acordo com a função dos genes que codifica. Assim, podem ser denominadas Ilhas Metabólicas, Ilhas de Patogenicidade, Ilhas de Resistência e Ilhas de Simbiose (HACKER & KAPER, 2000; HECKER *et al.*, 1997).

Além de possuírem um conteúdo de C+G e freqüência no uso de códons diferentes do resto do genoma, as “ilhas de patogenicidade” (PAIs) são flanqueadas por genes de tRNA, por seqüências repetitivas diretas e por elementos de inserção (GAL-MOR & FINLAY, 2006), podendo apresentar genes que codificam integrases e transposases (GAL-MOR & BRETT, 2006). As PAIs possuem agrupamentos gênicos necessários para a infecção e sua permanência no hospedeiro, e são as ilhas genômicas mais estudadas (HACKER & KAPER, 2000; HECKER *et al.*, 1997). Esta ilha pode possuir genes para um ou mais fatores de virulência (TABELA 1). As proteínas reguladoras que coordenam esses processos são codificadas por genes

que podem ser encontrados dentro ou fora da ilha. As proteínas que regulam os genes das PAIs são proteínas ativadoras de transcrição, reguladoras de resposta de dois componentes, fatores sigma alternativos e as proteínas semelhantes à histonas (HACKER & KAPER, 2000).

TABELA 1 - FATORES DE VIRULÊNCIA ENCONTRADOS EM ILHAS DE PATOGENICIDADE

Genes de Virulência	Microrganismos
Fatores de Aderência	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas <i>Escherichia coli</i> uropatogênicas <i>Vibrio cholerae</i> <i>Listeria</i> spp.
Toxinas	<i>Escherichia coli</i> uropatogênicas <i>Staphylococcus aureus</i>
Sistemas de Captação de Ferro	<i>Escherichia coli</i> uropatogênicas <i>Shigella flexneri</i> <i>Yersinia</i> spp.
Invasão, Modulinas, Efetores	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. <i>Listeria</i> spp.
Sistema de Secreção do Tipo III	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas <i>Pseudomonas syringae</i> <i>Erwinia</i> spp. <i>Yersinia</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.
Sistema de Secreção do Tipo IV	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

FONTE: HACKER & KAPER, 2000.

Em algumas bactérias patogênicas estes fatores de virulência, descritos na tabela 1, contribuem para o potencial patogênico, enquanto que em bactérias não patogênicas os mesmos fatores podem ser importantes na sobrevivência e replicação em nichos ecológicos específicos (HACKER & KAPER, 2000).

1.3. SISTEMAS DE SECREÇÃO

A secreção de macromoléculas é necessária em vários aspectos no ciclo de vida de uma bactéria, incluindo biogênese de flagelo, aquisição de nutrientes e expressão de fatores de virulência. Para isso, as bactérias Gram-negativas enfrentam um desafio maior, pois as moléculas a serem secretadas necessitam atravessar o periplasma e a membrana externa, além da membrana interna (THANASSI & HULTGREN, 2000; PUGSLEY, 1993).

Existem alguns fatores que devem ser superados para que uma macromolécula, como por exemplo, uma proteína, atravesse a membrana externa. Primeiro, as proteínas devem adquirir sua conformação completa já no periplasma, incluindo a formação de pontes dissulfeto. Considerando que a presença de ATP ou de outra fonte de energia seja praticamente inexistente na membrana externa bacteriana, para que haja secreção de proteínas os sistemas de transporte devem possuir algum mecanismo especial para gerar energia na porção externa do sistema, ou possuir algum mecanismo que gere energia na membrana interna e preserve e transfira-a para a membrana externa (THANASSI & HULTGREN, 2000).

As bactérias Gram-negativas desenvolveram sistemas de secreção de proteínas que podem ser divididos em seis grupos (I a VI), contudo somente os quatro primeiros são mais bem estudados. Nos sistemas de secreção do tipo II, IV, V e VI, as proteínas exportadas apresentam uma seqüência amino-terminal dependente do sistema Sec para a passagem pela membrana interna (SANDKIVST, 2001; THANASSI & HULTGREN, 2000). Em *Escherichia coli*, o sistema Sec envolve proteínas na membrana interna (SecD, SecE, SecF, SecY), uma ATPase citoplasmática associada à membrana (SecA), uma chaperona (SecB) que se liga à proteína que será secretada e uma peptidase periplasmática que cliva o peptídeo sinal (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000). Os mecanismos de secreção I e III são independentes de Sec e podem transportar as proteínas diretamente do citoplasma para o exterior da bactéria. Estes sistemas possuem um mecanismo semelhante a sistemas de biogênese de organelas e outras estruturas superficiais bacterianas (THANASSI & HULTGREN, 2000). Um esquema dos sistemas de secreção Sec-dependente e Sec-independente está demonstrado na FIGURA 1.

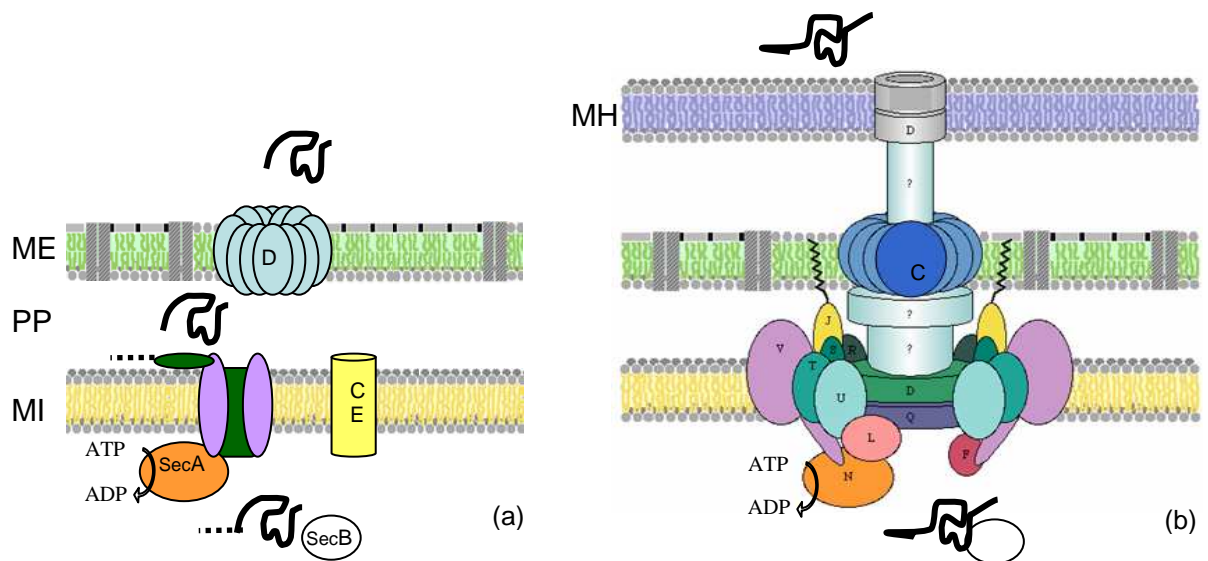


FIGURA 1 – ARRANJO HIPOTÉTICO DAS PROTEÍNAS DOS SISTEMAS DE SECREÇÃO DO TIPO II (a) E III (b). MH: membrana do hospedeiro; ME: membrana externa; PP: periplasma; MI: membrana interna. FONTE: O autor (2007). NOTA: modificado de KEGG (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”).

O Sistema de Secreção do Tipo II é utilizado por várias bactérias Gram-negativas principalmente para a secreção de enzimas degradativas extracelulares, geralmente associadas à degradação de tecidos do hospedeiro. A secreção por este sistema é dividida em duas etapas: a primeira envolve a passagem pela membrana interna, que é feita pelo sistema Sec, ocorrendo a ligação do peptídeo sinal amino-terminal ao complexo de proteínas Sec associadas à membrana interna e a passagem da proteína pela membrana (PUGSLEY, 1993; HENDERSON, NAVARRO-GARCIA & NATARO, 1998). Posteriormente, há clivagem do peptídeo sinal e a liberação da proteína no periplasma, que então será secretada para o exterior da célula (PUGSLEY, 1993; SANDKVIST, 2001). Exemplos deste sistema são encontrados na secreção de pulanase por *Klebsiella oxytoca*, de celulases por *Erwinia* spp., de elastase, exotoxina A e fosfolipase C por *Pseudomonas aeruginosa*, de amilase e protease por *Aeromonas hydrophila* e de poligalacturonase por *Xanthomonas campestris* (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000; PUGSLEY, 1993; SANDKVIST, 2001).

O Sistema de Secreção do Tipo IV também necessita de duas etapas para a externalização de proteínas, semelhantemente ao Sistema de Secreção do Tipo II (HUECK, 1998; PUGSLEY, 1993). Todavia, apresenta um mecanismo de autotransporte baseado na formação de um poro na membrana externa e

autoclivagem após saída da proteína secretada. Este sistema é similar aos sistemas IncP e IncN de conjugação bacteriana e ao sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens*, o qual realiza a translocação do T-DNA oncogênico para as células de plantas. Este sistema pode ser encontrado em gonococos para a secreção de proteases e imunoglobulina A, em *Helicobacter pylori* para a secreção de uma citotoxina, em *Bordetella pertussis* para a secreção de toxinas e em *Shigella flexneri* e em *Escherichia coli* enteropatogênica para a secreção de SepA e EspC, respectivamente (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000; PUGSLEY, 1993).

No caso dos sistemas de secreção dos tipos I e III, os quais são independentes de Sec, a secreção de proteínas acontece de maneira contínua, sem a presença de intermediários periplasmáticos (HUECK, 1998).

O Sistema de Secreção do Tipo I é composto por três componentes estruturais; uma ATPase ancorada à membrana interna (denominada proteína ABC); uma proteína formadora do poro na membrana externa; e uma proteína de fusão de membrana, a qual liga as proteínas de membrana interna e externa. Apesar do processo de secreção ser independente de Sec, a montagem do aparato deste sistema depende do transporte da proteína externa através da membrana interna pelo sistema Sec. As proteínas secretadas não possuem seqüência amino-terminal clivável, mas apresentam uma seqüência sinal carboxi-terminal, de aproximadamente 60 aminoácidos, que aparentemente confere especificidade para secreção através deste sistema (HUECK, 1998). É utilizado por várias bactérias Gram-negativas para secreção de toxinas, proteases e lípases (THANASSI & HULTGREN, 2000). O principal exemplo é a secreção de α -hemolisina por *Escherichia coli* (HUECK, 1998), seguido dos sistemas de leucotoxina por *Pasteurella haemolytica* e de proteases por *Pseudomonas aeruginosa* e *Erwinia chrysanthemi* (PUGSLEY, 1993; THANASSI & HULTGREN, 2000; HUECK, 1998).

Diversas bactérias Gram-negativas utilizam o Sistema de Secreção do Tipo III como um mecanismo conservado e ao mesmo tempo altamente adaptado para interagir com o hospedeiro eucariótico (HUECK, 1998; GHOSH, 2004)

1.3.1. Sistema de Secreção do Tipo III

Cerca de 25 espécies de bactérias Gram-negativas que interagem com outros organismos, tanto como patógenos quanto como simbioses e associativos, são equipadas com um aparato exportador de proteínas denominado Sistema de Secreção do Tipo III (TTSS) (CORNELIS, 2006). Este sistema permite a secreção de proteínas bacterianas para o interior da célula eucariótica. No interior dessas células, as proteínas bacterianas, também chamadas de efetores, modificam sinais celulares em benefício da bactéria. Como exemplos de bactérias onde esse sistema foi encontrado, temos os patógenos animais *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* enteropatogênica e enterohemorrágica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamidia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, e *Burkholderia pseudomallei*; os fitopatógenos *Erwinia* spp., *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, e *Xanthomonas* spp.; as bactérias simbioses *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium fredii*; e os associativos como *Pseudomonas fluorescens* e *Herbaspirillum seropedicae* (PÜHLER *et al.*, 2004; HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; ALEGRIA *et al.*, 2004; DEDECEK *et al.*, 2006).

O TTSS 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 (HUECK, 1998; THANASSI & HULTGREN, 2000). Essas proteínas associam-se em uma estrutura supramolecular que lembra uma seringa com uma agulha (FIGURA 1 - direita), denominada injectiossoma (CORNELIS, 2006), sendo que o corpo da seringa está presente na membrana interna e a agulha atravessa a membrana externa, fazendo contato com a célula hospedeira (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999; BÜTTNER & BONAS, 2002).

A maioria das proteínas presentes na membrana interna apresenta alta homologia aos componentes do aparelho de biossíntese de flagelo, tanto de bactérias Gram-negativas como de Gram-positivas (HUECK, 1998). Já a proteína de membrana externa é homóloga a PulD, a proteína formadora do poro do Sistema de Secreção do Tipo I, da família das secretinas. A proteína de membrana externa é encontrada em outros sistemas de secreção, como do tipo II e IV (CHAMI *et al.*,

2005), e em fitopatógenos é denominada HrcC. Esta estrutura basal que forma a passagem pela parede celular bacteriana é constituída de dois anéis concêntricos, um localizado na membrana interna e outro na membrana externa (CORNELIS, 2006). As proteínas da estrutura basal localizadas na membrana interna pertencem às famílias YscV, YscU e YscRST (proteínas HrcV, HrcU, HrcR, HrcS e HrcT, respectivamente, em fitopatógenos). As proteínas da família YscV e YscU apresentam domínio amino-terminal hidrofóbico altamente conservado, localizado na membrana interna, e um domínio carbóxi-terminal não conservado, localizado na face citoplasmática. Este domínio citoplasmático poderia interagir com as proteínas a serem secretadas, atuando como receptores que reconhecem o sinal de secreção (GOSH, 2004). Associada à membrana interna ainda encontra-se uma ATPase, a proteína HrcN, que fornece energia para o sistema através de hidrólise de ATP. Outra atividade desenvolvida pela ATPase em alguns organismos é a separação das proteínas secretadas e chaperonas antes da translocação, processo dependente de ATP (AKEDA & GALAN, 2005). As proteínas da estrutura basal localizadas no periplasma são membros da família YscJ (HrpJ em fitopatógenos). Estas apresentam domínio carbóxi-terminal, que contém um sinal de parada de transferência e ancora este domínio na membrana interna, e um domínio amino-terminal que sofre acilação lipídica, formando uma ponte de fixação da proteína à camada lipídica da membrana externa (ALLAOUI, SANSONETTI & PARSOT, 1992).

Apesar do transporte via TTSS não apresentar intermediários periplasmáticos, o transporte pela membrana interna e externa é separado, uma vez que ocorre acúmulo de proteínas secretadas no periplasma de mutantes para a proteína HrcC em *P. syringae* (HUECK, 1998; CHARKOWISKI *et al.*, 1997).

A agulha do injectiossoma, denominada “pili Hrp” em fitopatógenos, atravessa as membranas interna e externa, fazendo contato com a membrana do hospedeiro (LI *et al.*, 2002; HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; THANASSI & HULTGREN, 2000; BÜTTNER & BONAS, 2002). Sugere-se que este pili forme um canal entre a bactéria e a célula eucariótica, permitindo a translocação de proteínas bacterianas diretamente no citoplasma do hospedeiro (LI *et al.*, 2002; HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; THANASSI & HULTGREN, 2000). A subunidade formadora do pili é uma pequena proteína em α -hélice, não conservada entre patógenos animais e vegetais (EBEL *et al.*, 1998; DELAHAY *et al.*, 1999). Essas subunidades são secretadas via TTSS e montadas na superfície da bactéria,

processo desencadeado pelo contato com as células do organismo hospedeiro (LI *et al.*, 2002). Em *Pseudomonas syringae*, a proteína HrpA foi isolada e caracterizada como formadora do “pili Hrp”. É uma proteína hidrofílica de 11kDa indispensável para a patogenicidade desta bactéria (HUECK, 1998; CORNELIS, 2006). Uma proteína similar a HrpA foi encontrada no grupamento *hrp* de *Erwinia amylovora* (HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000). O “pili Hrp” também foi encontrado em *Ralstonia solanacearum* e seu monômero formador foi denominado HrpY (HUECK, 1998). Estes pili de fitopatógenos apresentam um diâmetro menor que a agulha de patógenos animais, porém o comprimento pode atingir até 2 micrômetros (BÜTTNER & BONAS, 2002; LI *et al.*, 2002).

Embora estas proteínas estruturais do TTSS sejam conservadas, não há um consenso evidente nas proteínas secretadas. Essas proteínas secretadas via TTSS são chamadas de efetoras devido às suas 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).

Mais de 100 proteínas efetoras já foram descritas (CORNELIS, 2006), apresentando enorme variedade de tamanho, estrutura e função (HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999). Em muitos casos, os genes que as codificam localizam-se fora do “cluster *hrp*”, porém geralmente ambos parecem ser co-regulados (HUECK, 1998; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999). Estas proteínas efetoras identificadas não possuem peptídeo sinal na porção amino-terminal, e análises de mutações nesta porção revelaram um alto grau de tolerância, sem que haja interrupção de sua secreção (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999). Com isso propôs-se que a sinalização para a secreção reside na extremidade 5' do mRNA que codifica as proteínas secretadas, o qual formaria um grampo que impediria o início da tradução (ANDERSON & SCHNEEWIND, 1997; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999). Este impedimento parece ser rompido após a interação do mRNA com o maquinário de secreção, expondo assim o sítio de ligação para o ribossomo. Este processo é semelhante ao acoplamento da tradução e translocação de proteínas para o interior do retículo endoplasmático de eucariotos (HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999; THANASSI & HULTGREN, 2000).

As proteínas efetoras necessitam de pequenas proteínas, normalmente ácidas e citoplasmáticas, com função de chaperonas, que se ligam individualmente às proteínas secretadas para sua proteção contra interações prematuras com outros componentes do sistema no citoplasma bacteriano (HUECK, 1998; PARSOT, HAMIAUX & PAGE, 2003). Possuem uma especificidade de ligação relativamente baixa aos efetores, contudo podem atuar como um sinal alternativo para a secreção, pois se ligam durante a tradução e se separam para a secreção (PARSOT, HAMIAUX & PAGE, 2003; FRANCIS, WOLF-WATZ & FORSBERG, 2002). Normalmente as chaperonas são codificadas por genes próximos ao gene codificador da proteína com que elas interagem (HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000).

Sugere-se que a regulação do TTSS seja conservada entre os vários microrganismos portadores deste sistema, ocorrendo através de sinal no mRNA e nos efetores e necessidade de chaperonas (HAM et al., 1998; ANDERSON & SCHNEEWIND, 1999). A expressão das proteínas do sistema de secreção e a secreção em si dos efetores parecem ser estimuladas pelo contato entre a bactéria e seu hospedeiro (HUECK, 1998).

Na interação planta-bactéria, os efetores promovem o crescimento bacteriano no apoplasto induzindo a liberação de nutrientes pelas células vegetais, ao superarem os mecanismos de defesa do hospedeiro (NURNBERGER & BRUNNER, 2002).

1.3.1.1. Sistema de Secreção do Tipo III em fitopatógenos

A infecção de uma planta por um fitopatógeno pode desencadear uma reação de hipersensibilidade (HR) ou o desenvolvimento da doença (GOODMAN & NOVACKY, 1994).

A HR constitui um dos mecanismos primários de resistência vegetal a doenças. É caracterizada pela rápida morte celular e subsequente necrose tecidual da área infectada, ocasionada pela produção de intermediários reativos de oxigênio, alteração de fluxo de íons na membrana vegetal, oxidação das proteínas estruturais de parede celular e síntese de compostos antimicrobianos (MUDGETT & STASKAWICZ, 1998; HUECK, 1998; GOODMAN & NOVACKY, 1994). Estas

alterações fisiológicas visam evitar a disseminação do patógeno, sendo eficientes apenas em plantas resistentes (MUDGETT & STASKAWICZ, 1998).

Em plantas suscetíveis, o fitopatógeno é capaz de superar esses mecanismos de HR e de defesa basal do hospedeiro. A resposta basal é disparada no apoplasto contra qualquer organismo, patogênico ou não, onde ocorre deposição de calose, um polímero de β -1,3 glicose, e produção de compostos fenólicos e antimicrobianos (JONES E TAKEMOTO, 2004).

