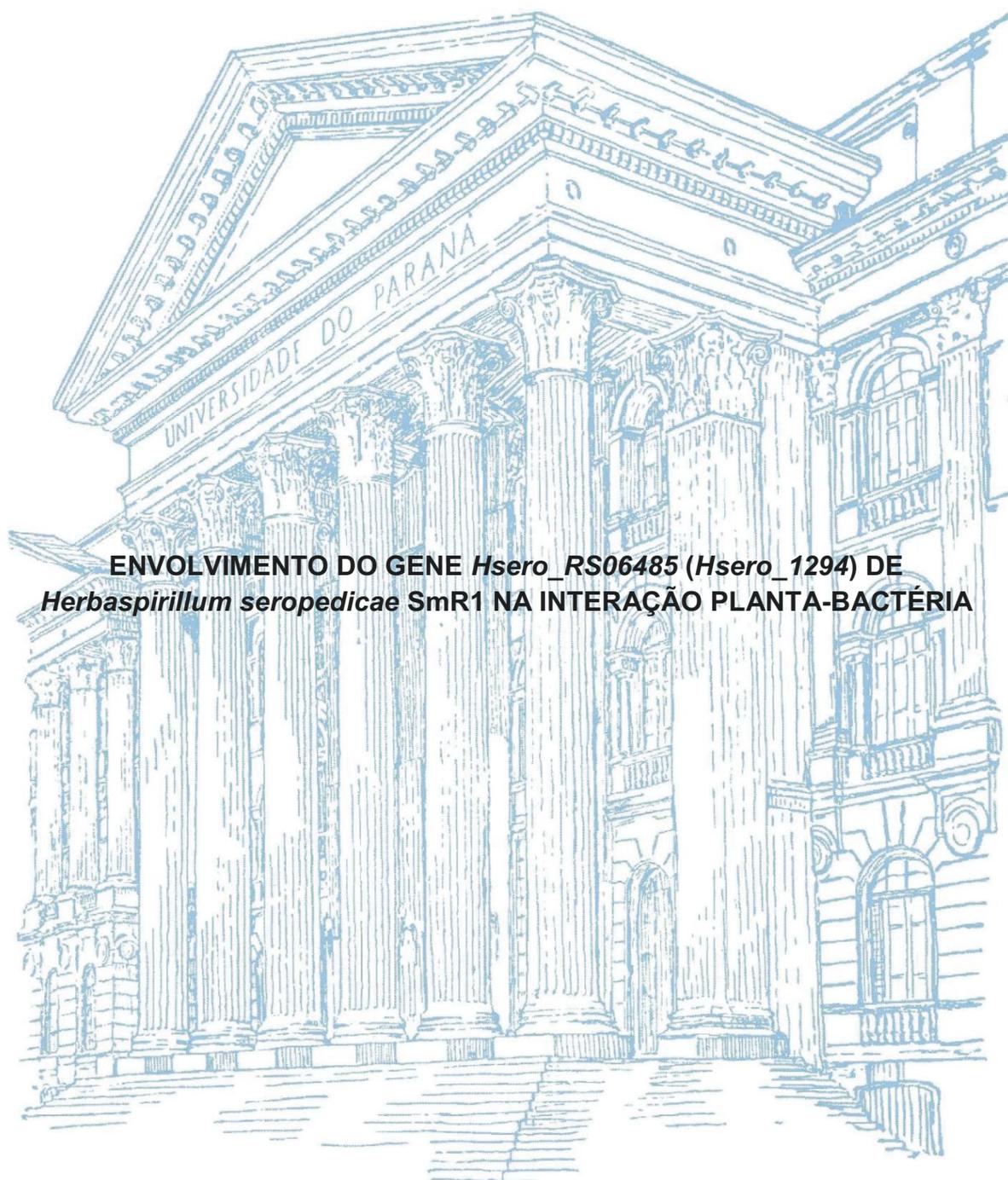


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIA LIEBL



**ENVOLVIMENTO DO GENE *Hsero\_RS06485* (*Hsero\_1294*) DE  
*Herbaspirillum seropedicae* SmR1 NA INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA**

CURITIBA

2018

JULIA LIEBL

**ENVOLVIMENTO DO GENE *Hsero\_RS06485* (*Hsero\_1294*) DE  
*Herbaspirillum seropedicae* SmR1 NA INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rose Adele Monteiro