Desta forma, compatibilidade e incompatibilidade entre a bactéria e a planta devem ser controladas por um *cluster* de genes bacterianos (GOODMAN & NOVACKY, 1994) e seus respectivos receptores vegetais (MUDGETT & STASKAWICZ, 1998; HUECK, 1998; GOODMAN & NOVACKY, 1994). Em ambas as situações, o TTSS parece ser essencial para desencadear a resposta à interação.

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* e *pathogenicity*) (HUECK, 1998; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000). Os genes *hrp* que codificam as proteínas do TTSS estão agrupados em megaplasmídios (*Ralstonia solanacearum*) ou no genoma (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* e *Xanthomonas campestris*), nas “Ilhas de Patogenicidade” (HUECK, 1998). A transferência destes clusters para bactérias não patogênicas, como *E. coli* e *Pseudomonas fluorescens*, são suficientes para causar a HR, porém não a doença (ALFANO & COLLMER, 1997).

Estes genes *hrp* foram caracterizados independentemente em diversos fitopatógenos, levando a uma nomenclatura que difere entre as diversas espécies. Com isso, Bobdanove e colaboradores (1996) propuseram uma nomenclatura unificada, com base na homologia entre as proteínas do TTSS de patógenos animais e vegetais. Assim, nove genes deste sistema são conservados entre os quatro principais gêneros de fitopatógenos e entre os patógenos animais (TABELA 2). Para estes genes, utilizou-se a denominação *hrc* (*hrp conserved*) e a última letra conforme a homologia com as proteínas Ysc de *Yersinia* spp., que apresenta maior similaridade com as respectivas proteínas de fitopatógenos (BOGDANOVE *et al.*, 1996).

TABELA 2 – PROTEÍNAS Hrc DE FITOPATÓGENOS E SEUS CORRESPONDENTES HOMÓLOGOS EM PATÓGENOS ANIMAIS E NO SISTEMA DE BIOSÍNTESE FLAGELAR.

Fitopatógenos	<i>Yersinia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	Flagelo
HrcC	YscC	InvG	MxiD	
HrcJ	YscJ	PrgK	MxiJ	FliF
HrcN	YscN	SpaL	Spa47	FliL
HrcQ	YscQ	SpaO	Spa33	FliN, -Y
HrcR	YscR	SpaP	Spa24	FliP
HrcS	YscS	SpaQ	Spa9	FliQ
HrcT	YscT	SpaR	Spa29	FliR
HrcU	YscU	SpaS	Spa40	FliB
HrcV	YscV	InvA	MxiA	FliA

FONTE: ALFANO & COLLMER, 1997.

Além dos genes *hrp*, outra classe de genes, os genes *avr* (*avirulence*) também determinam quando a infecção bacteriana acarreta em HR ou em doença (GOODMAN & NOVACKY, 1994). A presença de pares de genes combinantes, o gene de resistência (R) no hospedeiro e o gene de avirulência (*avr*) no fitopatógeno, acarreta na resposta de hipersensibilidade. Nocautes nos genes *avr* geralmente permitem ao patógeno causar a doença em plantas anteriormente resistentes, enquanto introdução do gene R em plantas suscetíveis confere resistência ao patógeno com o gene *avr* intacto (HUECK, 1998). Assim, o gene R codificaria para um receptor para a proteína Avr do patógeno, e a interação destas proteínas desencadearia a HR (MUDGETT & STASKAWICZ, 1998; HUECK, 1998; GOODMAN & NOVACKY, 1994; MARTIN, BOGDANOVE & SESSA, 2003). Assim como os elicitores de doença nas plantas, a secreção destas proteínas Avr depende do TTSS (HUECK, 1998). Como exemplo clássico deste conceito gene-gene para direcionamento da interação planta-bactéria, têm-se o gene R de tomate (Pto) e o gene *avr* de *P. syringae* pv. tomato (AvrPto). Após translocação da proteína AvrPto via TTSS para o citoplasma da célula vegetal, a ligação de AvrPto à proteína Pto estimula sua atividade de quinase, desencadeando uma cascata de fosforilação que ativa a HR (HUECK, 1998; ABRAMOVITCH *et al.*, 2003).

Além das proteínas de avirulência, o TTSS atua na secreção de outros fatores essenciais para a patogenicidade e fatores não específicos (KIM *et al.*, 2003; HUECK, 1998; GALAN & COLLMER, 1999; CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; ALFANO & COLLMER, 1997). As proteínas “harpins” (WEI *et al.*, 1992), quando

infiltradas em folhas de algumas plantas, estimulam resposta de hipersensibilidade não específica. Essas proteínas, geralmente ácidas, estáveis ao calor, ricas em glicina e sem cisteínas, são secretadas em meios sintéticos que estimulam a expressão dos genes *hrp*. Alguns exemplos destas proteínas são HrpN de *Erwinia* spp., HrpW de *Erwinia amylovora* e *Pseudomonas syringae*, HrpZ de *Pseudomonas syringae* e PopA de *Ralstonia solanacearum* (CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000; BÜTTNER & BONAS, 2002). Pouco se conhece da atuação destas proteínas, contudo sabe-se que HrpZ de *P. syringae* liga-se à membrana plasmática da planta e forma um poro em bicamadas lipídicas artificiais, sugerindo que esta proteína forme o poro da membrana celular vegetal que permite a entrada do “pili hrp” (LEE et al., 2001; BÜTTNER & BONAS, 2002). Outro grupo de proteínas secretadas não possui a capacidade de desencadear a HR, contudo são necessárias para a virulência dos fitopatógenos em plantas suscetíveis. Como exemplos temos as proteínas DspA e DspE de *E. amylovora* e PopB e PopC de *R. solanacearum* (CORNELIS & VAN GIJSEGEM, 2000).

O sistema *hrp* injeta proteínas nas células hospedeiras sem causar nenhum processo proteolítico. As proteínas secretadas por esse sistema têm como funções regular a secreção de outras proteínas, facilitar a translocação das proteínas secretadas nas células hospedeiras e alterar diretamente as funções e estruturas das células hospedeiras, permitindo assim a colonização do hospedeiro e desenvolvimento do patógeno (LONG & STAKAWICZ, 1993; GREENBERG & VINATZER, 2003). 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).

A similaridade dos genes, estrutura dos operons e sistema de regulação permitem dividir os *clusters hrp* dos fitopatógenos em dois grupos, I e II (MUDGETT et al., 2003; BÜTTNER & BONAS, 2002; ALFANO & COLLMER, 1997). Nos fitopatógenos do grupo I, *P. syringae* e *E. amylovora*, os operons são ativados por HrpL, um membro da subfamília de fatores sigma da RNA polimerase. Esse fator sigma alternativo é transcrito em presença de HrpS, que por sua vez é transcrito em presença de HrpR, ambas proteínas ativadoras transcricionais da família NtrC. As seqüências promotoras consenso, sítios de ligação de HrpL, foram denominadas *hrp box* (FOUTS et al., 2001; MUDGETT et al., 2003; BÜTTNER & BONAS, 2002;

ALFANO & COLLMER, 1997; XIAO & HUTCHENSON, 1994; WEI & BEER, 1995; GRIM, AUFSATZ & PANOPOULOS, 1995). Um esquema dos clusters dos microrganismos deste grupo está representado na FIGURA 2.

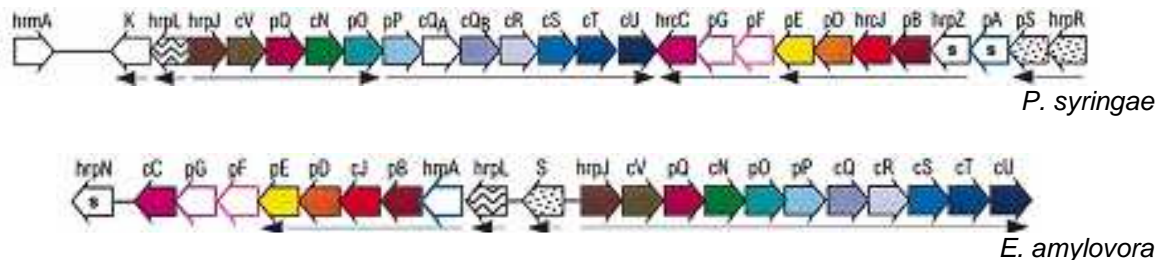


FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DO GRUPO I. FONTE: HUECK, 1998.

Nos patógenos do grupo II, *X. campestris* e *R. solanacearum*, os operons são ativados por um membro da família AraC, designado como HrpX em *X. campestris* e HrpB em *R. solanacearum*. Esses dois genes são ativados por sua vez por HrpG, que faz parte de um sistema de dois componentes, funcionando como regulador de resposta. Este sistema de regulação é encontrado em vários procariotos e possui o papel de regular a transcrição gênica em função de mudanças ambientais. Ele é composto por uma proteína sensora associada à membrana interna, que ao ser estimulada, se auto-fosforila e trans-fosforila a proteína reguladora de resposta, ativando-a (STOCK, ROBINSON & GOUDREAU, 2000). HrpX e HrpB se ligam a seqüências promotoras consenso denominadas *PIP box* (*Plant Inducible Promotor*) (GENIN *et al.*, 2005; MUDGETT *et al.*, 1998; BÜTTNER & BONAS, 2002; ALFANO & COLLMER, 1997; FURUTANI *et al.*, 2003; WENGELNIK, ACKERVEKEN & BONAS, 1996). Um esquema dos clusters dos microrganismos deste grupo está representado na FIGURA 3.

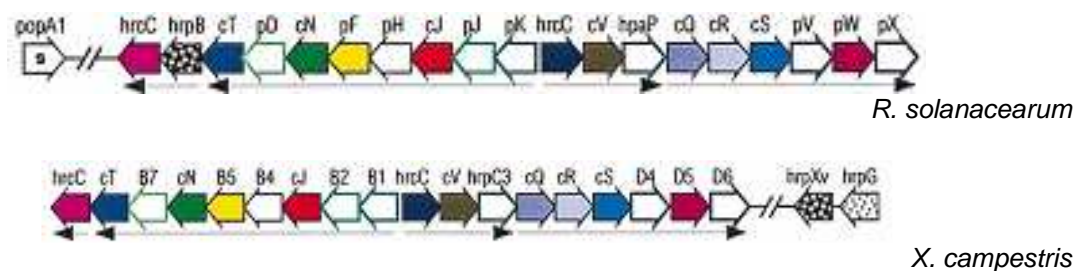


FIGURA 3 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DO GRUPO II. FONTE: HUECK, 1998.

As alterações fisiológicas e de expressão do TTSS em resposta à fatores ambientais e do hospedeiro também são observadas em outros fitopatógenos e em bactérias simbióticas (RAHME *et al.*, 1992).

1.3.1.2 Sistema de Secreção do tipo III em microrganismos simbiotes

Sob condições limitantes de nitrogênio, bactérias do solo dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* formam associações simbióticas com plantas leguminosas. Essas bactérias colonizam as plantas hospedeiras, penetrando até o córtex da raiz, onde formam nódulos. Em troca de fontes de carbono, esses microrganismos liberam para o hospedeiro formas assimiláveis de nitrogênio (VIPREY *et al.*, 1998).

Além dos genes responsáveis pela fixação do nitrogênio (*nif*) e pela formação do nódulo (*nod*), verificou-se em *Rhizobium* sp. NGR234 a presença de um *cluster* de genes homólogos aos genes *hrp* (FIGURA 4) no plasmídeo pNGR234a. O TTSS codificado por estes genes pode influenciar a eficiência da simbiose, assim como no espectro de possíveis hospedeiros (FREIBERG *et al.*, 1997).



FIGURA 4 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *Rhizobium* sp. FONTE: HUECK, 1998.

Os genes componentes do TTSS em rizóbios são induzíveis por flavonóides. Um dos resultados desta indução é a secreção de proteínas efetoras denominadas Nops (*Nodulation Out Proteins*) (VIPREY *et al.*, 1998). A expressão dos genes *hrp* e dos genes codificadores destes efetores é dependente de duas proteínas, NodD1 e TtsI. Na presença de flavonóides específicos, NodD1 é transcrito e pode se ligar a motivos específicos de DNA denominados *nod box* (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Um desses motivos é encontrado a jusante de *ttsI*, que é então transcrito. A proteína TtsI parece ser o ativador transcricional dos genes envolvidos na secreção de Nops, através da ligação em um motivo específico de DNA denominado *tts box* (MARIE *et al.*, 2004; KRAUSE, DOERFEL & GOTTFERT, 2002).

1.4. *HERBASPIRILLUM* SPP.

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

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

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

Apesar de ser reconhecido como organismo endofítico, algumas espécies de *Herbaspirillum* podem causar sintomas de doenças em cultivares de sorgo e cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1996; OLIVARES *et al.*, 1996). Isto sugere que existe uma linha tênue definindo se um microrganismo é endofítico ou agente fitopatogênico (PATRIQUIN *et al.*, 1983; DJORDJEVIC *et al.*, 1987; MISAGHI & DONDELINGER, 1990; KLOEPPER *et al.*, 1992).

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

1.4.1. *Herbaspirillum seropedicae*

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

Gyaneshwar e colaboradores (2002) demonstraram que a colonização de *H. seropedicae* em variedades de arroz tolerante a alumínio aumentou significativamente o crescimento vegetal e o acúmulo de nitrogênio. Baldani e colaboradores (2000) inocularam diferentes estirpes desta bactéria em sementes de arroz e observaram aumento de 34 a 120 % do nitrogênio total acumulado pela planta. O uso de estirpes de *H. seropedicae* imuno-marcadas e com genes repórter revelou que este expressa os genes *nif* ao colonizar raízes e partes aéreas de arroz (JAMES et al., 2002; RONCATO-MACARI et al., 2003), indicando que este endófito é capaz de fixar nitrogênio *in planta*.

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

Ao contrário dos organismos diazotróficos que habitam a rizosfera e que necessitam competir com a microflora do solo por fontes de carbono, os organismos diazotróficos endofíticos, como *H. seropedicae*, podem ser encontrados no interior dos tecidos das plantas, ambientes mais uniformes e protegidos. Isto pode explicar a alta contribuição da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar e arroz associada a *H. seropedicae* (URQUIAGA et al., 1992; BALDANI et al., 1996).

A associação *H. seropedicae* - gramínea em geral não causa prejuízos às plantas hospedeiras; pelo contrário, promove o crescimento vegetal e aumento da produtividade pela secreção de fitohormônios e fornecimento de nitrogênio fixado, além de controle de patógenos e repressão de doenças por indução de resistência sistêmica e localizada e antagonismo (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; JAMES &

OLIVARES, 1998; KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992; BALDANI *et al.*, 1993; WELLER, 1988).

Genes potencialmente envolvidos na interação planta-*H. seropedicae* foram identificados no banco dados do projeto de seqüenciamento genômico de *H. seropedicae* (Projeto GENOPAR <www.genopar.org>). Até o presente momento, foram encontrados genes envolvidos na biossíntese de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos, ácido indolacético e giberilinas, genes relacionados a processos fitopatológicos e genes homólogos aos de nodulação.

No seqüenciamento genômico de *H. seropedicae* foi encontrado um *cluster* de aproximadamente 28Kbp contendo 14 genes *hrp* e *hrc*, dois genes similares aos genes *pil* (da biossíntese flagelar), e 15 *orfs* hipotéticas conservadas (FIGURA 5). Foi também encontrado um gene similar a *hrpG* fora do *cluster*, que codifica para um provável regulador transcricional. A análise da seqüência deste *cluster* revela um conteúdo G+C de aproximadamente 65, semelhante ao resto do genoma, e ausência de elementos de transposição. Da mesma forma, a preferência do uso de códon desta região não difere do restante do genoma. Estas características não desclassificam necessariamente esta região como uma ilha genômica, mas sim pode indicar uma aquisição por transferência horizontal mais longínqua (DEDECEK, 2007).



FIGURA 5 – ORGANIZAÇÃO DOS GENES *hrp/hrc* DE *H. seropedicae*. FONTE: o autor (2007)
NOTA: modificado de DEDECEK *et al.*, 2007.

A análise dos produtos do *cluster hrp* de *H. seropedicae* mostrou uma maior similaridade com os encontrados em fitopatógenos. Não foram identificadas, contudo, as proteínas formadoras do *pili hrp* nem proteínas secretadas por este sistema (DEDECEK *et al.*, 2007).

H. seropedicae possui dois genes *hrp* que codificam para possíveis reguladores de transcrição, HrpL e HrpG (DEDECEK *et al.*, 2007). Estas proteínas podem ser responsáveis pelo controle transcricional de todo o *cluster* nesta bactéria, indicando uma mistura da regulação observada para os grupos I e II do TTSS de fitopatógenos (ALFANO & COLLMER, 1996). A presença destas duas proteínas

também pode sugerir que o *cluster* tenha sido adquirido por transferência horizontal múltipla (DEDECEK *et al.*, 2007).

O seqüenciamento genômico do fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* (SALANOUBAT *et al.*, 2002), revelou um grupamento gênico, semelhante ao de *H. seropedicae*, que é absolutamente necessário para o desenvolvimento de doenças em cultivares susceptíveis ou da resposta de hiper-sensibilidade em cultivares resistentes. Estes resultados sugerem fortemente o envolvimento destes genes no estabelecimento de associação *Herbaspirillum*-planta.

1.4.2. *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Herbaspirillum rubrisubalbicans, uma espécie fitopatogênica originalmente descrita como *Pseudomonas rubrisubalbicans*, foi incluída no gênero *Herbaspirillum* com base em estudos moleculares (BALDANI *et al.*, 1996).

Esta espécie causa a doença da estria mosqueada na variedade norte-americana B-4362 de cana-de-açúcar e estrias vermelhas em variedades de sorgo. O nome da espécie deriva de *ruber*, vermelho, e *subalbicans*, esbranquiçado, uma referência ao sintoma da doença estria mosqueada (FIGURA 6), 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, devido a reação de hipersensibilidade da planta (OLIVARES *et al.*, 1997). Todavia, a bactéria supera tal mecanismo de defesa vegetal, colonizando os vasos da folha, resultando na formação de estrias vermelhas acompanhadas de clorose ao longo desta. A estria mosqueada direciona-se então para o topo da folha, à medida que a bactéria avança no interior dos vasos (JAMES *et al.*, 1997). É uma doença de pouca importância econômica, que afeta poucas variedades e não mata a planta, apenas diminui a área fotossintética e a vida útil da folha (CHRISTOPHER & EDGERTON, 1992; OLIVARES *et al.*, 1997).



FIGURA 6 – SINTOMAS TÍPICOS DA DOENÇA DA ESTRIA MOSQUEADA. Seta: ponto de inoculação; Seta larga: estrias; Asterisco: necrose tecidual. FONTE: JAMES et al., 1997.

O seqüenciamento do gene 16S rDNA (CRUZ *et al.*, 2001) e RAPD mostraram que *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* são geneticamente muito relacionados (RAMOS *et al.*, 2003). Contudo, a inoculação de *H. seropedicae* nas mesmas variedades de plantas suscetíveis a *H. rubrisubalbicans* não produz sintomas de doença ou HR (JAMES, 1997). Pelo contrário, promove o crescimento vegetal e aumento da produtividade (JAMES & OLIVARES, 1998; KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992; BALDANI *et al.*, 1993).

Um grande número 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 (FIGURA 7a). Já a interação com *H. seropedicae* parece mais harmônica (FIGURA 7b), apresentando um número controlado desta bactéria (JAMES *et al.*, 1997).

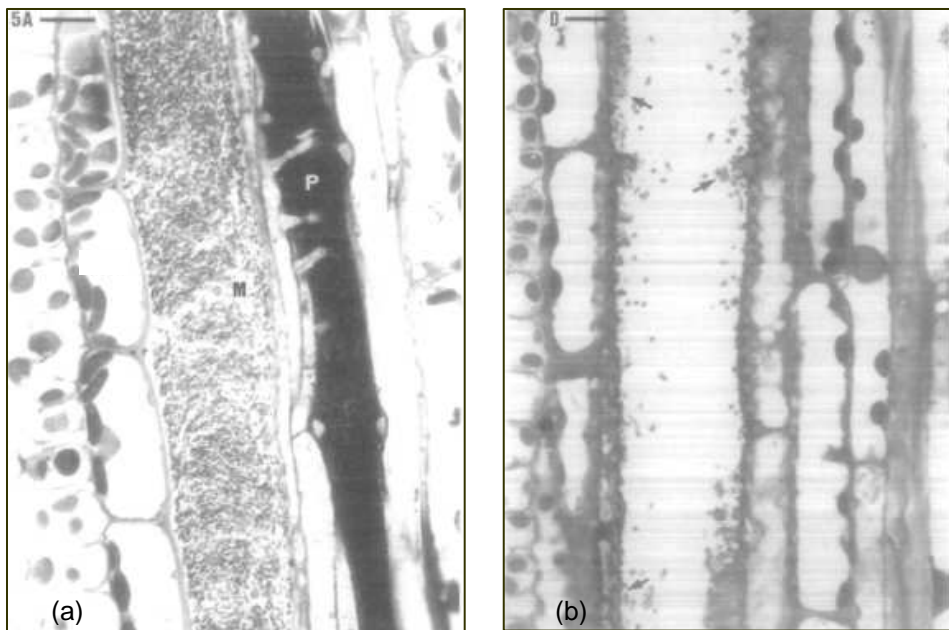


FIGURA 7 – *HERBASPIRILLUM RUBRISUBALBICANS* (a) E *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* (b) COLONIZANDO FEIXES VASCULARES DE FOLHA DE SORGO. FONTE: JAMES *et al.*, 1997.

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

Resultados preliminares obtidos por Schreiner (2007) revelaram a presença de alguns genes *hrp*, aparentemente constituindo um *cluster*. Os produtos de tais genes revelaram-se proteínas estruturais do TTSS, sugerindo o envolvimento deste na patogenicidade da bactéria. Esses genes revelaram alta homologia com os genes *hrp* de *H. seropedicae* (SCHREINER, 2007).

Desta forma, apesar do oposto comportamento ecológico, a íntima relação genética apresentada entre o fitopatógeno *H. rubrisubalbicans* e o diazotrófico endofítico *H. seropedicae* permite um modelo de estudo ideal para a determinação dos fatores genéticos participantes da interação planta-bactéria.

1.5. COMPARAÇÃO GENÔMICA

O controle da colonização da planta por bactérias endofíticas provavelmente envolve a interação molecular de produtos gênicos de origem vegetal e bacteriana. Portanto, a identificação e análise dos genes envolvidos na colonização de diazotrofos endofíticos em plantas de interesse econômico são importantes para melhorar a utilização e aplicação da fixação biológica de nitrogênio nestas culturas.

Os genes *hrp/hrc* parecem ser necessários para fenômenos aparentemente distintos como patogenicidade e interação simbiótica. Dedecek (2007) descreveu que estes mesmos genes podem estar envolvidos na interação endofítica, sugerindo que o ajuste fino de uma mesma maquinaria bioquímica pode levar a efeitos bastante distintos. Assim, a comparação da estrutura e atividade destes genes e seus produtos em duas espécies extremamente relacionadas como *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* permite um melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade vegetal, simbiose e associação endofítica.

O uso deste conhecimento permitirá o desenvolvimento de microrganismos endofíticos altamente eficientes para utilização em sistemas de produção agrícola.

2. OBJETIVOS

Considerando a presença dos genes *hrp/hrc* em *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, e a importância destes na interação de outras bactérias Gram-negativas com seus hospedeiros, este trabalho tem como objetivos:

- ✓ identificar e seqüenciar o *cluster hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* M1
- ✓ comparar com o *cluster hrp/hrc* de *H. seropedicae* através de *Southern Blot*
- ✓ construir estirpes mutantes dos genes *hrp/hrc* de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe M1.

Visando identificar outras diferenças gênicas entre *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, uma biblioteca subtrativa, contendo segmentos de DNA de *H. rubrisubalbicans* ausentes em *H. seropedicae*, foi seqüenciada e analisada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. BACTÉRIAS

As estirpes bacterianas utilizadas estão listados nas tabelas 3, 4 e 5.

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* UTILIZADAS.

<i>Escherichia coli</i>		
Estirpe	Características	Referência
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mcrR</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 deoR recA1 endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL nupG</i> λ	INVITROGEN

TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE *HERBASPIRILLUM RUBRISUBALBICANS* UTILIZADAS.

<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>		
Estirpe	Características	Referência
M1	Estirpe selvagem tipo	BALDANI <i>et al.</i> , 1996
M4	Estirpe selvagem	BALDANI <i>et al.</i> , 1996
HCC103	Estirpe selvagem	BALDANI <i>et al.</i> , 1996
TS-E	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1 <i>hrpE</i> , Tc ^R ;	Este trabalho
EB-V	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1 <i>hrcV</i> , Tc ^R ;	Este trabalho

TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* UTILIZADAS.

<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
Estirpe	Características	Referência
SmR1	Estirpe tipo Z78 Sm ^R , Nif ⁺	MACHADO <i>et al.</i> , 1996
ZA95	Estirpe selvagem	BALDANI <i>et al.</i> , 1992
ZM152	Estirpe selvagem	BALDANI <i>et al.</i> , 1992
HRC54	Estirpe selvagem	BALDANI <i>et al.</i> , 1992

3.2. PLASMÍDEOS

Os plasmídeos utilizados estão listados na tabela 6.

TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS UTILIZADOS.

Plasmídeos	Características	Referência/Origem
pUC18/19	Amp ^R ; <i>lacZ</i> , <i>lacI</i>	INVITROGEN
pMH1701	Tc ^R ; Km ^R ; cassete <i>nptI-sacB-sacR</i>	HYNES <i>et al.</i> , 1989
HR03-FP-00-000-025.H02	pUC19 contendo o gene <i>rmIB</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> no sítio de policlonagem, Amp ^R	GENOPAR – Biblioteca Genômica
HR03-MF-00-000-049.A08	pUC19 contendo o gene <i>hrcV</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> no sítio de policlonagem, Amp ^R	GENOPAR – Biblioteca Genômica
pHR <i>hrcVsacB</i>	pUC19 contendo o gene <i>hrcV</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> no sítio de policlonagem e o inserto <i>nptI-sacB-sacR</i> no sítio <i>BamHI</i> , Km ^R , Amp ^R	Este trabalho
pHR <i>hrcV</i>	pUC19 contendo o gene <i>hrcV</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> no sítio de policlonagem com inserção do transposon EZ::Tn5 TM <TET1>, e o inserto <i>nptI-sacB-sacR</i> no sítio <i>BamHI</i> , Km ^R , Amp ^R	Este trabalho
HR02-MF-00-000-057.H09.TET	pUC19 contendo o gene <i>hrpE</i> de <i>H. rubrisubalbicans</i> no sítio de policlonagem, com inserção do transposon EZ::Tn5 TM <TET1>, Amp ^R , Tc ^R	SCHREINER, 2007
pVBLUE- <i>hrcC</i>	pETBlue-2 contendo o gene <i>hrcC</i> de <i>H. seropedicae</i> no sítio de policlonagem, Km ^R , Amp ^R	SILVA, não publicado
pETHrpLNAT	pET28a contendo o gene <i>hrpL</i> de <i>H. seropedicae</i> no sítio de policlonagem, Km ^R , Amp ^R	SOUZA <i>et al.</i> , não publicado
pVPET- <i>hrpG</i>	pET28a contendo o gene <i>hrpG</i> de <i>H. seropedicae</i> no sítio de policlonagem, Km ^R , Amp ^R	SILVA, não publicado

3.3. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHP-malato líquido (KLASSEN *et al.*, 1997), a 30° C, sob agitação a 130 rpm, por 24 horas. A composição do meio NFb malato segue abaixo:

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

No momento do inóculo foram adicionados 50 mmol/L de solução de fosfatos (K₂HPO₄ 17,8 g/L; KH₂PO₄ 159,5 g/L), e 20mmol/L de cloreto de amônio. Os meios NFbHP sólido e semi-sólido possuem ágar (15g/L e 1,75 g/L, respectivamente). O meio utilizado para o cultivo de *E. coli* foi o Luria-Broth (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989), ou Terrific Broth (TB) (SAMBROOK *et al.*, 1989), sob agitação a 120 rpm, à 37° C. O meio LB é composto por:

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

O meio LA, que é utilizado para o cultivo de *E. coli* em meio sólido, é composto pelo meio LB acrescido de 15 g/L de ágar. O meio TB é composto por:

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

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

3.3.1. Antibióticos

Os antibióticos foram utilizados nas seguintes concentrações:

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

TABELA 7 - ANTIBIÓTICOS

As soluções estoques de antibióticos, exceto tetraciclina, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 0,45µm). A solução estoque de tetraciclina foi preparada em etanol 70%. Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -20°C.

3.3.2. Estocagem das Bactérias

As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C. As estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram estocadas em meio NFb-malato semi-sólido suplementado de 20 mmol/L de NH₄Cl, a temperatura ambiente, sem agitação e devidamente lacrado com fita plástica.

Os estoques de *E. coli* são repicados uma vez ao ano, e os estoques de *Herbaspirillum* spp. a cada seis meses.

3.4. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA

3.4.1. Purificação de DNA genômico de *Herbaspirillum* spp.

A purificação do DNA total de *Herbaspirillum* spp. foi feita segundo Souza (1990). Dez mililitros de cultura de *Herbaspirillum* spp. (D.O.₆₀₀ ≅ 2,0) crescida em meio NFbHP adicionado de 20 mmol/L de NH₄Cl e dos antibióticos adequados foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos, a 4°C. As células foram lavadas com 500

μL do tampão TES (Tris-HCl pH8,0, 50 mmol/L; EDTA pH 8,0, 20 mmol/L; NaCl 200 mmol/L) e ressuspendidas em 500 μL do mesmo. A lise celular foi obtida com adição da enzima lisozima (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubação a 30°C, durante 1 hora. Para completar a lise das células, foi adicionado o detergente SDS 1% (p/v), e a mistura incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. A degradação das proteínas foi feita adicionando-se pronase (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seguida de incubação a 37°C por 16 horas. A mistura foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e duas vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após a extração, o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto, lavado com 1mL de etanol 80%, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 200 μL de água MilliQ autoclavada.

3.4.2. Purificação de DNA plasmidial

A extração dos plasmídeos das células de *E. coli* Top10 foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Depois da purificação, o plasmídeo foi analisado por eletroforese (Agarose 0,8% em TBE1X).

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

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

3.5. TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DO DNA

3.5.1. Eletroforese de DNA

As amostras de DNA submetidas a este método foram diluídas em Fsduds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75mmol/L, Ficoll ® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,025) e aplicadas em gel de agarose (0,7 a 1,2 %) ou agarose LMP (0,7%), em tampão TAE (Tris base 40mmol/L, ácido acético 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0) ou TBE (Tris base 40mmol/L, ácido bórico 40 mmol/L, EDTA 2

mmol/L, pH 8,0), em sistema horizontal da HOEFFER. A voltagem e o tempo de corrida variaram conforme a amostra.

Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados em sistema UVP (BioImagin Systems).

3.5.2. Clivagem de DNA por enzimas de restrição

A digestão de DNA foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989) e recomendação do fabricante das enzimas de restrição. A clivagem foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TBE 1X).

3.5.3. Ligação de fragmentos de DNA em vetores

O vetor linearizado e o fragmento de DNA de interesse, devidamente cortado com as enzimas de restrição adequadas, foram quantificados através de densitometria ótica em sistema UVP (BioImagin Systems) após eletroforese. Na reação de ligação, manteve-se uma proporção de 1:5 mol do vetor e DNA inserto, respectivamente. A reação de ligação foi realizada em presença de T4 DNA ligase e incubada a 16°C durante a noite. O produto da reação foi eletrotransformado em *E. coli* Top 10.

3.5.4. Reação de transposição *in vitro*

Os plasmídeos com genes de interesse foram utilizados para reação de transposição *in vitro*, segundo recomendações do fabricante do EZ:TN<TET-1> (Epicenter Laboratories). O sistema foi utilizado para a transformação bacteriana.

3.5.5. Amplificação de DNA

A amplificação de fragmentos de DNA foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), como descrito por Koshier e Wilson (1991).

Foram utilizados 10 pmol dos *primers T7 promoter* (Novagen) (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e *T7 terminator* (Novagen) (5'-CCGCTGAGCAATAACTAGC-3') nos seguintes parâmetros: 1 ciclo de 95°C por 1 min e 30 ciclos com uma etapa de 94°C por 45 seg, outra de 55°C por 45 seg e outra de 72°C por 2 min e 45 seg.

3.5.6. Seqüenciamento de DNA

Fragmentos de DNA de interesse foram seqüenciados utilizando os primers do vetor pUC19, e/ou do transposon EZ::Tn5TM <TET1>, pelo método de terminadores fluorescentes. As reações de seqüenciamento continham 200-400 ng de DNA plasmidial, 3µl de pré-mix (ET *terminator*), 5 pmol de *primer* Universal ou Reverso e água milliQ para completar o volume para 7,5µl. Como parâmetros da reação de seqüenciamento foram utilizados 1 ciclo de 95°C por 1 min e 35 ciclos com uma etapa de 94°C por 20 seg e outra de 60°C por 1 min e 30 seg.

A reação foi purificada com acetato de amônia 200 mmol/L e dois volumes de etanol absoluto, em seguida lavada com 150 µl de etanol 70% e seca a vácuo.

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

3.6. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.6.1. Preparo de células eletrocompetentes

As células de *E. coli* e de *Herbaspirillum* spp. tornaram-se eletrocompetentes através de um processo que consiste de 2 a 3 lavagens, com água estéril gelada, para retirar o sal e diminuir o metabolismo, seguidas de uma lavagem com glicerol 15%. Após estas lavagens, as células são ressuspensas em glicerol 15%.

3.6.2. Transformação bacteriana

O método utilizado para transformação bacteriana foi o descrito pelo fabricante do Cell Porator (Life Technologies). O DNA plasmidial (1µL) foi adicionado a 40µL da suspensão de células eletrocompetentes, e incubado sobre gelo por 1 minuto. Em seguida, essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um campo elétrico (4KΩ, 330µF para *E. coli* e 2,8KΩ, 330µF para *Herbaspirillum* spp.) para permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1mL do meio de cultura correspondente e incubadas sob agitação por 1 hora, na temperatura adequada. Em seguida, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio sólido correspondente contendo o antibiótico adequado à seleção dos transformantes de interesse.

3.7. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA DO TTSS DE *H. rubrisubalbicans*

3.7.1. Identificação de seqüências de DNA do TTSS de *H. rubrisubalbicans*

Primeiramente, foi criado um banco de dados com todas as seqüências dos genes *hrp/hrc* disponíveis no GenBank até o presente momento. As seqüências deste banco de dados foram então comparadas com todas as seqüências do projeto genoma de *H. rubrisubalbicans* (Projeto GENOPAR), através do programa BLASTx (YE, McGINNIS & MADDEN, 2006; ALTSCHUL *et al.*, 1990). Esta comparação gerou uma lista de seqüências desta bactéria que apresentam homologia (com valor esperado $< e^{-5}$) com genes do Sistema de Secreção do Tipo III.

3.7.2. Análise de seqüências de DNA do TTSS de *H. rubrisubalbicans*

A esta lista de seqüências foram adicionadas as seqüências obtidas por Schreiner (2007), através de reações de transposição de clones com os genes *hrp* de *H. rubrisubalbicans* e subsequente seqüenciamento das regiões vizinhas à inserção.

Os eletroforetogramas correspondentes às seqüências selecionadas foram processados pelo programa PHRED (EWING *et al.*, 1998a; EWING *et al.*, 1998b). Este programa faz a identificação das bases nucleotídicas considerando a intensidade do sinal, espaçamento entre picos e o espectro de emissão de cada fluoróforo, além de atribuir um valor de qualidade para cada base da seqüência. Em seguida, estas seqüências de bases foram alinhadas com um banco de seqüências de vetores, através do programa Cross_Match (desenvolvido por Phil Green). Estes programas mascaram seqüências do vetor presentes nas seqüências de interesse, substituindo o nucleotídeo pela letra X. As seqüências filtradas pelo programa Cross_Match foram utilizadas para a montagem das seqüências consenso, pelo programa CAP3.

O programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999) realiza a montagem das seqüências em *contigs*. A montagem das seqüências nas direções 5' e 3' sobrepostas utiliza os valores de qualidade produzidos pelo programa PHRED (EWING *et al.*, 1998a; EWING *et al.*, 1998b) para a construção do alinhamento das seqüências e para a criação da seqüência consenso. Essa montagem apresenta três fases. Na primeira, as regiões das leituras nas direções 5' e 3' de baixa qualidade

são identificadas e removidas, e as regiões restantes são alinhadas. Regiões de sobreposição parcial são removidas. Na segunda fase, as seqüências 5' e 3' são reunidas para a formação de *contigs*, na ordem decrescente de porções sobrepostas. Na terceira fase, o alinhamento das seqüências é construído e a seqüência consenso resultante tem seu valor de qualidade computado, tanto para cada base quanto para cada *contig*. Foi escolhido o programa CAP3 para esta montagem pois produz menos erros na seqüência consenso que o programa PHRAP, o qual não descarta alinhamentos de baixa qualidade.

A montagem foi visualizada através do programa CONSED (GORDON, ABAJIAN & GREEN, 1998). Este programa também indica *contigs* fisicamente ligados, quando as seqüências 5' e 3' de um mesmo clone encontram-se em *contigs* diferentes. Os *contigs* obtidos foram analisados pelo programa BLASTx (YE, MCGINNIS & MADDEN, 2006; ALTSCHUL *et al.*, 1990), para identificar proteínas similares no GenBank. Os *contigs* que apresentaram proteínas de interesse foram analisados no programa FRAMEPLOT (ISHIKAWA & HOTTA, 1999). Este programa permite a identificação de *orfs* no DNA bacteriano. Uma vez identificada a *orf* e a seqüência protéica por ela codificada, foram produzidos alinhamentos da seqüência primária destas proteínas, com o programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994).

A seqüência de aminoácidos da proteína HrcN de *H. rubrisubalbicans* foi alinhada pelo mesmo programa às seqüências das proteínas homólogas de outros fitopatógenos. A partir deste alinhamento, foi gerada uma árvore filogenética, através do programa MEGA3 (KUMAR, TAMURA & NEI, 2004), que ilustra a evolução genômica do *cluster hrp* destas bactérias.

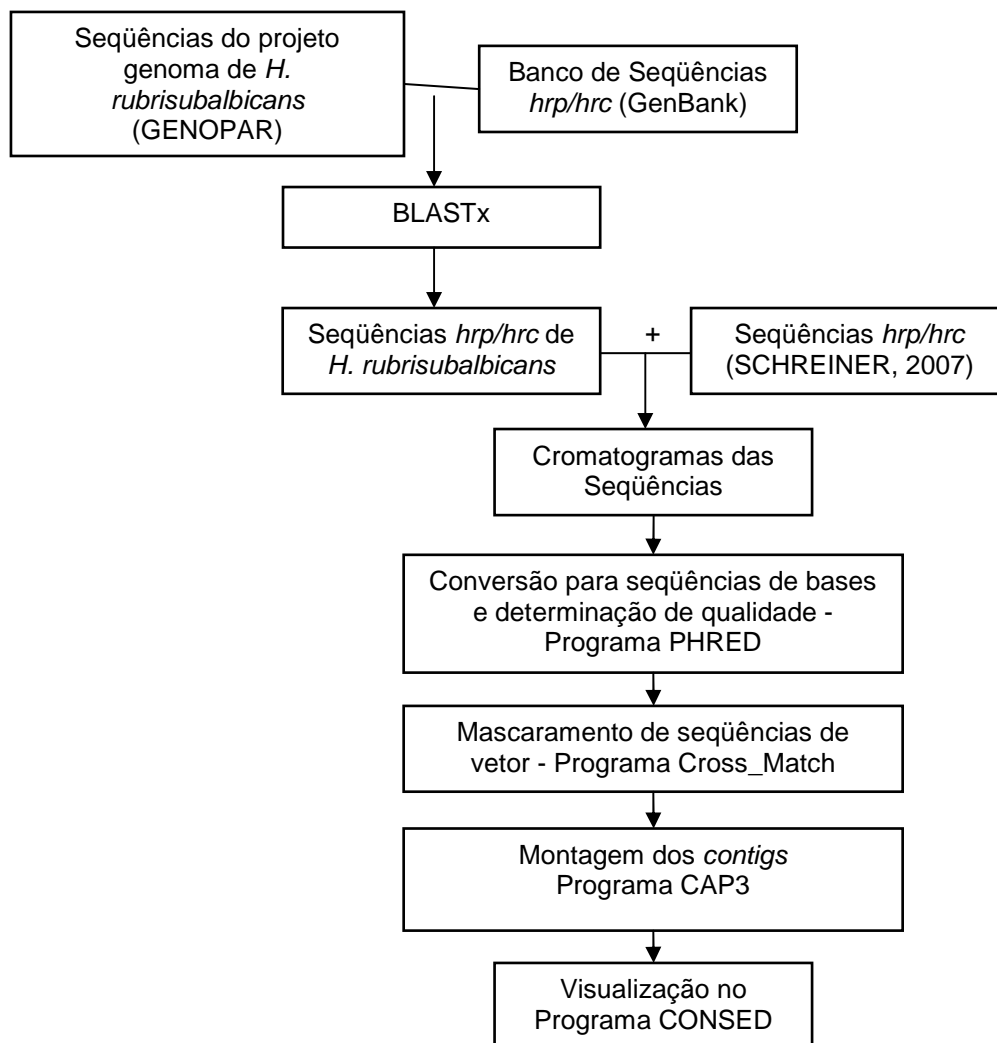


FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DA MONTAGEM DE CONTIGS UTILIZANDO O PACOTE PHRED/CAP3/CONSED. FONTE: o autor (2007)

3.8. SOUTHERN BLOT

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

O DNA genômico purificado das estirpes SmR1, ZA95, ZM152 e HRC54 de *H. seropedicae* e M1, M4 e HCC103 de *H. rubrisubalbicans* foi digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI*, *Sau3A* e *PstI*. Os fragmentos de DNA resultantes da digestão com *EcoRI* e *PstI* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1X), e os fragmentos resultantes da digestão com *Sau3A* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% (tampão TAE 1X). Esses fragmentos foram então transferidos para membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Bioscience) por capilaridade, segundo Sambrook (1989). A membrana

foi seca a temperatura ambiente, e o DNA foi fixado nesta através da exposição à luz ultravioleta (312nm) durante 3 minutos.