Coorientadora: Dr<sup>ª</sup>. Vânia Carla Silva Pankiewicz

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Liebl, Julia

Envolvimento do gene *Hsero\_RS06485* (*Hsero-1294*) de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 na interação planta-bactéria. / Julia Liebl. – Curitiba, 2018.  
93 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Rose Adele Monteiro

Co-orientadora: Vânia Carla Silva Pankievicz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Herbaspirillum. 2. Biofilme . 3. Hemaglutininas. I. Título II. Monteiro, Rose Adele. III. Pankievicz, Vânia Carla Silva. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 576.162



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA)

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JULIA LIEBL** intitulada: **ENVOLVIMENTO DO GENE *Hsero\_RS06485 (Hsero\_1294)* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 NA INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Março de 2018.

*Rose Adele Monteiro*  
ROSE ADELE MONTEIRO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

*Thalita Regina Tuleski*  
THALITA REGINA TULESKI

Avaliador Externo (UFPR)

*Ana Claudia Bonatto*  
ANA CLAUDIA BONATTO

Avaliador Externo (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé, sabedoria e por todas as oportunidades que tem colocado na minha vida;

Aos meus pais, pelo amor, pelo incentivo e por todos os sacrifícios que fizeram para que eu conseguisse concluir esta etapa.

Ao meu noivo, que esteve ao meu lado em todas as etapas e obstáculos enfrentados nessa jornada. Pela sua paciência, amor e apoio.

Aos meus irmãos por toda ajuda e por partilharem de suas experiências.

Aos meus familiares, que acreditam no meu progresso e não medem esforços para que eu o alcance.

A minha orientadora Rose Adele Monteiro, por suas valiosas contribuições e pela confiança em mim depositada.

A minha coorientadora Vânia Carla Silva Pankiewicz, pelo seu incentivo, pela sua disponibilidade por toda a ajuda na elaboração deste trabalho.

A Universidade Federal do Paraná, por todo crescimento intelectual e profissional.

Aos técnicos do grupo de Fixação de Nitrogênio, por todo auxílio para realização do projeto.

Aos colegas e amigos do laboratório, por toda ajuda, companheirismo e sugestões.

A todos os meus amigos, pelo incentivo, carinho, companheirismo e confiança.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudos que me permitiu realizar este sonho.

Ao FINEP, por ter me proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho acadêmico.

Ao programa de pós-graduação em Ciências (Bioquímica).

A todas as pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, enriqueceram o meu aprendizado.

*"Não deixe que os seus medos tomem  
o lugar dos seus sonhos." Walt Disney*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Benefícios da interação entre planta-bactéria .....	22
FIGURA 2 - Micrografia eletrônica de transmissão de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> . .....	23
FIGURA 3 - Colonização de plantas por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> . .....	24
FIGURA 4 - Modelo estrutural da adesina FhaB de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1. ....	30
FIGURA 5 - Representação esquemática dos passos que uma nova espécie bacteriana assume a formação de um biofilme em uma rocha previamente colonizada com múltiplas espécies de bactérias. ....	33
FIGURA 6 – Esquema de desinfecção das sementes, inóculo das plântulas e plantio hidropônico em tubo de ensaio. ....	43
FIGURA 7 – Esquema do ensaio de adesão em plântulas de arroz. ....	44
FIGURA 8 – Esquema do ensaio de colonização epifítica de raízes de arroz por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> . ....	44
FIGURA 9 – Esquema do ensaio de colonização endofítica de raízes de arroz por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> . ....	45
FIGURA 10 - Representação esquemática dos domínios da proteína Hemaglutinina Filamentosa do gene <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> . ....	53
FIGURA 11 - Modelo estrutural teórico da proteína hemaglutinina filamentosa (FHA) de <i>H. seropedicae</i> . ....	54
FIGURA 12 - Confirmação do plasmídeo pTZ1294. ....	55
FIGURA 13 – Esquema da obtenção do mutante no gene <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> . ....	56
FIGURA 14 - Confirmação do plasmídeo pTZ1294Km. ....	56
FIGURA 15 - Confirmação do plasmídeo pSUP1294Km. ....	57
FIGURA 16 - Curva de crescimento das estirpes de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e <i>Hsero_1294</i> . ....	58
FIGURA 17 - Formação de biofilme em microplaca. ....	59
FIGURA 18 - Capacidade das estirpes selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> em formar biofilme em microplaca após 24 horas de inoculação. ....	59