3.8.2. Marcação das sondas *hrcC*, *hrpG* e *hrpL* de *H. seropedicae* com fluoresceína-dUTP

Os plasmídeos pVPET-*hrpG* e pETHrpLNAT foram utilizados como molde para amplificação dos genes *hrpG* e *hrpL*, respectivamente. Os produtos das PCRs foram purificados com o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE HealthCare), e utilizados como sondas.

O plasmídeo pVBLUE-*hrcC* foi cortado com as endonucleases *EcoRI* e *XhoI*, liberando o gene *hrcC*. A restrição foi submetida à eletroforese em gel de agarose LMP e a banda de 2Kb, referente ao gene, foi purificada pelo kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (GE HealthCare), e utilizada como sonda.

A marcação das sondas com fluoróforo foi realizada com o kit “Gene Images Random Prime DNA Labeling Kit” (GE HealthCare), conforme instruções do fabricante.

3.8.3. Revelação

A detecção da hibridização foi realizada com o kit “Gene Images CDP-Star Detection Kit” (GE HealthCare), conforme instruções do fabricante. A captura e visualização da emissão da fluorescência foram realizadas no sistema UVP (BioImagin Systems).

3.9. OBTENÇÃO DO MUTANTE *hrcV* DE *H. rubrisubalbicans* M1

A estratégia utilizada para a obtenção deste mutante foi a recombinação homóloga dupla. A partir do clone HR03-MF-00-000-049.A08, foi inserido o cassete *nptI-sacB-sacR* no sítio *BamHI* do vetor e o transposon EZ::Tn5™ <TET1> no gene. Com a transformação destas construções na estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* (M1), ocorre o fenômeno de permuta, gerando estirpes com os genes nocauteados.

Os genes *sacB-sacR* permitem seleção direta da perda do plasmídeo durante a recombinação, pois apenas estirpes que não mais contém o gene *sacB* são capazes de crescer em meio contendo sacarose (HYNES et al., 1989).

3.9.1. Isolamento do cassete *nptI-sacB-sacR*

O plasmídeo pMH1701 foi digerido com a enzima *Bam*HI (Fermentas), para liberação do cassete *nptI-sacB-sacR*. Os fragmentos de 4Kb, correspondentes ao cassete, foram purificados a partir de gel de agarose LMP.

3.9.2. Inserção do cassete *nptI-sacB-sacR* no vetor dos plasmídeos selecionados

A ligação do cassete *nptI-sacB-sacR* no plasmídeo HR03-MF-00-000-049.A08 foi realizada na presença de tampão T4 DNA ligase 1x (66mmol/L Tris-HCl pH 7,6, 6,6mmol/L MgCl₂, 10mmol/L DTT, 66μmol/L ATP) e 5U de T4 DNA ligase (GE HealthCare). O sistema foi utilizado para a transformação bacteriana em *E. coli* Top 10, e os transformantes foram selecionados pela resistência a canamicina.

3.9.3. Reação de transposição *in vitro*

Os plasmídeos purificados dos transformantes que apresentaram a inserção do cassete *sacB:Km* foram utilizados para reação de transposição *in vitro*, segundo recomendações do fabricante do EZ:TN<TET-1> (Epicenter Laboratories).

O sistema foi utilizado para transformação bacteriana em *E. coli* Top 10, e os transformantes foram selecionados pela resistência à canamicina e à tetraciclina.

3.9.4. Seleção da construção com o gene nocauteado

Uma vez que a inserção do *transposon* é aleatória, os plasmídeos purificados dos transformantes que apresentaram a inserção do cassete *sacB:Km* e do *transposon* foram seqüenciados utilizando *primers* que anelam nas extremidades deste *transposon*. Desta forma, o alinhamento desta seqüência com a seqüência do plasmídeo pode informar a posição de inserção do *transposon* e permite selecionar a construção que apresente o gene nocauteado.

3.9.5. Confirmação da recombinação homóloga dupla

Como já mencionado, os genes *sacB-sacR* permitem seleção direta da perda do plasmídeo durante a recombinação, pois apenas estirpes que não mais contém o gene *sacB* são capazes de crescer em meio contendo sacarose (HYNES et al., 1989).

3.10. OBTENÇÃO DO MUTANTE *hrpE* DE *H. rubrisubalbicans* M1

A estratégia utilizada para a obtenção deste mutante foi a recombinação homóloga. O plasmídeo HR02-MF-00-000-057.H09.TET (SCHREINER, 2007), contendo o gene *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* interrompido pelo transposon EZ::Tn5TM <TET1>, foi eletrotransformado na estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* (M1), ocorrendo o fenômeno de permuta e gerando estirpes com o gene nocauteado, resistentes a tetraciclina.

3.11. SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA SUBTRATIVA

Outra metodologia adotada para diferenciar geneticamente *H. rubrisubalbicans* de *H. seropedicae* foi a construção e análise de bibliotecas subtrativas, as quais apresentam segmentos de DNA de um organismo não encontrados no outro.

Esta técnica, denominada SSH (*Suppressive Subtractive Hybridization*), é baseada em hibridizações entre os genomas digeridos das espécies de interesse, e posterior amplificação dos fragmentos não hibridizados de uma das espécies, cujo DNA é previamente ligado a um adaptador. Desta forma, estes fragmentos genômicos, presentes em apenas uma das espécies, podem ser clonados, seqüenciados e analisados.

Os fragmentos genômicos da biblioteca analisada neste trabalho são referentes a seqüências encontradas no genoma de *H. rubrisubalbicans* M1 e ausentes em *H. seropedicae* SmR1.

3.11.1. Construção da biblioteca

A biblioteca analisada neste trabalho foi construída por Rose Adele Monteiro, utilizando o kit PCR-SelectTM Bacterial Genome Substraction Kit (Clontech), conforme instruções do fabricante.

3.11.2. Seqüenciamento e análise da biblioteca

Os clones da biblioteca em questão tiveram seu DNA plasmidial purificado e seqüenciado. 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 da função destas regiões. Estas seqüências também foram comparadas através do mesmo programa com as seqüências do genoma de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* (GENOPAR), para confirmar sua especificidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS DE DNA DO TTSS DE *H. rubrisubalbicans*

A comparação das seqüências do banco de dados construído com todas as seqüências *hrp/hrc* disponíveis no GenBank (4.200 diferentes seqüências) com todas as seqüências do projeto genoma de *H. rubrisubalbicans* (14.149 diferentes leituras) revelou a presença de 799 seqüências desta bactéria com similaridade com genes do TTSS.

Estas seqüências, juntamente com 37 seqüências obtidas por Schreiner (2007), foram utilizadas para a montagem de *contigs* com o programa CAP3 (HUANG & MADAN, 1999). Esta estratégia resultou na montagem de 247 *contigs*, de tamanho médio de 1007 bases e erro provável médio de 95,69bp em 10kb.

As seqüências consenso dos *contigs* foram analisadas utilizando o programa BLASTx (YE, MCGINNIS & MADDEN, 2006; ALTSCHUL *et al.*, 1990), para busca de produtos gênicos similares e identificação da função destas regiões. Desta forma, foram selecionados 35 *contigs*, os quais apresentaram genes homólogos aos genes *hrp/hrc*, assim como prováveis genes codificadores de proteínas secretadas.

Esta análise revelou resultados semelhantes aos encontrados por Schreiner (2007), que acusou a presença dos genes *pilN*, *pilO*, *hrcC*, *hrpE*, *hrcJ*, *hrcU*, *hrpX*, *hrpQ*, *hrcN* e *hrcV*. Além destes, foi identificado o gene *hrpR*, todos codificadores de proteínas estruturais do Sistema de Secreção do Tipo III.

A proteína HrcC é responsável pela formação do complexo multimérico em forma de anel na membrana externa (DENG & HUANG, 1999). A proteína HrpE forma um canal interno ao TTSS que permite sua própria passagem, da HrpF e outras proteínas acessórias (HU *et al.*, 2001; WEBER & KOEBNIK, 2005). HrcJ forma a estrutura central do sistema no periplasma (DENG & HUANG, 1999). HrcU, HrcV, HrpX e HrpQ compõe a estrutura basal do sistema (HUECK, 1998). HrcU atua no controle da secreção de efetores (ALLAOUI *et al.*, 1994). HrpX atua na montagem do *pili hrp* (VAN GIJSEGEM *et al.*, 2002). HrcV interage com chaperonas e facilita a entrada de efetores no TTSS (ALEGRIA *et al.*, 2004). HrcN é a ATPase do sistema, responsável pela transdução de energia através da hidrólise de ATP e pela separação da proteína efetora e chaperona (AKEDA & GALAN, 2005). HrpO

provavelmente atua na montagem do *pili hrp* (HE *et al.*, 1998). HrpR, outra proteína localizada na membrana interna, provavelmente participa da exportação do *pili hrp* (HUECK, 1998; ALFANO & COLLMER, 1997). A disposição destes genes (FIGURA 9), de acordo com a ligação entre os respectivos *contigs* indicada no programa CONSED (GORDON, ABAJIAN & GREEN, 1998), também é similar a organização encontrada por Schneider e colaboradores (2007).

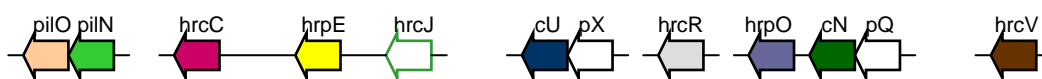


FIGURA 9 – ORGANIZAÇÃO DO CLUSTER *hrp/hrc* DE *H. rubrisubalbicans*.

Além destes genes codificantes para proteínas estruturais, foram identificados alguns genes que codificam proteínas possivelmente secretadas via TTSS: HpaB, Hpa4, HopI, AvrE, e GALA. Embora as proteínas estruturais do TTSS sejam conservadas, não há um consenso evidente nas proteínas secretadas. Estas 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 similaridade observada das proteínas secretadas identificadas com outros organismos (TABELA 8) é relativamente baixa, mas suficiente para inferir suas funções.

TABELA 8 – SIMILARIDADE ENTRE OS PRODUTOS DOS GENES CODIFICANTES PARA PROTEÍNAS SECRETADAS VIA TTSS DE *H. rubrisubalbicans* E DE OUTRAS BACTÉRIAS.

Microrganismo	Proteínas similares às de <i>H. rubrisubalbicans</i> (identidade; tamanho aa)				
	HpaB	Hpa4	HopI	AvrE	GALA
<i>Pseudomonas</i> spp.	ShcM – 32% (137)	-	HopI - 31% (139)	AvrE - 35% (65)	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	HpaB - 30% (95)	Hpa4 - 31% (315)	-	-	-
<i>Burkholderia</i> spp.	HpaB - 29% (135)	-	-	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	HpaB - 26% (136)	-	-	-	GALA - 32% (415)

NOTA: Resultados obtidos utilizando o programa BLASTx em *default*.

As proteínas Hop (*Hrp out proteins*) são moléculas secretadas ou translocadas pelo TTSS, e podem ser divididas em efetoras e acessórias. A função destas proteínas Hop acessórias consiste na translocação dos efetores através das barreiras impostas pelo hospedeiro (COLLMER *et al.*, 2002). São exemplos as proteínas formadoras do *pili hrp* (HrpA), chaperonas e as proteínas de ancoragem à parede celular vegetal (HrpW) e formadora do poro na membrana vegetal (HrpZ) (COLLMER *et al.*, 2002). A proteína Hrp11, identificada em *H. rubrisubalbicans*, apresenta um domínio da família DnaJ, caracterizando-a como uma provável chaperona (GREENBERG & VINATZER, 2003)

As proteínas Hpa (*Hrp associated*) também apresentam funções de chaperonas nos organismos em que foram descritas (ZENG *et al.*, 2007; BÜTTNER *et al.*, 2004; SUGIO, YANG & WHITE, 2005). Em *Xanthomonas* spp., HpaB é essencial no controle da secreção via TTSS, promovendo a secreção de vários efetores e prevenindo a secreção de não-efetores na célula vegetal (BÜTTNER *et al.*, 2004). Além disso, seu nocaute acarreta no não desenvolvimento de doenças em plantas suscetíveis (ZENG *et al.*, 2007). Já mutações em Hpa4 não afetaram a virulência (SUGIO, YANG & WHITE, 2005).

A família de efetores AvrE é conservada em várias fitopatógenos e rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PRESTON *et al.*, 2001). Os membros desta família incluem AvrE1 de *Pseudomonas syringae* (ALFANO *et al.*, 2000), RopE de *Pseudomonas fluorescens* (PRESTON *et al.*, 2001), DspE_{PaG} de *Pantoea agglomerans* (HAM *et al.*, 2006), DspE_E de *Erwinia* spp. (HOLEVA *et al.*, 2004) e WtsE de *Pantoea stewartii* (HAM *et al.*, 2006). Nos organismos fitopatogênicos, o nocaute dos genes codificantes para AvrE e homólogos elimina ou diminui drasticamente a virulência (BADEL *et al.*, 2006; BOGDANOVA *et al.*, 1998; GAUDRIAULT *et al.*, 1997; LORANG *et al.*, 1995; MOR *et al.*, 2001; HAM *et al.*, 2006). Estes resultados demonstram que esta família de efetores constitui um grupo chave para a patogenicidade de vários fitopatógenos.

As proteínas GALA (seqüências conservadas de GAXALA) de *Ralstonia solanacearum* apresentam homologia com proteínas vegetais ricas em repetições de leucina (LLR). Essas proteínas possuem um domínio F-box, presente em eucariotos e responsável pelo controle da ubiquitinação (ANGOT *et al.*, 2006). Efetores bacterianos que interferem com o sistema ubiquitina/proteossomo foram identificados em *Pseudomonas syringae* (AvrPtoB, U-box typeE3-ubiquitina ligase)

(ABRAMOVITCH et al., 2006), revelando que estes efetores podem mimetizar enzimas do hospedeiro, participantes da regulação de processos celulares vitais. O domínio F-box das proteínas GALA é um adaptador essencial para a ligação do sistema ubiquitina/proteossomo ao substrato a ser degradado. Sugere-se que estas proteínas atuem na degradação de moléculas da defesa basal do hospedeiro, ampliando a capacidade de colonização do fitopatógeno a vários hospedeiros (ANGOT et al., 2006).

As seqüências das proteínas homólogas às proteínas secretadas identificadas foram alinhadas com as de *H. rubrisubalbicans*, utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). O alinhamento foi realizado com a seqüência parcial de aminoácidos para os genes incompletos hpa4 (APÊNDICE I), hop11 (APÊNDICE II), avrE (APÊNDICE III) e GALA (APÊNDICE IV) e com a seqüência completa para o gene hpaB (APÊNDICE V).

A presença dos genes codificantes para proteínas estruturais e efetoras do TTSS em *H. rubrisubalbicans* sugere que este sistema pode ser responsável pelo desenvolvimento da doença estria mosqueada em variedades suscetíveis de cana-de-açúcar e resposta de hipersensibilidade em variedades resistentes.

4.1.1. Comparação do *cluster hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* e outros fitopatógenos

O agrupamento *hrp/hrc* de *Pseudomonas syringae* compreende 28 genes em uma região de aproximadamente 24Kb. Os genes codificadores do TTSS são organizados em quatro unidades transcricionais (CHARKOWSKI, HUANG & COLLMER, 1997): *hrpJcVpQcNpO* (LIDELL & HUTCHESON, 1994); *hrpPcQ_{AB}RSTU* (LIDELL & HUTCHESON, 1994); *hrpFGcCpTV* (HUANG et al., 1992) e *hrpAZBcJpDE* (HUANG et al., 1995). O TTSS de *Erwinia amylovora* compreende uma região de 25Kb contendo 22 genes organizados em três operons: *hrpJ-hrcU* (BOGDANOVE et al., 1996); *hrpA-hrpE* e *hrpF-hrpV* (KIM, WEI & BEER, 1997). A proteína secretada HrpN é codificada por um operon diferente ao final do *cluster*. A regulação da expressão destes *clusters* depende das proteínas HrpS e HrpR, que ativam a transcrição de *hrpL*. A proteína HrpL, um fator sigma alternativo, liga-se a seqüências específicas de DNA, denominadas *hrp box*, ativando a transcrição dos genes *hrp*.

Em *Ralstonia solanacearum*, os genes *hrp/hrc* estão localizados em um megaplasmídeo, e compreendem uma região de 20 Kb com 18 genes. Estes estão

organizados em quatro unidades transcricionais: *hrpBA*, *hrpK-hrpC*, *hrpNO-hrpP* e *hrpQ-X* (ARLAT *et al.*, 1992). Estes genes são necessários para a secreção da proteína PopA1, a qual promove resposta hipersensitiva (ARLAT *et al.*, 1992). Em *Xanthomonas campestris*, o *cluster hrp/hrc* compreende uma região de aproximadamente 25Kb com 18 genes. Estes estão organizados em quatro unidades transcricionais: *hrpC*, *hrpB-hrpT*, *hrcC-hrpC3* e *hrpQ-D6* (ALEGRIA, 2004). O gene *hrpB* (ou *hrpX* em *X. campestris*) codifica um regulador transcricional global dos genes *hrp* (GENIN *et al.*, 1992), e é ativado por HrpG, parte de um sistema de dois componentes.

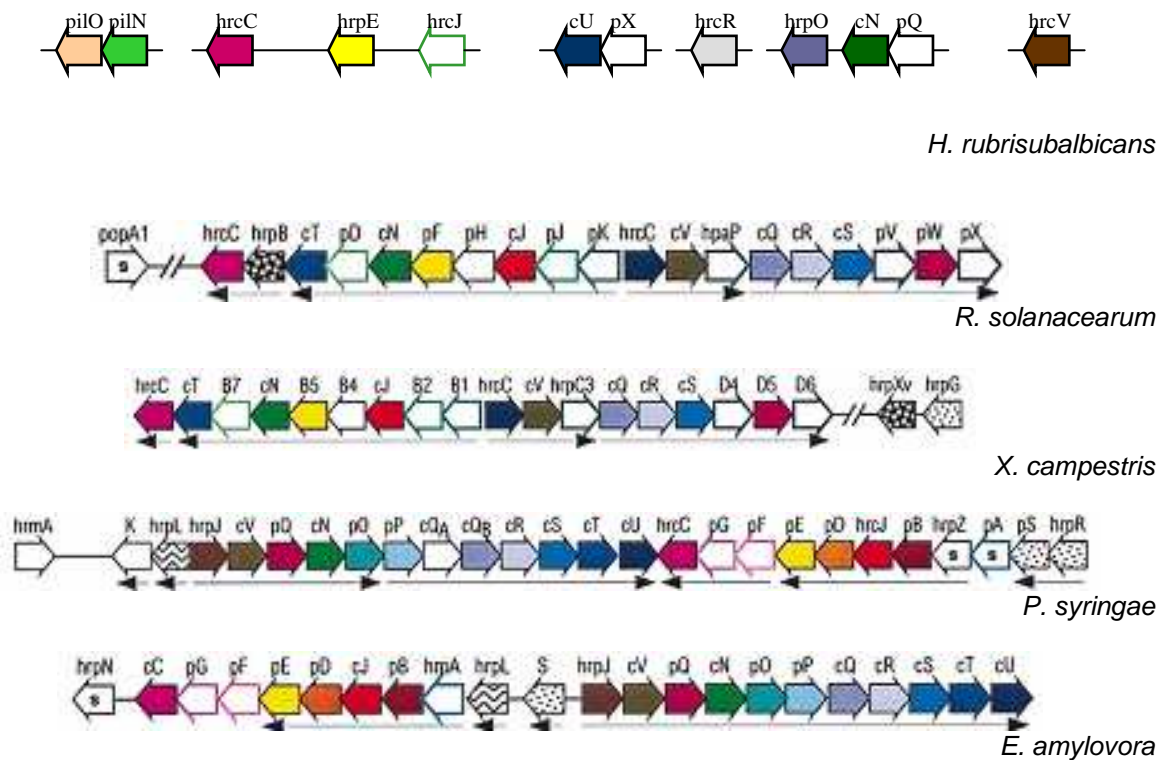


FIGURA 10 – COMPARAÇÃO DO CLUSTER *hrp/hrc* DE FITOPATÓGENOS. FONTE: HUECK, 1998.

A comparação do *cluster hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* e de outras bactérias fitopatogênicas (FIGURA 10) mostra que a organização destes genes não é conservada nos genomas destas bactérias. Entretanto, a organização gênica de *P. syringae* é similar a de *H. rubrisubalbicans*. A seqüência de genes *hrp/hrc* é diferente entre os outros fitopatógenos, sugerindo que as unidades transcricionais também não são conservadas. Ao contrário de *H. rubrisubalbicans*, nenhum dos organismos descritos apresenta genes codificantes para o sistema de secreção do tipo IV (genes

pil) no *cluster hrp/hrc*. A regulação deste *cluster* de *H. rubrisubalbicans* ainda não é conhecida, uma vez que não foram identificados *in silico* os genes responsáveis.

4.1.2. Comparação do *cluster hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* e de *H. seropedicae*

A comparação do *cluster hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* e de *H. seropedicae* (FIGURA 11) mostra que a organização destes genes é bastante similar.

O *cluster hrp/hrc* de *H. seropedicae* compreende uma região de aproximadamente 28Kb e apresenta 31 *orfs*. Quatorze destas codificam para proteínas que compõem o TTSS (*hrp/hrc*); duas possuem homologia com genes codificadores de componentes do Sistema de Secreção do Tipo IV (*pilN* e *pilO*); e as outras quinze são *orfs* consideradas hipotéticas. Uma *orf* homóloga ao gene *hrpG*, cujo produto é um provável regulador da expressão dos genes deste *cluster*, foi encontrado fora do mesmo (DEDECEK, 2006), assim como o gene *hrpL*, que codifica uma subunidade sigma da RNA polimerase. Desta forma, a regulação da expressão destes genes parece ocorrer em dois estágios.

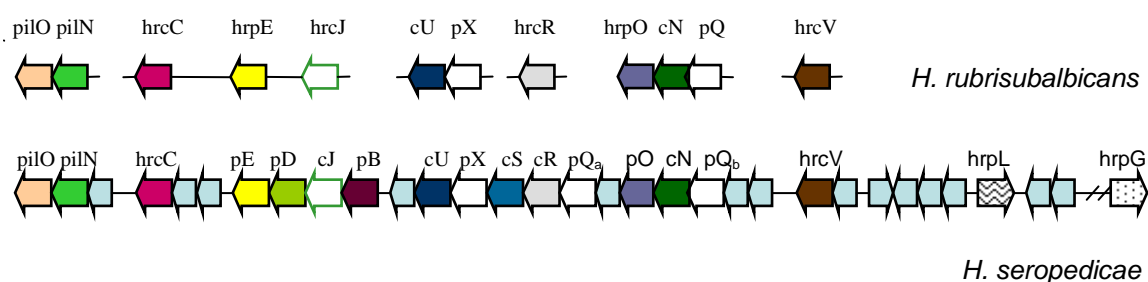


FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DO CLUSTER *hrp/hrc* DE *H. rubrisubalbicans* E DE *H. seropedicae*. FONTE: DEDECEK, 2006.

Schreiner (2007) mostrou que a similaridade entre os aminoácidos das proteínas do TTSS de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* é superior a 60%. Esta aparente conservação da estrutura gênica do *cluster hrp/hrc* destes organismos foi utilizada para definir a seqüência desse *cluster* em *H. rubrisubalbicans*. Para isto, a seqüência do *cluster hrp/hrc* de *H. seropedicae* foi comparada com as seqüências dos *contigs hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans*, através do programa tBLASTx (YE, MCGINNIS & MADDEN, 2006; ALTSCHUL *et al.*, 1990). Desta forma, a seqüência *hrp* de *H. seropedicae* foi utilizada como base para organização da seqüência dos *contigs* de *H. rubrisubalbicans* (FIGURA 12). O resultado desta comparação,

juntamente com os resultados da análise no programa CONSED (GORDON, ABAJIAN & GREEN, 1998), foram utilizados para a construção de pares de *primers*, visando amplificar e seqüenciar as regiões entre *contigs*.

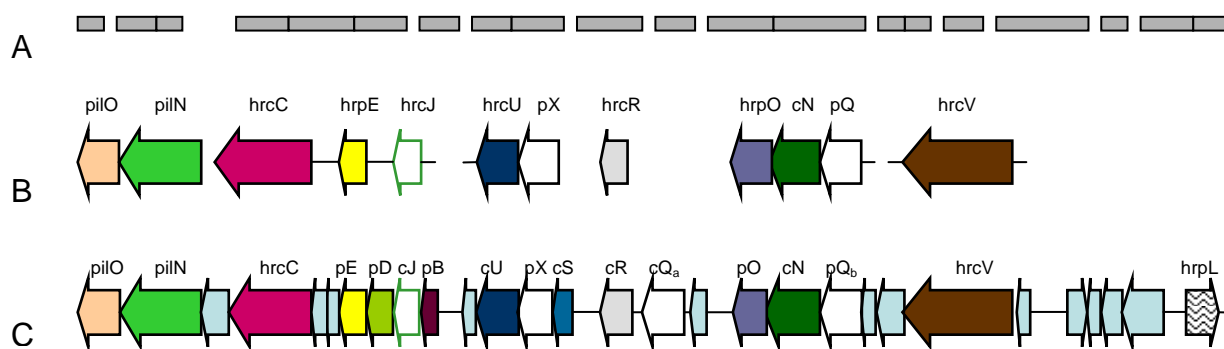


FIGURA 12 – MONTAGEM DO *cluster hrp/hrc* DE *H. rubrisubalbicans* BASEADA NA SEQÜÊNCIA DE *H. seropedicae*. A: disposição dos *contigs* obtidos de *H. rubrisubalbicans*, com base na análise do programa CONSED e na comparação com a seqüência de *H. seropedicae*. B: *cluster hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans*. C: *cluster hrp/hrc* de *H. seropedicae*. NOTA: escala 0,6cm=1Kb.

Apesar da semelhante organização gênica, em *H. seropedicae* não foram identificados genes codificantes para proteínas secretadas via TTSS. A presença destes em *H. rubrisubalbicans* sugere sua participação no caráter fitopatogênico desta bactéria.

Em *H. rubrisubalbicans*, não foram identificados *in silico* reguladores da expressão dos genes deste *cluster*, como os genes *hrpL* e *hrpG* de *H. seropedicae*. Desta forma, a averiguação da presença destes genes em *H. rubrisubalbicans* foi realizada por hibridização DNA/DNA.

4.1.3. Evolução da proteína HrcN de *H. rubrisubalbicans* e de outras bactérias fitopatogênicas, simbiotes, associativas e patógenos animais.

Rezzonico e colaboradores (2004) compararam espécies patogênicas e associativas de *Pseudomonas* através da conservação do gene *hrcN* e da respectiva proteína codificada. A filogenia resultante foi congruente com as análises do 16S rDNA e outros genes controle. Esta avaliação mostrou que as espécies fitopatogênicas foram agrupadas em separado das associativas, com poucas exceções, revelando que não ocorreu transferência lateral recente deste gene das espécies fitopatogênicas para as associativas (REZZONICO *et al.*, 2004).

Quando a seqüência da proteína hrcN de *H. rubrisubalbicans* é alinhada com as proteínas homólogas de outras bactérias fitopatogênicas, simbiontes, associativos e patógenos animais (FIGURA 13), nota-se a divisão de cinco grupos: os fitopatógenos *Xanthomonas*, *Ralstonia* e *Acidovorax*; os simbiontes *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*; os patógenos animais *Yersinia*, *Salmonella* e *Shigella*; as espécies de *Herbaspirillum*; e os fitopatógenos *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pectobacterium*.

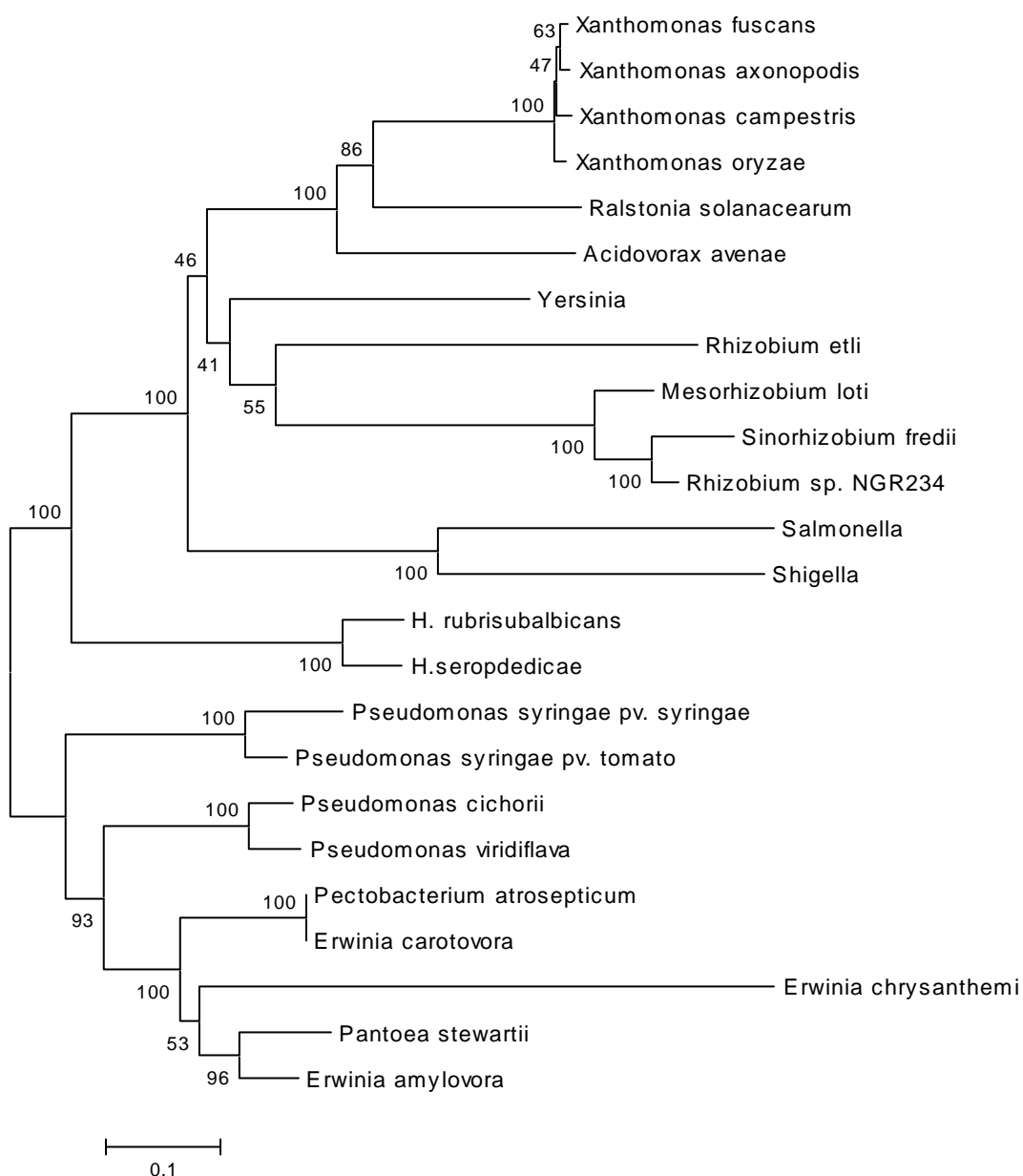


FIGURA 13 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS BASEADA NA CONSERVAÇÃO DA PROTEÍNA HrcN.

Desta forma, pode-se concluir que o gene *hrcN* foi transferido recentemente para um ancestral comum das espécies de *Herbaspirillum*, uma vez que, apesar da grande diferença comportamental na associação com plantas, *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* são agrupados nesta análise.

4.2. CONSERVAÇÃO DOS GENES *hrcC*, *hrpG* e *hrpL* ENTRE DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*

Schreiner (2007) descreveu que a identidade entre as proteínas do TTSS de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* é superior a 60%. Esta aparente conservação dos genes *hrp/hrc* destes organismos foi utilizada para inferir a presença dos genes *hrcC*, *hrpG* e *hrpL* em *H. rubrisubalbicans*, através de hibridização DNA/DNA. Para isto, foram utilizadas sondas com as seqüências destes genes de *H. seropedicae*.

Para possibilitar a inferência da conservação destes genes nos organismos estudados, foi utilizado para hibridização DNA genômico das estirpes SmR1, ZA95, ZM152 e HRC54 de *H. seropedicae* e M1, M4 e HCC103 de *H. rubrisubalbicans*. Para hibridização com cada sonda, foi utilizado DNA genômico digerido com as enzimas *EcoRI*, *Sau3A* ou *PstI*.

4.2.1. Identificação do gene *hrcC* de *H. rubrisubalbicans* por hibridização

A figura 14 mostra que todas as estirpes utilizadas de *Herbaspirillum* apresentam um sinal de hibridização. Quando o DNA total é digerido com *EcoRI* (14.A), as estirpes de *H. seropedicae* revelam um fragmento de aproximadamente 10kb com o gene *hrcC* (14.B). Já nas estirpes de *H. rubrisubalbicans*, o fragmento que contém este gene é de aproximadamente 6Kb (14.B). Quando o DNA total é digerido com *Sau3A* (14.C), todas as estirpes de *Herbaspirillum* revelam um fragmento de aproximadamente 1kb e outro com aproximadamente 750bp, ambos contendo o gene *hrcC* (14.D).

Quando o DNA total é digerido com *PstI* (14.E), as estirpes de *H. seropedicae* revelam um fragmento de aproximadamente 4kb com o gene *hrcC* (14.F). Já nas estirpes de *H. rubrisubalbicans*, o fragmento que contém este gene é de aproximadamente 3,5Kb (14.F).

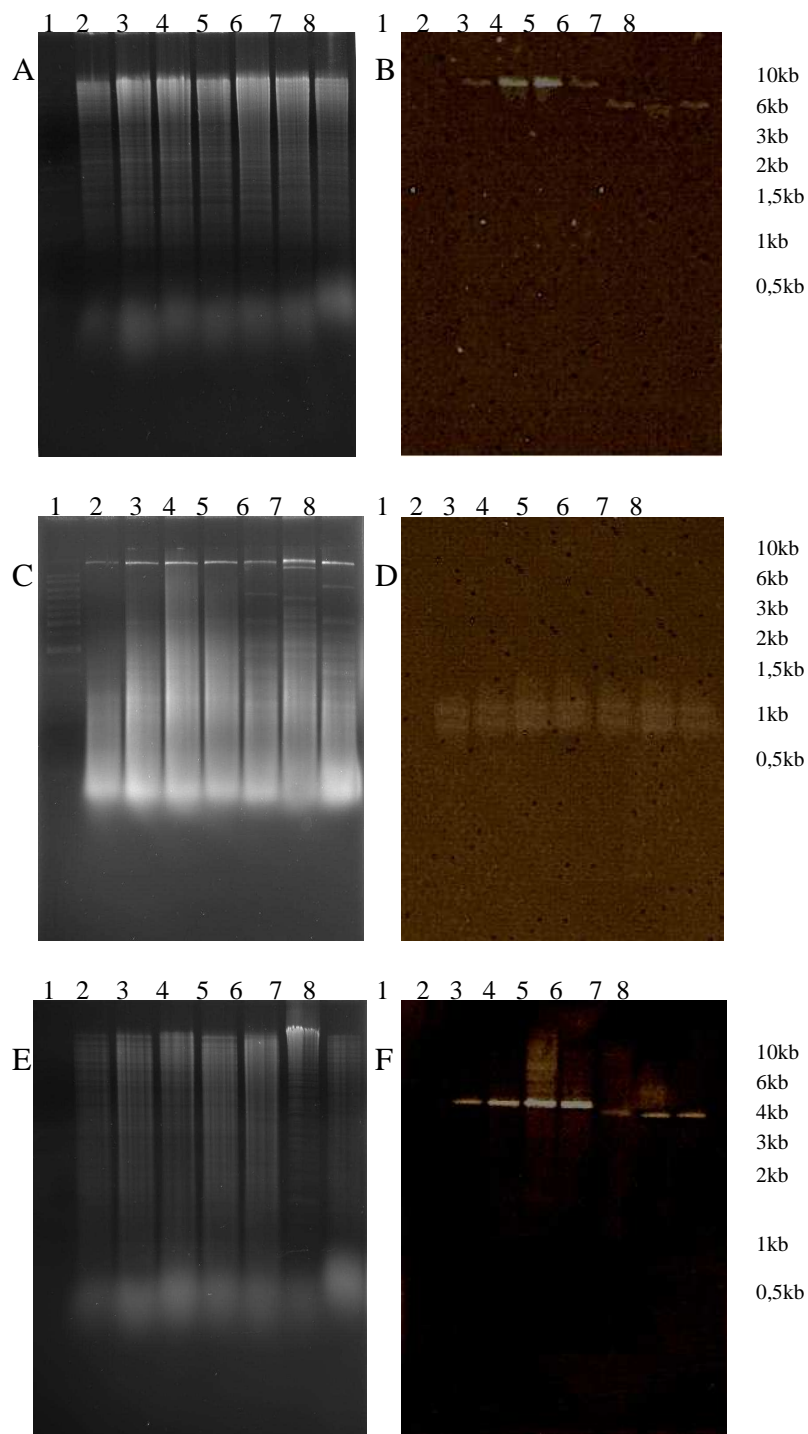


FIGURA 14 – HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* COM O GENE *hrcC*. 1: Marcador de peso molecular (1kb); 2: DNA total de *H. seropedicae* SmR1; 3: DNA total de *H. seropedicae* ZA95; 4: DNA total de *H. seropedicae* ZM152; 5: DNA total de *H. seropedicae* HRC54; 6: DNA total de *H. rubrisubalbicans* M1; 7: DNA total de *H. rubrisubalbicans* M4; 8: DNA total de *H. rubrisubalbicans* HCC103. A: perfil eletroforético do DNA total digerido com *EcoRI*; B: hibridização de A com a sonda *hrcC*; C: perfil eletroforético do DNA total digerido com *Sau3A*; D: hibridização de C com a sonda *hrcC*; E: perfil eletroforético do DNA total digerido com *PstI*; F: hibridização de E com a sonda *hrcC*.

Estes resultados mostram que todas as estirpes testadas apresentam o gene *hrcC*, corroborando as análises *in silico*. Além disso, sugerem que a região genômica que contém este gene é conservada entre as estirpes da mesma espécie, porém diferem entre as espécies. Vale salientar, entretanto, que esta diferença não deve ser abrangente, pois em D pode-se observar o mesmo padrão de hibridização entre as espécies.