FIGURA 19 - Capacidade das estirpes selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> em formar biofilme em microplaca após 48 horas de inoculação.....	60
FIGURA 20 - Ensaio quantitativo da formação de biofilme em fibra de vidro da estirpe selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> .....	61
FIGURA 21 – Ensaio qualitativo da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> após 24 horas de inoculação.....	61
FIGURA 22 – Ensaio qualitativo da formação de biofilme em fibra de vidro da estirpe selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> após 48 horas de inoculação .....	62
FIGURA 23 – Ensaio qualitativo da formação de biofilme em fibra de vidro da estirpe selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> após 72 horas de inoculação .....	62
FIGURA 24 – Ensaio qualitativo da formação de biofilme em fibra de vidro da estirpe selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> após 96 horas de inoculação .....	63
FIGURA 25 - Adesão e colonização de raízes de arroz pelas estirpes selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_129</i> de <i>H. seropedicae</i> ..	65
FIGURA 26 – Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz após 30 minutos de inoculação .....	65
FIGURA 27 – Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 1 d.a.i .....	66
FIGURA 28 – Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 3 d.a.i. ....	66
FIGURA 29 – Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 7 d.a.i. ....	67
FIGURA 30 – Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 10 d.a.i. ....	67
FIGURA 31 – Microscopia confocal de fluorescência do efeito do vortex na recuperação da estirpe selvagem SmR1 de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 1 d.a.i .....	69

FIGURA 32 – Microscopia confocal de fluorescência do efeito do vortex na recuperação da estirpe mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 1 d.a.i. ....	69
FIGURA 33 - Ensaio de competição entre as estirpes selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz.....	71
FIGURA 34 - Ensaio de competição entre as estirpes selvagem SmR1 e mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de trigo.....	72
FIGURA 35 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz após 30 minutos de inoculação.. ....	73
FIGURA 36 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 1 d.a.i. ....	73
FIGURA 37 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 3 d.a.i. ....	74
FIGURA 38 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 7 d.a.i. ....	75
FIGURA 39 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de <i>H. seropedicae</i> colonizando raízes de arroz 10 d.a.i. ....	75
FIGURA 40 - Eletroforese das frações de membrana da estirpe mutante <i>Hsero_1294</i> de <i>H. seropedicae</i> por SDS-PAGE 7,5-15%.. ....	77
FIGURA 41 - Perfil eletroforético do LPS das estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	81

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS. ....	37
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFbHP-MALATO .....	38
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO LB .....	38
TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADOS NAS CULTURAS.....	39
TABELA 5 - SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS PLANT MEDIUM.....	42
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DO GEL DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DESNATURANTE DE PROTEÍNAS.....	49
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO GEL DE EMPILHAMENTO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS .....	49
TABELA 8 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DO MUTANTE <i>Hsero_1294</i> DE <i>H. seropedicae</i> POR ESPECTROSCOPIA MALDI-TOF.....	78

## LISTRA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP – Adenosina 5'-trifosfato  
ADP – Adenosina 5'-difosfato  
APS – Persulfato de amônio  
BPCP - Bactérias promotoras de crescimento de planta  
BPCV – Bactérias promotoras de crescimento vegetal  
d.a.i. – Dias após a inoculação  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
D.O – Densidade ótica  
EPS – Exopolissacarídeo  
FBN – Fixação biológica de nitrogênio  
FHA – Hemaglutinina filamentosa  
GFP – “Green fluorescent protein”  
Km – Canamicina  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MS – Espectrometria de massa  
ORF – “Open Reading frame”  
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida  
Pb – Pares de base  
PGPR – “Plant growth promoting rhizobacteria”  
Pi – Fosfato inorgânico  
PVC – Policloreto de polivinila  
r.p.m – Rotações por minuto  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
Sm – Estreptomicina  
Tc – Tetraciclina  
TEMED – N'-Tetrametiletlenodiamina.

TRIS – Aminometilidenotrimetanol

UFC – Unidades formadoras de colônias

## RESUMO

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são importantes para reduzir problemas ambientais e custos na agricultura. As BPCVs promovem o crescimento através da produção de fitohormônios, proteção de plantas hospedeiras contra fitopatógenos e fixação biológica de nitrogênio. *Herbaspirillum seropedicae* é um importante microrganismo endofítico capaz de estabelecer associação com várias culturas de interesse comercial. Vários mecanismos e moléculas de superfície bacteriana foram propostos como mediadores da interação planta-bactéria. As hemaglutininas filamentosas (FHA) são adesinas que podem contribuir para a ligação das bactérias ao hospedeiro. Desta forma, o objetivo desse trabalho é determinar se o gene *Hsero\_1294*, que codifica para uma hemaglutinina, está envolvido na interação planta-*H. seropedicae*. Para isso, a estirpe mutante *Hsero\_1294* foi testada quanto à capacidade de formar biofilme em microplaca e fibra de vidro, e a capacidade de aderir e colonizar plântulas de arroz. A estirpe mutante *Hsero\_1294* apresentou maior adesão em raízes de arroz após 30 minutos de inoculação quando comparadas a estirpe selvagem. A estirpe mutante também pode ser mais eficiente na adesão quando co-inoculada com a estirpe selvagem. Observamos também que a estirpe mutante *Hsero\_1294* tem maior capacidade de formação de biofilme do que a estirpe selvagem. Nossos resultados indicam que as mutações que eliminam a produção de uma determinada molécula de superfície podem influenciar a produção e a presença de outros componentes da superfície bacteriana, dificultando a identificação da molécula específica da superfície diretamente responsável pelas mudanças observadas. Como conclusão, a mutação no gene *Hsero\_1294* aumenta a adesão de *H. seropedicae* às raízes de arroz e a formação de biofilme.

Palavras-chave: *H. seropedicae*, bactérias promotoras de crescimento vegetal, interação planta-bactéria, biofilme, adesina, hemaglutinina.

## ABSTRACT

Plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) are important to reduce environmental problems and costs in agriculture. PGPRs promote growth through the production of phytohormones, protection of host plants against phytopathogens, and biological nitrogen fixation. *Herbaspirillum seropedicae* is an important endophytic microorganism capable of establishing association with several crops of commercial interest. Several mechanisms and bacterial surface molecules have been proposed as mediators of plant-bacterial interaction. Filamentous hemagglutinins (FHA) are adhesins that may contribute to the attachment of bacteria to the host. Thus, the objective of this work was to determine if *Hsero\_1294* gene, which encodes to a hemagglutinin, is involved in plant-*H. seropedicae* interaction. For this, *Hsero\_1294* mutant strain was tested for the ability to form biofilm on microplate and fiberglass, and the ability to attach and colonize rice. *Hsero\_1294* mutant strain showed a higher adhesion of rice roots after 30 minutes of inoculation when compared to the wild type strain. The mutant strain can also be more efficient in adhesion when co-inoculated with the wild type strain. We also observed that the *Hsero\_1294* mutant strain has a higher capacity of biofilm formation than the wild type strain. Our results indicate that mutations that eliminate the production of a particular surface molecule may influence the production and presence of other components of the bacterial surface, making it difficult to identify which specific surface molecule is directly responsible for the observed changes. In conclusion, mutation in *Hsero\_1294* gene enhances *H. seropedicae* adhesion to rice roots and biofilm formation.

Key Words: *H. seropedicae*, plant growth promoting rhizobacteria, plant-bacteria interaction, biofilm, adhesin, hemagglutinin.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO .....	19
2.2. BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL.....	20
2.3. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	22
2.4. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA .....	25
2.5. ADESÃO BACTERIANA ÀS RAÍZES DE PLANTAS .....	27
2.6. FORMAÇÃO DE BIOFILME .....	31
3. JUSTIFICATIVA .....	34
4. OBJETIVOS .....	36
5. MATERIAS E MÉDODOS .....	37
5.1. BACTÉRIAS.....	37
5.2. MEIOS DE CULTIVO PARA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	37
5.3. MEIOS DE CULTIVO PARA <i>Escherichia coli</i> .....	38
5.4. ANTIBIÓTICOS.....	39
5.5. MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS .....	39
5.6. CURVA DE CRESCIMENTO .....	40
5.7. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MICROPLACA .....	40
5.8. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO .....	41
5.9. ENSAIOS <i>in planta</i> .....	41
5.9.1. Cultivares vegetais .....	41
5.9.2. Desinfecção da superfície das sementes de arroz.....	41
5.9.3. Cultivo de plantas em sistema hidropônico e inoculação com as estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	42
5.9.4. Preparação dos inóculos de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	43