4.2.2. Identificação do gene *hrpG* de *H. rubrisubalbicans* por hibridização

A figura 15 mostra que todas as estirpes utilizadas de *Herbaspirillum* apresentam um sinal de hibridização.

Quando o DNA total é digerido com *EcoRI* (15.A), as estirpes de *H. seropedicae* revelam um fragmento de aproximadamente 4,5kb com o gene *hrpG* (15.B). Já nas estirpes de *H. rubrisubalbicans*, o fragmento que contém este gene é de aproximadamente 2,5Kb (15.B). Quando o DNA total é digerido com *Sau3A* (15.C), todas as estirpes de *Herbaspirillum* revelam um fragmento de aproximadamente 1kb e outro com aproximadamente 750bp, ambos contendo o gene *hrpG* (15.D). Quando o DNA total é digerido com *PstI* (15.E), as estirpes de *H. seropedicae* revelam um fragmento de aproximadamente 750bp com o gene *hrpG* (15.F). Já nas estirpes de *H. rubrisubalbicans*, o fragmento que contém este gene é de aproximadamente 1,2Kb (15.F).

Estes resultados mostram que todas as estirpes testadas apresentam o gene *hrpG*. Além disso, sugerem que a região genômica que contém este gene é conservada entre as estirpes da mesma espécie, porém diferem entre as espécies. Vale salientar, assim como para o gene *hrcC*, que esta diferença não deve ser abrangente, pois em D pode-se observar o mesmo padrão de hibridização entre as espécies.

Os sinais de hibridização gerados, contudo, podem ser atribuídos a hibridização não específica da sonda *hrpG*, uma vez que este gene codifica um sistema de dois componentes. Tais reguladores de resposta apresentam grande similaridade de seqüência, possibilitando hibridizações cruzadas.

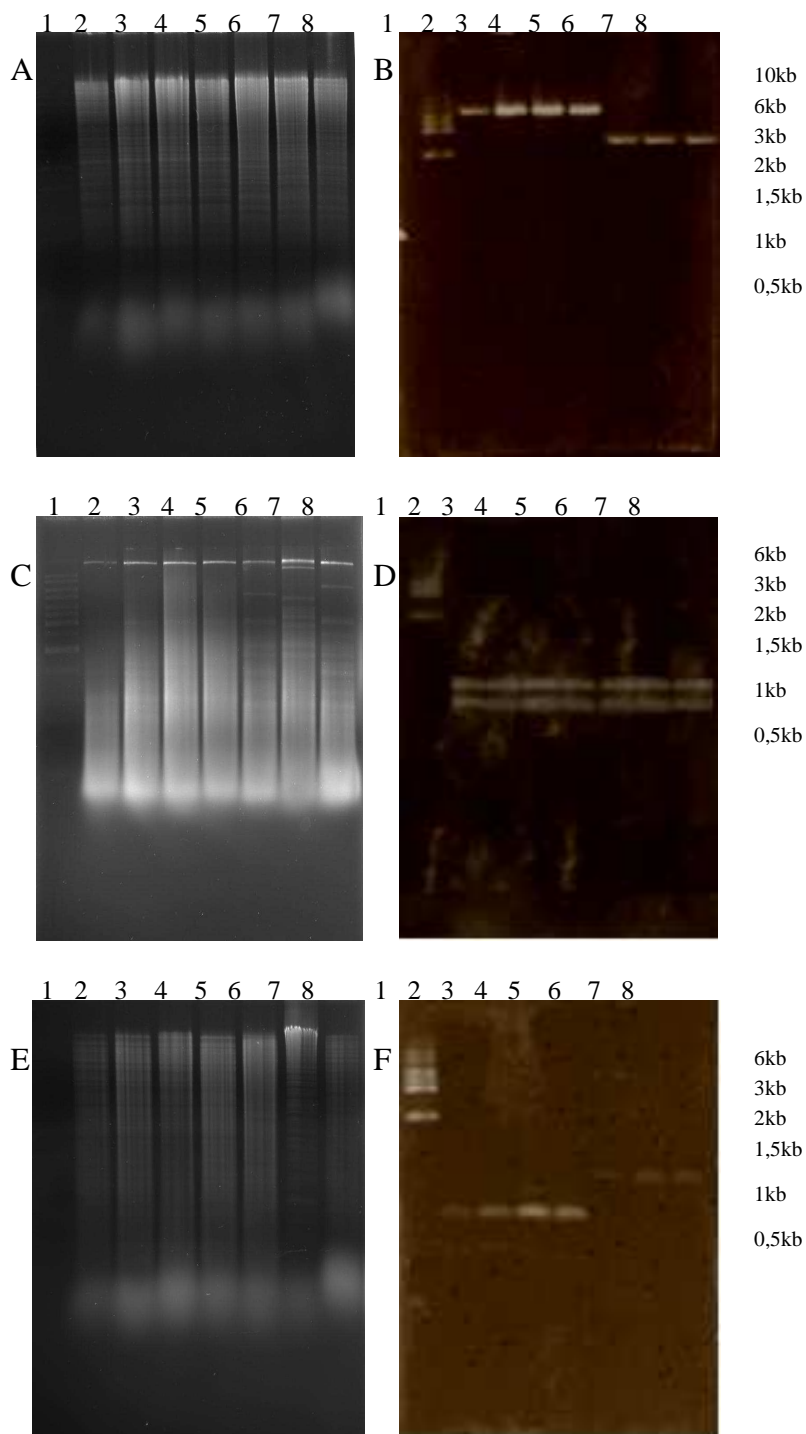


FIGURA 15 – HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* COM O GENE *hrpG*. 1: Marcador de peso molecular (1kb); 2: DNA total de *H. seropedicae* SmR1; 3: DNA total de *H. seropedicae* ZA95; 4: DNA total de *H. seropedicae* ZM152; 5: DNA total de *H. seropedicae* HRC54; 6: DNA total de *H. rubrisubalbicans* M1; 7: DNA total de *H. rubrisubalbicans* M4; 8: DNA total de *H. rubrisubalbicans* HCC103. A: perfil eletroforético do DNA total digerido com *EcoRI*; B: hibridização de A com a sonda *hrpG*; C: perfil eletroforético do DNA total digerido com *Sau3A*; D: hibridização de C com a sonda *hrpG*; E: perfil eletroforético do DNA total digerido com *PstI*; F: hibridização de E com a sonda *hrpG*.

4.2.3. Identificação do gene *hrpL* de *H. rubrisubalbicans* por hibridização

A figura 16 mostra que apenas as estirpes de *H. seropedicae* apresentam um sinal de hibridização.

Quando o DNA total é digerido com *EcoRI* (16.A), as estirpes de *H. seropedicae* revelam um fragmento de aproximadamente 3,5kb com o gene *hrpL* (16.B). Quando o DNA total é digerido com *Sau3A* (16.C), as estirpes de *H. seropedicae* revelam um fragmento de aproximadamente 750bp contendo o gene *hrpL* (16.D). Quando o DNA total é digerido com *PstI* (16.E), as estirpes de *H. seropedicae* revelam um fragmento de aproximadamente 2,5Kb com o gene *hrpL* (16.F).

Estes resultados mostram que apenas as estirpes de *H. seropedicae* apresentam o gene *hrpL*. Além disso, sugerem que a região genômica que contém este gene nesta bactéria é conservada entre as estirpes.

H. seropedicae possui dois genes *hrp* que codificam para possíveis reguladores de transcrição, HrpL e HrpG (DEDECEK, 2007). Estas proteínas podem ser responsáveis pelo controle transcricional de todo o *cluster* nesta bactéria, indicando uma mistura da regulação observada para os grupos I e II do TTSS de fitopatógenos (ALFANO & COLLMER, 1996). A possível ausência do gene *hrpL* em *H. rubrisubalbicans*, e presença de *hrpG*, pode indicar que a regulação do TTSS desta bactéria seja semelhante à regulação encontrada nos fitopatógenos do grupo II.

Nos patógenos deste grupo, *X. campestris* e *R. solenacearum*, os *operons* *hrp/hrc* são ativados por um membro da família AraC, designado como HrpX em *X. campestris* e HrpB em *R. solenacearum*. Esses dois genes são ativados por sua vez por HrpG, que funciona como regulador de resposta em função de mudanças ambientais (STOCK, ROBINSON & GOUDREAU, 2000). HrpX e HrpB se ligam a seqüências promotoras consenso denominadas *PIP box* (*Plant Inducible Promotor*) (GENIN *et al.*, 2005; MUDGETT *et al.*, 1998; BÜTTNER & BONAS, 2002; ALFANO & COLLMER, 1997; FURUTANI *et al.*, 2003; WENGELNIK, ACKERVEKEN & BONAS, 1996). Genes codificantes para proteínas homólogas a estas HrpX e HrpB ainda não foram identificados em *H. rubrisubalbicans*.

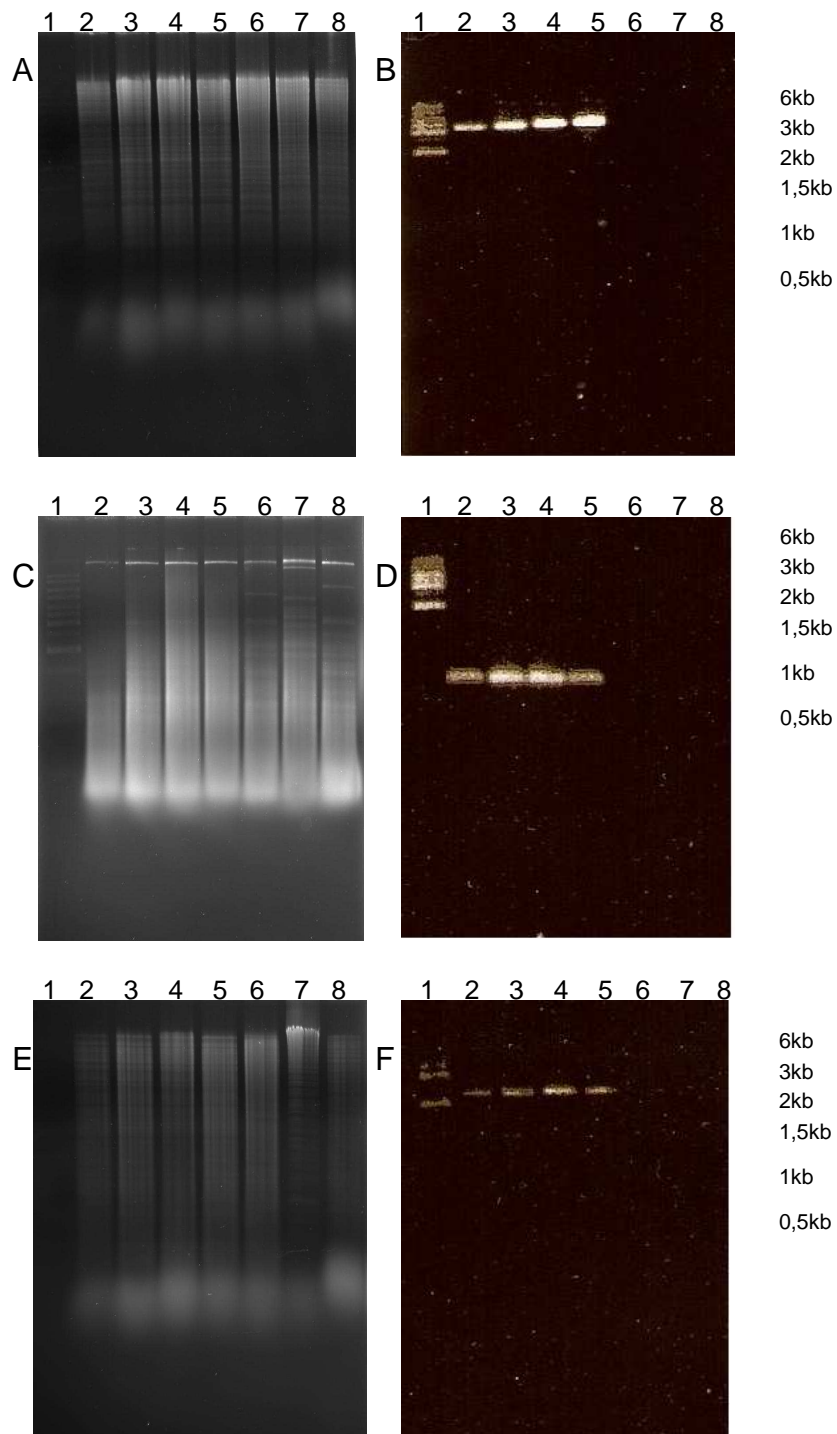


FIGURA 16 – HIBRIDIZAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* COM O GENE *hrpL*. 1: Marcador de peso molecular (1kb); 2: DNA total de *H. seropedicae* SmR1; 3: DNA total de *H. seropedicae* ZA95; 4: DNA total de *H. seropedicae* ZM152; 5: DNA total de *H. seropedicae* HRC54; 6: DNA total de *H. rubrisubalbicans* M1; 7: DNA total de *H. rubrisubalbicans* M4; 8: DNA total de *H. rubrisubalbicans* HCC103. A: perfil eletroforético do DNA total digerido com *EcoRI*; B: hibridização de A com a sonda *hrpL*; C: perfil eletroforético do DNA total digerido com *Sau3A*; D: hibridização de C com a sonda *hrpL*; E: perfil eletroforético do DNA total digerido com *PstI*; F: hibridização de E com a sonda *hrpL*.

Os genomas de *Herbaspirillum* apresentam poucos sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *PstI*, portanto deveriam revelar sinais de hibridização semelhantes entre as espécies. Já para a enzima *Sau3A*, a presença de numerosos sítios deveria acarretar na visualização das diferenças de organização entre os clusters destas bactérias. Contudo, os resultados revelaram exatamente o oposto deste pré-suposto.

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

O estudo de mutantes *hrp*⁻ de *H. rubrisubalbicans* possibilitará a determinação do fenótipo desta bactéria sem um TTSS funcional na interação com o hospedeiro vegetal. Assim, foram inicialmente escolhidos para nocaute genes codificantes para proteínas estruturais deste sistema.

4.3.1. Obtenção do mutante *hrpE*⁻ de *H. rubrisubalbicans* M1

A estratégia utilizada para a obtenção deste mutante foi a recombinação homóloga. O plasmídeo HR02-MF-00-000-057.H09.TET (SCHREINER, 2007), contendo o gene *hrpE* de *H. rubrisubalbicans* interrompido pelo transposon EZ::Tn5TM <TET1>, foi eletrotransformado na estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* (M1), ocorrendo o fenômeno de permuta e gerando estirpes com o gene nocauteado, resistentes a tetraciclina. Os mutantes foram nomeados *H. rubrisubalbicans* TS-E e serão utilizados para ensaios fisiológicos.

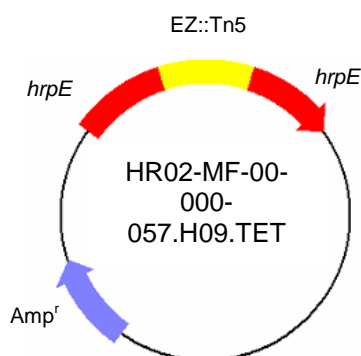


FIGURA 17 - ESQUEMA DO PLASMÍDEO HR02-MF-00-000-057.H09.TET.

4.3.2. Obtenção da estirpe mutante *hrcV* de *H. rubrisubalbicans* M1

A estratégia utilizada para a obtenção deste mutante foi a recombinação homóloga dupla. A partir do clone HR03-MF-00-000-049.A08 da biblioteca genômica deste organismo, que contém o gene *hrcV* no sítio *SmaI* do vetor, foi inserido o cassete *nptI-sacB-sacR* no sítio *BamHI* do vetor e o *transposon* EZ::Tn5TM <TET1> no gene (FIGURA 18). A ligação do cassete foi confirmada por restrição e a posição de inserção do *transposon* foi determinada por seqüenciamento. Com a transformação desta construção na estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* (M1), ocorreu o fenômeno de permuta, gerando estirpes com o gene nocauteado.

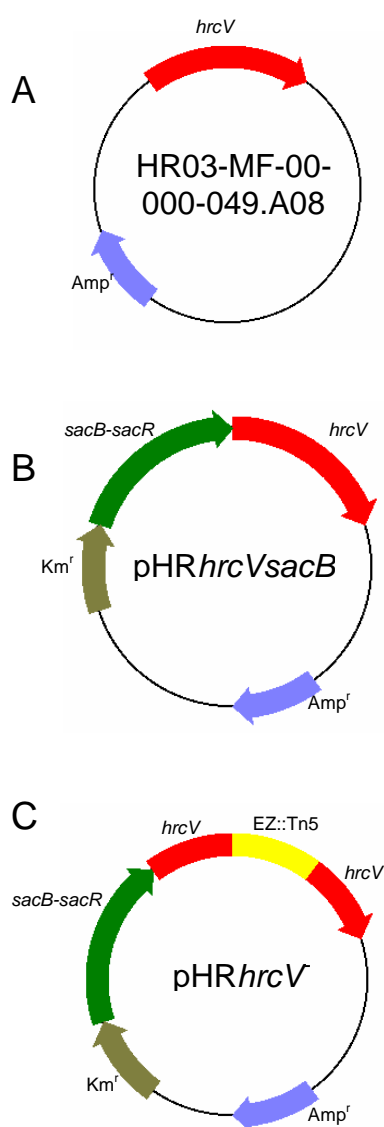


FIGURA 18 – ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pHR*hrcV*. A: Clone da biblioteca genômica de *H. rubrisubalbicans* (Projeto GENOPAR). B: pHR*hrcVsacB*, mostrando inserção do cassete *nptI-sacB-sacR* no sítio *BamHI* do vetor. C: pHR*hrcV*, mostrando inserção do *transposon* EZ::Tn5TM <TET1> na base 739 do gene *hrcV*.

Os genes *sacB-sacR* permitem seleção direta da perda do plasmídeo durante a recombinação, pois apenas estirpes que não mais contém o gene *sacB* são capazes de crescer em meio contendo sacarose (HYNES *et al.*, 1989). Assim, os duplos recombinantes foram selecionados e nomeados *H. rubrisubalbicans* EB-V.

4.4. SEQÜENCIAMENTO E ANÁLISE DA BIBLIOTECA SUBTRATIVA

Visando identificar outras diferenças gênicas entre *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, uma biblioteca subtrativa, contendo segmentos de DNA de *H. rubrisubalbicans* ausentes em *H. seropedicae*, foi seqüenciada e analisada.

A tabela 7 mostra a análise das seqüências obtidas, sua respectiva homologia com as seqüências protéicas do banco de dados do GenBank e sua similaridade com as seqüências genômicas de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*.

Como os insertos da biblioteca analisada contêm em média 300bp, as seqüências descritas na tabela 7 apresentam a mesma média de tamanho, com qualidade *phred* >20.

TABELA 9 – SEQÜÊNCIAS OBTIDAS POR HIDRIZAÇÃO SUBTRATIVA.

Clone	Homologia com GenBank (identidade; tamanho aa)	Identidade com <i>H. rubrisubalbicans</i> (tamanho bp)	Identidade com <i>H. seropedicae</i> (tamanho bp)
A1	Sem homologia	100% (40)	0
A2	Sem homologia	98% (439)	0
A3	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(81%;42)	96% (327)	0
A4	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(47%;42)	94% (185)	0
A5	Sem homologia	100% (300)	0
A6	Flagelina FliC - <i>Oceanospirillum</i> sp.(85%, 20)	100% (141)	94% (133)
A7	Sem homologia	92% (141)	92% (116)
A8	Sem homologia	92% (82)	0
A9	Proteína de membrana envolvida na exportação de antígeno-O e ácido teóico - <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> (39%; 51)	95% (113)	0
A10	Proteína de ligação transportadora ABC de aminoácidos - <i>Azorhizobium caulinodans</i> (60%; 56)	93% (143)	0
A11	Ativador de D-serine deaminase – <i>Escherichia coli</i> (67%; 37)	97% (46)	0
A12	D-alanil-D-alanina carboxipeptidase (família de peptidase s11) - <i>Janthinobacterium marseille</i> (71%, 63)	98% (185)	95% (167)
B1	Proteína reguladora de transcrição Lys R - <i>Burkholderia</i> (69%; 85)	97% (180)	92% (42)
B2	Sem homologia	91% (79)	0
B3	Fosfoenolpiruvato carboxilase - <i>Hermiimonas arsenicoxydans</i> (56%, 32)	95% (41)	92% (25)
B4	Sem homologia	96% (83)	0
B5	Proteína relacionada ao transportador ABC - <i>Comamonas</i> sp.(47%, 69)	100% (24)	0
B6	Família ABC de transportador de cadeia de aminoácidos ramificados – <i>Burkholderia xenovorans</i> (72%; 25)	90% (76)	0
B7	Sem homologia	100% (111)	90% (98)
B8	Dihidroxi-ácido desidratase – <i>Acidovorax avenae</i> (93%; 48)	100% (34)	0
B9	Transposase - <i>Xanthomonas campestris</i> (62%; 54)	90% (315)	0
B10	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase - <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (44%; 79)	100% (111)	86% (51)
B11	Rieske (2Fe-2S) domain protein – <i>Burkholderia ambifaria</i> (75%, 24)	95% (95)	87% (54)
B12	D-alanil-D-alanina carboxipeptidase - <i>Janthinobacterium marseille</i> (71%; 63)	98% (181)	95% (167)
C1	Peptidil-tRNA hidrolase - <i>Janthinobacterium marseille</i> (79%; 53)	88% (171)	87% (164)

C2	Proteína hipotética - <i>Microplitis</i> sp.(61%; 21)	96% (128)	0
C3	Transposase e derivados inativados – <i>Ralstonia solanacearum</i> (53%; 41)	91% (292)	0
C4	ATPase do sistema tipo ABC de transporte de fosfonato - <i>Azotobacter vinelandii</i> (40%; 64)	99% (251)	87% (97)
C5	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(86%, 38)	99% (125)	0
C6	Dihidroxi-ácido desidratase – <i>Chromohalobacter salexigens</i> (87%; 33)	100% (103)	91% (89)
C7	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(89%; 64)	99% (347)	0
C8	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(92%; 40)	99% (129)	0
C9	Sem homologia	98% (358)	0
C10	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(93%; 43)	100% (129)	0
C11	Sem homologia	90% (215)	0
C12	Proteína tipo luciferase - <i>Burkholderia</i> (68%, 29)	91% (78)	90% (41)
D1	Sem homologia	0	0
D2	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(69%; 23)	89% (130)	0
D3	Sem homologia	0	0
D4	Família de facilitadores de transporte - <i>Pseudomonas syringae</i> (52%, 109)	96% (523)	0
D5	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(93%; 60)	100% (266)	0
D6	Proteína reguladora de transcrição LysR - <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (46%, 73)	95% (222)	90% (32)
D7	Sem homologia	0	0
D8	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(92%; 38)	99% (130)	0
D9	Dehidrogenase/reductase de cadeia curta SDR – <i>Burkholderia multivorans</i> (82%; 23)	0	85% (70)
E1	Transposase - <i>Listonella anguillarum</i> (100%;21)	100% (34)	0
E2	Proteína hipotética conservada - <i>Burkholderia</i> spp.(54%; 74)	100% (232)	0
E3	Proteína hipotética conservada - <i>Herminiimonas</i> spp.(71%; 45)	100% (357)	90% (261)
E4	Proteína de tolerância a solventes orgânicos OstA - <i>Janthinobacterium marseille</i> (75%; 28)	100% (34)	86% (129)
E5	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(82%; 40)	97% (125)	0
E6	Proteína de ligação ao substrato de transporte de aminoácidos - <i>Janthinobacterium marseille</i> (75%; 61)	91% (79)	99% (123)
E7	Transposase IS630 - <i>Listonella anguillarum</i> (100%; 21)	97% (34)	0
E8	Proteína hipotética RAZWK3B_07809 - <i>Roseobacter</i> sp.(77%; 44)	100% (267)	0
E9	Sem homologia	97% (105)	0
E10	Proteína hipotética conservada – <i>Janthinobacterium marseille</i> (77%; 45)	100% (357)	90% (261)
E11	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(79%; 48)	100% (141)	0

E12	Regulador transcricional da família MarR - <i>Ralstonia solanacearum</i> (70%; 27)	100% (86)	88% (44)
F1	D-alanil-D-alanina carboxipeptidase (família de peptidase s11) - <i>Janthinobacterium marseille</i> (60%; 63)	91% (184)	89% (157)
F2	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(43%; 60)	99% (129)	0
F3	Proteína hipotética conservada - <i>Janthinobacterium marseille</i> (77%; 45)	100% (357)	90% (261)
F4	Transposase - <i>Listonella anguillarum</i> (71%;28)	97% (34)	0
F5	Sem homologia	90% (32)	0
F6	Provável proteína relacionada a hemaglutinina – <i>Ralstonia solanacearum</i> (37%; 74)	89% (77)	0
F7	Proteína relacionada ao transportador ABC – <i>Ralstonia solanacearum</i> (65%, 103)	97% (370)	89% (297)
F8	IS10 Transposase - <i>Photobacterium phosphoreum</i> (80%; 72)	90% (75)	0
F9	FAD-dependente piridina nucleotídeo-disulfídeo oxidoreductase - <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> (76%; 42)	100% (246)	92% (233)
F10	Diguanilato ciclase/fosfodiesterase – <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (54%; 50)	99% (209)	81% (171)
F11	Transposase - <i>Listonella anguillarum</i> (87%;33)	89% (77)	0
F12	Proteína hipotética Daro_0142 – <i>Dechloromonas aromatica</i> (48%; 27)	96% (395)	0
G1	Sem homologia	85% (239)	0
G2	Família de proteínas sensoras GGDEF - <i>Janthinobacterium marseille</i> (52%; 53)	89% (184)	0
G3	Sem homologia	91% (74)	0
G4	Amino oxidase - <i>Burkholderia cenocepacia</i> (52%; 61)	100% (183)	0
G5	nitrilase NitA - <i>Pseudomonas fluorescens</i> (86%; 66)	91% (79)	0
G7	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(94%; 57)	99% (288)	0
G8	Chaperona de pili de Gram-negativas - <i>Yersinia</i> sp.(48%; 49)	91% (79)	0
G9	Sem homologia	90% (77)	0
G10	Transposase - <i>Burkholderia</i> spp.(90%; 42)	98% (129)	0
G11	Proteína putativa do transportador ABC - <i>Aurantimonas coralicida</i> (42%; 47)	99% (268)	0
G12	Sem homologia	99% (268)	0
H1	Subunidade B de transposase - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (83%; 77)	100% (211)	0

NOTA: homologia considerada com o maior escore da comparação com o GenBank, utilizando o programa BLASTx em *default*.

Estes resultados podem ser agrupados de acordo com a figura 19.

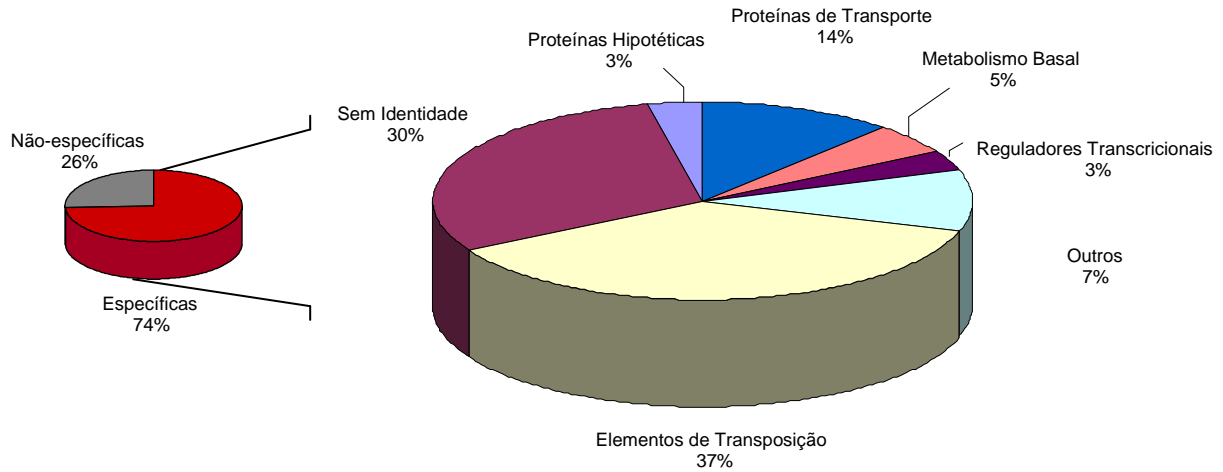


FIGURA 19 – DISTRIBUIÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS EM GRUPOS FUNCIONAIS.

O rendimento da biblioteca seqüenciada foi de 74% de seqüências específicas, ou seja, seqüências encontradas apenas em *H. rubrisubalbicans*. Destas seqüências, 37 % apresentam identidade com transposases, elementos de inserção e derivados inativados. Trinta por cento não apresentaram identidade com seqüências conhecidas, podendo indicar a presença de novos genes ou ainda regiões intergênicas não conservadas. Quatorze por cento apresentam identidade com proteínas envolvidas e facilitadoras do transporte de aminoácidos e antígeno-O. 5% apresentam homologia com enzimas envolvidas no metabolismo basal de bactérias. 3% apresentam homologia com proteínas envolvidas na regulação da transcrição, como os da família MarR e LysR. Três por cento apresentam homologia com proteínas hipotéticas, sem função conhecida. Nos restantes 7% são encontradas proteínas relacionadas à hemaglutininas, chaperonas de pili de Gram-negativas, luciferases, nitrilases e de tolerância a solventes orgânicos.

A identificação de numerosos elementos de transposição no genoma de *H. rubrisubalbicans*, ausentes em *H. seropedicae*, sugere que o genoma deste organismo provavelmente sofreu um maior número de transferências laterais recentes. *H. seropedicae* apresenta 67 possíveis seqüências parciais de elementos de inserção em seu genoma, contudo estas seqüências possuem em média apenas 20bp. Ao comparar o tamanho médio das seqüências até agora identificadas em *H.*

rubrisubalbicans, com cerca de 200bp, pode-se inferir que a velocidade da evolução do genoma deste é consideravelmente maior.

Os genes correspondentes às seqüências identificadas serão mutagenizados, permitindo assim a determinação de suas funções e importância para *H. rubrisubalbicans*.

Outras bibliotecas subtrativas serão construídas e seqüenciadas, visando identificar todas as diferenças genômicas entre *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*.

5. CONCLUSÕES

No *cluster hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* foram identificados 10 genes *hrp/hrc*, similares aos genes codificantes de proteínas estruturais do Sistema de Secreção do Tipo III, e 5 genes similares aos codificadores das proteínas HrpI, HpaB, Hpa4, AvrE e GALA, provavelmente secretadas por este sistema.

A presença dos genes codificantes para proteínas estruturais e efetoras do TTSS em *H. rubrisubalbicans* sugere que este sistema pode estar envolvido no desenvolvimento da doença estria mosqueada em variedades suscetíveis de cana-de-açúcar e resposta de hipersensibilidade em variedades resistentes.

As proteínas codificadas pelos genes *hrp/hrc* de *H. rubrisubalbicans* são similares a de *H. seropedicae*, contudo a organização gênica deste cluster pode apresentar pequenas diferenças.

A regulação da transcrição dos genes *hrp/hrc* em *H. rubrisubalbicans* provavelmente é diferente da regulação de *H. seropedicae*. *H. seropedicae* possui dois genes *hrp* que codificam possíveis reguladores de transcrição, HrpL e HrpG. A proteína HrpG, componente de um sistema de sensoriamento ambiental, induziria a transcrição de HrpL, uma subunidade sigma alternativa, que atuaria como ativador da transcrição de todo o *cluster hrp/hrc*. Como *H. rubrisubalbicans* não possui o gene *hrpL*, a proteína HrpG ativaria a transcrição de outro ativador da transcrição do *cluster hrp/hrc*, semelhante à regulação de fitopatógenos do grupo II, como *X. campestris* e *R. solanacearum*.

A identificação de numerosos elementos de transposição no genoma de *H. rubrisubalbicans*, ausentes em *H. seropedicae*, sugere que o genoma deste organismo provavelmente sofreu um maior número de transferências laterais recentes, apresentando assim uma velocidade de evolução consideravelmente maior. Essa diferença na evolução gênica destes organismos não foi observada em relação à proteína HrcN, que provavelmente foi transferida para um ancestral de *Herbaspirillum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKEDA, Y., GALAN, J.E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. **Nature.** 437: 911-915, 2005.

ALAOUI, A., SANSONETTI, P.J., PARSOT, C. MxiJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* lpa invasions, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins. **J. Bacteriol.** 174: 7661-7669, 1992.

ALDON, D., et al. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. **EMBO J.** Oxford, 19: 2304-2314, 2000.

ALEGRIA, M.C. et al. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of type III secretion system of the pathogen *Xantomonas axonopodis* pathovar *citri*. **J. Bacteriol.** Washington, 36: 65-73, 1992.

ALFANO, J.R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacteria disease and plant defense. **Ann. Rev. Phytopathol.** 42: 385-414, 2004.

ALFANO, J.R.; COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **J. Bacteriol.** 179: 5655-5662, 1997.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v.215, p. 403-410, 1990.

ANDERSON, D.M.; SCHNEEWIND, O. Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. **Curr. Opin. Microbiol.**, Oxford, v.2, p. 18-24, 1999.

ANGOT, A.; PEETERS, N.; LECHNER, E.; GENIN, S. *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. **Proc. Natl. Acad. Sci .U S A.** Sep 26;103(39):14620-5, 2006.

ARLAT, M.; VAN GIJSEGEM, F.; HUET, J.C.; PERNOLLET, J.C.; BOUCHER, C.A. PopA1, a protein wich induces a hypersensitive like response on specific *Petunia genotypes*, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. **EMBO J.** 13: 543-553, 1992.

BADEL, J.L.; SHIMIZU, R.; OH, H.S., COLLMER, A. *Pseudomonas syringae* pv. tomato avrE1/hopM1 mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. **Mol Plant Microbe Interact.** Feb;19(2):99-111, 2006.

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

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

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

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.;. BALDANI, V. L. D; OLIVARES, F. L. AND DOBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*;

Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **Int. Journal of Systematic Bacteriology**. 46: 802–810, 1996.

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

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

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

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

BOGDANOVA, A. J.; BEER, S.V.; BONAS, U.; BOUCHER, C.A.; COLLMER, A. Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. **Mol. Microbiol.**20: 681-683, 1996.

BRENCIC, A., WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev.** Mar;69(1):94-155, 2005.

BRITO, B. *et al.* *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. **Mol. Gen. Genet.** New York, 205: 270-275, 1986.

BRITO, B. *et al.* A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. **Mol. Plant-Microbe Interact.** Saint Paul, 15: 109-119, 2002.

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

BÜTTNER, D., BONAS, U. Getting across – bacteria type III effector proteins on their way to plant cell. **EMBO J.** Oxford, v.21, p. 5313-5322, 2002.

CAMPBELL, E.A. *et al.* Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. **Mol. Cell.**, Cambridge, 9(3), p.527-539, 2002.

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

CAN – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em www.cna.org.br e em paginarural.com.br. Acesso em 10/10/2007.

CHAMI, M., GUILVOUT, I., GREGORINI, M., RÉMIGY, H.W., MÜLLER, S.A., VALERIO, M., ENGEL, A., PUGSLEY, A.P., BAYAN, N. Structural insights into the secretin PulD and its trypsin-resistant core. **J Biol Chem.** Nov 11; 280(45):37732-41, 2005

CHARKOWSKI, A. O., ALFANO, J.R., PRESTON, G., YUAN, J., HE, S.Y. The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. **J. Bacteriol.** 180: 5211-5217, 1998.

COLLMER, A.; LINDEBERG, M.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; SCHNEIDER, D.J.; ALFANO, J.R. Genomic mining type III secretion system effectors in

Pseudomonas syringae yields new picks for all TTSS prospectors. **Trends Microbiol.** Oct;10: 462-9, 2002.

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

CORNELIS, G.R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of type III secretory system. **Annual Rev. Microbiol.** v.54,p. 735-774, 2000.

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

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). [Appl Environ Microbiol.](#) May;67(5): 2375-9, 2001.

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

DEL VILLAR, P.M.; GAMEIRO, A.M.; DABAT, M.H. Fatores de eficiência das culturas agrícolas do Brasil. **Inf. Econ.** SP, 34: 22-35, 2004.

DE WEERT, S. *et al.*, Flagella-driven chemotaxis towards exudates components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** Saint Paul, 15: 1173-1180, 2002.

DE WEGER, L.A.; BAKKERP.A.H.M.; SCHIPPERS, B.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LUGTENBERG, B.J.J. *Pseudomonas* spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are affected in their ability to colonize potato roots. **Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions.** v.H36, p.197- 202, 1989.

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.**, 54: 2223-2230, 2004.

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

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

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

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em www.embrapa.br. Acesso em 10/10/2007.

ESTABROOK, E. M.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. **Plant Cell**. 3: 299-308, 1991.

EWING, B.; GREEN, P.; Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred II. Error Probabilities. **Genome Research**. 8: 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.D.; WENDL, M.C.; GREEN, P.; Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred I. Accuracy. Assessment. **Genome Research**. 8: 174-185, 1998.

FRANCIS, M.S., WOLF-WATZ, H., FORSBERG, A. regulation of type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **Oxford**, 5: 166-172, 2002.

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

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

FURUTANI, A. et al. Evidence for HrpXo-dependent expression of the type III secretory proteins in *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. **J. Bacteriol.** Washington, 186: 1374-80, 2003

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

GAL-MOR, O.; FINLAY, B.B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cell Microbiol.** Nov;8(11):1707-19. 2006

GAUDRIAULT, S.; MALANDRIN, L.; PAULIN, J.P.; BARNY, M.A. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. **Mol Microbiol.** Dec;26(5):1057-69, 1997

GENIN, S.; GOUGH, C.L.; ZISCHEK, C.; BOUCHER, C.A. Evidence that the hrpB gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Ralstonia solanacearum*. **Mol. Microbiol.** 6: 3065-3076, 1992.

GHOSH, P. Process of protein transport by Type III Secretion System. **Microbiol. And Mol. Biol. Rev.** Dec, 771-795, 2004

GOODMAN, R.N.; NAVACKY, A.J. The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomena. St. Paul, **APS Press**, p.264, 1994

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**. 8: 195-202, 1998

GREENBERG, J.T.; VINATZER, B.A. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. [Curr Opin Microbiol](#). Feb;6(1):20-8, 2003

GRIMM, C.; AUFSATZ, W.; PANOPOULOS, N.J. The hrpRS locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. **Mol. Microbiol.** Salem, 15: 155-165, 1995.

GRIMM, C.; PANOPOULOS, N.J. The predicted protein product of a pathogenic locus from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is homologous to a highly conserved domain of several prokaryotic regulatory proteins. **J. Bacteriol.** Washington, 171: 5031-5038, 1989.

HACKER, J.; KAPER, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annu Rev Microbiol.**;54:641-79, 2000.

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

HAM, J.H. *et al.* A cloned *Erwinia chrysanthemi* Hrp (type III protein secretion) system functions in *Escherichia coli* to deliver *Pseudomonas syringae* Avr signals to plant cells and to secrete Avr proteins in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 10202-211, 1998.

HE, S.M.; NOMURA, K; WHITTAM, T.S.; Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. **Biochim. Biophys. Acta.** 1694: 181-206, 1998.

HENDERSON, I.R., NAVARRO-GARCIA, F., NATARO, J.P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. **Trends Microbiol.** Cambridge, 6: 370-378, 1998.

HOLEVA, M.C.; BELL, K.S.; HYMAN, L.J.; AVROVA, A.O.; WHISSON, S.C.; BIRCH, P.R.; TOTH, I.K. Use of a pooled transposon mutation grid to demonstrate roles in disease development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* putative type III secreted effector (DspE/A) and helper (HrpN) proteins. **Mol Plant Microbe Interact.** Sep;17(9):943-50, 2004.

HUANG, X; MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research.** 9: 868-877, 1999.

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.

HYNES, M.F.; QUANDT, J.; O'CONNELL, M.P.; PÜHLER, A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. [Gene](#). May 15;78(1):111-20, 1989.

IM, W.T.; BAE, H.S.; YOKOTA, A.; LEE, S.T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** , 54: 851-855, 2004.

ISHIKAWA, J.; HOTTA, K. FramePlot: a new implementation of the Frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. **FEMS Microbiol. Lett.** 174: 251-253, 1999.

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

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

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

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

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.** 57: 2284-2288, 2007.

KEGG (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”). Disponível em http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+ko03070. Acesso em 05/12/07.

KIM, J.F.; WEI, Z.M.; BEER, S.V. The *hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. **J. Bacteriol.** 179: 1690-1697, 1997.

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.** , 51: 157-168, 2001.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Can. J. Microbiol.** Ottawa, 43: 887-891, 1997.

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

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

KRAUSE, A.; DOERFEL, A.; GOTTFERT, M. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** Saint Paul, 15: 1228-1235, 2002.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics.** 5:150-163, 2004.

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

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

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

LEE, J. *et al.* HrpZ(Psph) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Jan 2;98(1):289-94, 2001.

LI, C.M. *et al.* The Hrp pillus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ. **EMBO J.** Oxford, 21: 1909-1915, 2002.

LIDELL, M.C.; HUTCHESON, S.W. Characterization of the hrpJ and hrcU operons of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61: similarity with components of enteric bacteria involved in flagellar biogenesis and demonstration of their role in Hairpin_{PPS} secretion. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 7: 488-497, 1994.

LONG, S.R.; STAKAWICZ, B.J. Prokaryotic plant parasites. [Cell](#). Jun 4;73(5):921-35, 1993.

LORANG, J.M., *et al.* Characterization of *avrE* from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: a *hrp*-linked avirulence locus consisting of at least two transcriptional units. [Mol Plant Microbe Interact.](#) Jan-Feb;8(1):49-57, 1995.

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

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

MARIE, C. *et al.* TtsI, a key regulator of *Rhizobium* sp. NGR234, is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. **Mol. Plant-Microbe Interact.** Saint Paul, 17: 958-966, 2004.

MARTIN, G.B.; BOGDANOVA, A.; SESSA, G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annu. Rev. Plant Biol.** 54: 23-61, 2003.

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

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology.** 80: 808-811, 1990.

MUDGETT, M.B.; CHESNOKOVA, O.; DAHLBECK, D.; CLARK, E.T.; ROSSIER, O. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 97: 13324-29, 2000.

NURNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen associated molecular patterns. **Curr. Opin. Plant. Biol.** 5: 318-324, 2002.

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

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

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

PARSOT, C.; HAMIAUX, C.; PAGE, A.L. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. **Curr. Opin. Microbiol.** Oxford, 6: 7-14, 2003.

PATRIQUIN, D. G.; DOBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology.** 42: 1144-1154, 1983.

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

PRESTON, G.M.; BERTRAND, N.; RAINEY, P.B. Type III secretion in plants growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. **Mol. Microbiol.** Salem, 41: 999-1014, 2001.

PUGSLEY, A.P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.** Washington, 57: 50-108, 1993.

PÜLLER, A., *et al.* What can bacterial genome research teach us about plant-bacteria interactions? **Curr. Opin. Plant Biol.** 7: 137-147, 2004.

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

RAHME, L.H.; MINDRINOS, M.N.; PANOPOULOS, N.J. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **J. Bacteriol.** Washington, 174: 3499-3507, 1992.

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

REZZONICO, F.; DÉFAGO, G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Comparison of ATPase-encoding Type III Secretion System *hrcN* Genes in Biocontrol Fluorescent Pseudomonads and in Phytopatogenic Proteobacteria. **App. Env. Microbiol.** 70: 5119-5131, 2004.

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

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, 56: 1341-1348, 2006.

REINHOLD-HUREK, B., HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends Microbiol**. Apr;6(4):139-144, 1998.

SALANOUBAT, M. et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**. v. 415(6871), p. 497-502, 2002.

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

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infect. Immun**. Washington, 69: 3523-3535, 2001.

SCHREINER, V.O. Seqüenciamento dos genes envolvidos na patogenicidade da bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Tese de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Departamento de Bioquímica, UFPR. 42p. 2007.

SLATER, H. et al. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signaling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. **Mol. Microbiol**. Salem, 38: 986-1003, 2000.

SILVA, V.C.H. Expressão e purificação de proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III de *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba, p. 150, 2008.

SOUZA, E.M. Clonagem, caracterização e seqüenciamento dos genes nifA e nifB de *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-

Graduação em Ciências-Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba, p. 260, 1990.

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

STOCK, A.M.; ROBINSON, V.L.; GOUDREAU, P.N. Two-component signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.** Palo Alto, 69: 183-215, 2000.

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

SUGIO, A.; YANG, B.; WHITE, F.F. Characterization of the *hrpF* pathogenicity peninsula of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Mol Plant Microbe Interact**. Jun;18(6):546-54, 2005

THANASSI, D.G.; HULTGREN, S.J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Opin. Cell Biol.** v.12, p.420-430, 2000.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CULTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Res.** Germany, 22: 4673-80, 1994.

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

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

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, 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.** 53: 1979-1983, 2003.

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

VIPREY, V. *et al.* Symbiotic implications of Type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol. Microbiol.** Salem, 28: 1381-1389, 1998.

XIAO, Y.; HEU, S.; YI, L.U.; HUTCHESON, S.W. identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hip* and *hrmA* genes. **J. Bacteriol.** 176: 1025-1036, 1994.

ZENG, S.Y.; HU, J.; HUANG, G.X., HE, C.Z. Identification of a *hrp*-associated gene *hpaB* in the role of pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Wei Sheng Wu Xue Bao.** Jun 4;47(3):402-6, 2007.

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

WEBER, E.; KOEBNIK, R. Domain structure of HrpE, the Hrp pilus subunit of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **J. Bacteriol.** 187: 6175-86, 2005.

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

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

WENGELNIK, K. *et al.* Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* esencial for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **J. Bacteriol.** Washington, 178: 1061-1069, 1996.

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

APÊNDICE I – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA Hpa4 DE *H. rubrisubalbicans* E PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	----- MKRSGDIGAASSSRAASHSPLQPTQPEGVAPPREEHADFMPTGPLLGLPS
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	----- SSAALRSRRTSLSGRAKPHADYTEEVMSQVQEINEPAGPAAAATYAERST
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	----- AAAAKVKAQLRARLDALPFAAPSKEQTALQAAYLQWADARVQERITAFGP
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	----- DAGYQAVGDMKTAGIKAALPIAYQCLRSFILGAMRNPVGLATGAAYAARR
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	--LNTEFSSTMIGGAVGGATAYMAEVWLL EAMDRRASLLNLARLDPVVDH PVDAEELSTVMVSGIAAGSASYTSDTLIPAMDRRTRVANMPKFAQVDPK *:*:*:*:* ..*:*:* ..* : ***** : *:*:*:*:* :
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	LLAPDPGPVRLRLVNGTKEYWCPASDDDDGHAERKDDADPSLPHSDPT ILEPDPPIVILEVTAEGKRFRLLGDDD-----APT :* ** * * * : . : * : . : **
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	LTMLKDKAAELRAVCARWQGNIRGK-GMLSWFRPGLNGAFNTARRALSTG LAELKAQTYDRRLVITQRQSNLDDKSLNLTLLKPVINAI FNAARRTGPN * : * * : : * * * : : * : * : * : : * : * : * : * : * : *
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	QLLESPLPVFGTSLAASAGAVSNFTIGMKAI PWISQVRSENLIIGTQT DLLTPAGQLGLSALAI GGAGVVQKALLETGKAVPRTGQTSVPDLVGGEQR :* * . : : : . * * * : : * : * : * : * : * : *
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	LNLFKLTKPQADKPLLSWGDA AFTNYAKDVMWEMKERLRHSINPQRSWR LNLFALALPDKERRPAQWSDAVHFP--PKYLLDTGKEALALARQGVNSAN **** * : * : : . * * * . * . * : : * * * : : * .
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	DFSFQAQDVL RNVALS-AIGSML SAGAGSKLAELARRGDPTPFSGESFRS AIATTVRDLLTRHMLSNVISSFASIGAARI IAAPLRGGSHRPVAGEAANS : : . : * : * * . * : * : * * . : * * * . * : * * : *
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	RPRLQQAESTTYDY----- TAVVAQAVQTMFNDTLWNALKAKNGTNTSQAARLDNEGAALAAEYKRTI . : * * : : *
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	----- KQTIEALAEPVDQAIARLSDQTRAMEEGMRVAPGAWLRGHALRTALQTL
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	----- KEIGTQSVSIATIDAVRTALREKGGQTSRAVPPDAATQALDGQLQTLKRA
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Xanthomonas oryzae</i>	----- LHDSEELRQWQSGRA

APÊNDICE II – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA hopI1 DE *H. rubrisubalbicans* E PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

H. rubrisubalbicans -----
Pseudomonas syringae SMHNVMSFLGVSDSKGKMLFSLGKKLADAMAKPEPGKDNSEATNARHAYFSSNLKLNKLM

H. rubrisubalbicans -----WSGNCTSARRRRQARP-----PCAS
Pseudomonas syringae NDLTQVFNKIRQSNQDRVRRPMPEPFWRPYGAQQARPQTTPGTRPQANSAPPPPKAE
 * :. : * * : *

H. rubrisubalbicans PTTAG-----SVPPVQRPVCFASDRPASSGSGRASTG-----
Pseudomonas syringae PRPASGRPDGAQQARPETPPRTRPQANSTPPPPPKAEPASGRPDGAQQARPETPPR
 * . * . . . * * . : : * * . : : *

H. rubrisubalbicans --WRARQSCRPSGAAEQPCTGRPFPRNQTTT-----ATDTAPWRRCWVRHRNGA
Pseudomonas syringae TRPQTNSTPPPPPKAEPASGRPDGAQQARPETPPRTRPQANSAPPPPKAEPASG
 : : . . : * . * * : * . : * * * : * : * : : * * : : . .

H. rubrisubalbicans RPD-----RPADLPRAGSLASDANRP----AWRRARGPRTGSHRWPSVRPLPEGRKAAG
Pseudomonas syringae RPDGAQQARPETPPRTRPQANSAPPPPKAEPASGRPDGAQQARPETPPRTRPQAN
 * * * * * * * * . . * . * * * * * * * * : : : . . * . * * .

H. rubrisubalbicans RIHWPTIAWRVGPDRSTIAPQRDAGEY-----
Pseudomonas syringae SAPPPPKAEPSAGGERPSTARPNNTSAADTSARVGDSAPAKPPVKPLYEHLGLTMSVD
 * * . * . : * . : * . : . .

H. rubrisubalbicans -----
Pseudomonas syringae LSAVKRAYRDAA

APÊNDICE III – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA AvrE DE *H. rubrisubalbicans* E PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- MLPINNAPVTGQVHGATSQGHNPGLQRPPEPTQRASVSVVQLGKQPVQ
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	-----MPC VPVTQHLDTPPRTLGGSTPGASTSAAAEQVAPTLDADDIAHVSSARRQPG *
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	RRSPTTPTKPPDTLFIAMKNFVGTMPGNSDWPRRASHQARQPEHPSST-A TRSSSTASERPTTALQRELSFKDWLPGQENTPARADHQSSPPQSGGSTPA **.:*.: * * : . * . : **.: * **.: * : . ** *
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	PVALRALVAS----- PIQGRASGTQDASPQSLTRSAAGNAGTFRMENGLERNTPAINLISLD *: ** .: :
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- AKGRPDFHFIPALGNLLKDRLAQPGRSYLAKNSESNRDQVLLLEPKGHL
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- VQIAQTDALALLRSSKPLSVPPGSKPNSLVLQREDHSVNIAGRDSGVQS
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- LPDKAHIAHLSGAHLDSGKHLRLQDEKLYELHPATATWSPSEDSKETT
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- SHLATQGDGKVVYGRGTGLVNLSTTEKNKPEMKLEGLTAHSVSPDGTVM
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- LAGKDTQLQLGEMKVPDMHLTLELNDGKSEAKHVGLTRDRLFVADAEG
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- QLYSAARKDLKSEDLHLQPEKHYQPESPLGKRQQVTGFLSGENGLH
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- ALIKNDIGDTHSHTLDEANSSLRSGWNMTDVVVVENRRGLPEGKVPTPEN
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- TFDLDRNGRVGVVGNRVQKWDATTEGWKDTGVKDIDQLQRGANSSAYVLK
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- DGKISELKVSPENTKTSLSGTHNLNQPTRSTKVEMGDAIEGLDDRVIKAF
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- AMLNDKQFAAVDDQGRLETAHHTGPELTEL SRKDL SGEVASLTLDENHNLH
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- ATTTAGELYFMAKDDWQAPESAPKPAKWQKIDTPGNRPVDSIRKEDNNT
<i>H. rubrisubalbicans</i> <i>Pseudomonas viridiflava</i>	----- VSVKLDGAPDEGSFALKDKKFQPMERKEPENGLNLFGRLLDDGSKNVK

APÊNDICE IV – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GALA DE *H. rubrisubalbicans* E PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* MKPVAVPGVQSSSAADGVRAPSADAQPGPPAGPARPARSAAGSSLLQGLA
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* -----MRAPSADAQPGPPAGPARPARSAAGSSLLQGLA
GALA *H. rubrisubalbicans* -----

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* QLLSLCQPRPARPLPQLPPDIFREIARRSDPLTVQRLRVASKPVKAAIEA
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* QLLSLCQPRPARPLPQLPPDIFREIARRSDPLTVQRLRVASKPVKAAIEA
GALA *H. rubrisubalbicans* ----ERITKLNLDENHIGQEIALLIADRLMGRLRELSASDNFLGQEGAQA
 .: .: :* ** * : . : . : *

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* DMRELVIKDRAGLAGVLRAGNYPALEKLTLAGTFTDDDLRGLPASLKALD
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* DMRELVIKDRAGLAGVLRAGNYPALEKLTLAGTFTDDDLRGLPASLKALD
GALA *H. rubrisubalbicans* LARKLANSRLESLN--LEGNHIGSSGAIATAATLPQSDLSLNISSNHID
 *: * . . * *...: : :*: *.*: .** * * : :*

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* LSRCRGSITAAGIAHLSRLPLVRLNVRNKRIGAEGARLLANHPTLTSLN
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* LSRCRGSITAAGIAHLSRLPLVRLNVRNKRIGAEGARLLANHPTLTSLN
GALA *H. rubrisubalbicans* GNGCR-----AIFLMMNRSALTQLNIGGNQIDMDAAIALTN-----
 . ** * : :.* *.*:** : :*: .:* **:

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* SNGRIGPEGAQALAANTRLTTLNVSGNRIGVAGAKALAAANQTLRSLDVSD
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* SNGRIGPEGAQALAANTRLTTLNVSGNRIGVAGAKALAAANQTLRSLDVSD
GALA *H. rubrisubalbicans* ---AIPGSGIKKLDLN-----NTGINKLGGTLLAERFKESALTDLKLGT
 * . * : * * *.. *: **: : :*: .*.. :

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* NRIGDEGARELAECTQLTTLNANRNGIGVDGATALAASRTLTSIAIGGNE
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* NRIGDEGARELAECTQLTTLNANRNGIGVDGATALAASRTLTSIAIGGNE
GALA *H. rubrisubalbicans* NPLSDEGLTVNVALPESMLTSIQLSRCHLGRASVLG---LADALPFSKL
 * :.***. :. . : * : : . * : : . * : . : :

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* IGDAGVLALAAANARLTTLNVESTGVGADGVKALAASKTLTWLRLDGNDIG
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* IGDAGVLALAAANARLTTLNVESTGVGADGVKALAASKTLTWLRLDGNDIG
GALA *H. rubrisubalbicans* KWLALDEVRLTNDCVSAFAEALSSSKVERLHLDGAALTTNGLRVLTEKIP
 * . : * : : : . . : : : . * : * . ** : : *

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* NAGATALAASTSLTTLHLEHSRIGAEQAQAANTKLTTLDLGYNDIGDA
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* NAGATALAASTSLTTLHLEHSRIGAEQAQAANTKLTTLDLGYNDIGDA
GALA *H. rubrisubalbicans* NS-----ALCQLSLARNMIGDAGAEIIGGSLKNSKLTDLTDANGIGNN
 * : * . * : : . *** . * : ** * * . * : ** :

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* GVRALS---ANATLVLSVRRNLEDASAVSLAAGKTLT---TLDISGNG
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* GVRALS---ANATLVLSVRRNLEDASAVSLAAGKTLT---TLDISGNG
GALA *H. rubrisubalbicans* GLVALTSILENSSLLRLSLAANRISSAGITALAARLPLSRLTNLDLSENF
 * : ** : * : ** : ** : * : . . * . * : ** : * : ** : *

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* IQDQGAKALA---ANPTLTTLDVSSNDIKNAGARALAAANARLVSLDLRNN
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* IQDQGAKALA---ANPTLTTLDVSSNDIKNAGARALAAANARLVSLDLRNN
GALA *H. rubrisubalbicans* VRDDGATALAGAITASQLTNLSLLGNEISNLGAIQLAN-----GV
 : : * : ** . * : . * : * : . * : * : ** * * * .

GALA 5 *Ralstonia solanacearum* RMEESGTRALLANRTLSSSLGVSLNCCGQHLLIAELMAWANHNGVTMRH
 GALA 3 *Ralstonia solanacearum* RMEESGTRALLANRTLSSSLGVSLNCCGQHLLIAELMAWANHNGVTMRH
GALA *H. rubrisubalbicans* MHSKLMHLDLSENQEINAEGFAALEVRRRIKPPQIYLE-----
 . : * * : : * : : : * : : :

APÊNDICE V – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA HrpB DE *H. rubrisubalbicans* E PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

Burkholderia pseudomallei -MSSERYIQLIQDLCATVGLAN---VDNVLEARTIEVEGFDVRLDCFSD
Ralstonia solanacearum -MSLEQRDALVRDMCAHLGIPD---AEAILAAGRLTVEGFDVIIDAVEDD
Xanthomonas oryzae -MSSARFETIVRQMCESLDLPD---VESVLSRRVLWEGFEVYLHLPPTQ
Herbaspirillum rubrisubalbicans **MEKDIPYRRLDDLCQRANISASNYREDFYVADIKVDDVDFSLMPGSDE**
Pseudomonas_syringae MNRNDAYHTLISEICALSLISE---PERFYESANFKISDVDFTLHYQDRD
 :::* :. :. :..... : :

Burkholderia pseudomallei A-----EAMYANFHFGTVTAGRTLTVFRLMLEANLLVYAQDQ-AQLGID
Ralstonia solanacearum P-----AAFYLNFDYGIVTGGRTLRFVRLMLEANLTIYAQDH-AQLGLD
Xanthomonas oryzae PGDDAQEALYLRIAYGLPPAGRTLTVFRLLEANLSVYAQDQ-AQLGLN
Herbaspirillum rubrisubalbicans **N-----AGALLFFGDFGVIPLEFEAIAMRRLLEANLVMMGVGR-PNFGIN**
Pseudomonas_syringae E-----GRAILLYGDMGALPARNRDSALLALMDINFHMFSGAHSPAFSWN
 *: * . : :*: : . : . : :

Burkholderia pseudomallei TNTGGVILIIIRLPFSLGIDGQGLADLLAHYAEHGRYWRQSIIESSDE-MF
Ralstonia solanacearum GDTGGIILIVRVAYAPDLNGEQLAELLGHYAEHGRYWRDNILQTTDD-MF
Xanthomonas oryzae -DNGVIVLIVRVPLDDVDGAWICDLLAHYAEHGRYWNNNIFVAHDE-MF
Herbaspirillum rubrisubalbicans **FSTGHVLLSGAVQIAD-MDGEKLLDMLHHYADKANTWRRSYFMLDEERQK**
Pseudomonas_syringae AQTGRVLLMGSIGLER-ATAEGLLLMKSFADLAREWREHGFMGPVGAAG
 .* :*: : . : : :*: .. * . :

Burkholderia pseudomallei EGIASGEYFWLRA-----
Ralstonia solanacearum ESLSNGTYLWIRA-----
Xanthomonas oryzae EGIATGNLWLRA-----
Herbaspirillum rubrisubalbicans **SGFFSPERDRMMKQFERTSTNF-**
Pseudomonas_syringae APVNMPASQATTRDTPASSGRFQ