5.9.5. Ensaio de adesão das estirpes de <i>H. seropedicae</i> às raízes de arroz.....	43
5.9.6. Ensaio de colonização epifítica das raízes de arroz pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	44
5.9.7. Ensaio de colonização endofítica das raízes de arroz pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	45
5.9.8. Ensaio de competição pela colonização de arroz entre as estirpes de <i>H. seropedicae</i> .....	45
5.10. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> EM RAÍZES DE ARROZ .....	46
5.10.1. Conjugação bacteriana.....	46
5.10.2. Microscopia confocal de fluorescência .....	46
5.11. EXTRAÇÃO RÁPIDA DE LPS DAS ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> PARA VERIFICAÇÃO DE FENÓTIPO POR SDS-PAGE .....	47
5.12. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MEMBRANA EXTERNA DA ESTIRPE MUTANTE <i>Hsero_1294</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	48
5.12.1. Purificação de proteínas da membrana externa de <i>H. seropedicae</i> .....	48
5.12.2. Separação de proteínas de membrana externa por SDS-PAGE..	48
5.12.3. Identificação das proteínas da membrana externa da estirpe mutante de <i>H. seropedicae</i> por espectroscopia de massa (MALDI-TOF) .	50
5.13. ANÁLISE <i>in silico</i> .....	50
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
6.1. PROTEÍNA HEMAGLUTININA FILAMENTOSA DE <i>H. seropedicae</i> ..	52
6.2. ESTIRPE MUTANTE DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 NO GENE <i>Hsero_1294</i> .....	54
6.3. CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE <i>Hsero_1294</i> .	57
6.4. A MUTAÇÃO NO GENE <i>Hsero_1294</i> AUMENTA A FORMAÇÃO DE BIOFILME EM <i>H. seropedicae</i> .....	58

6.5. MUTAÇÃO NO GENE <i>Hsero_1294</i> NÃO ALTERA A CAPACIDADE DO <i>H. seropedicae</i> COLONIZAR RAÍZES DE ARROZ E AUMENTA A ADESÃO.....	64
6.6. A ESTIRPE MUTANTE <i>Hsero_1294</i> DE <i>H. seropedicae</i> É MAIS COMPETITIVA QUE A ESTIRPE SELVAGEM SmR1 EM COLONIZAR EPIFITICAMENTE E ENDOFITICAMENTE RAÍZES DE ARROZ .....	70
6.7. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DA ESTIRPE MUTANTE <i>Hsero_1294</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	76
6.8. MUTAÇÃO NO GENE <i>Hsero_1294</i> ALTERA O PERFIL DE LPS DE <i>H. seropedicae</i> .....	80
7. CONCLUSÃO .....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda de consumo de alimentos gerada pelo aumento populacional tem levado os pesquisadores a buscar alternativas que reduzam o custo de produção e aumentem a produtividade. Considerando que a perspectiva é que a população global continuará crescendo, podendo chegar a 9 bilhões de pessoas até 2050, torna-se essencial um aumento na produção, diminuição nos custos e utilização de técnicas de menor impacto ecológico para atender a demanda global de forma sustentável (GODFRAY *et al.* 2012). O aumento na produtividade agrícola está diretamente relacionado com o aumento na absorção de nitrogênio inorgânico. Para se elevar a produção de alimentos tem se aumentado a utilização de fertilizantes no solo, que tem por consequência um aumento nos custos da produção e o meio ambiente está cada vez mais contaminado com uma gama de metais tóxicos e compostos orgânicos (GLICK, 2012). Com níveis de industrialização cada vez maiores, é claro que, nos próximos anos haverá um desafio significativo para alimentar todas as pessoas do mundo, um problema que apenas aumenta com o tempo. O mundo precisa começar a aumentar consideravelmente a produtividade agrícola e fazê-lo de forma sustentável e ambientalmente amigável. Os custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização deste fertilizante sem que haja diminuição da produção. Para reduzir o uso destes fertilizantes químicos uma alternativa é o aproveitamento eficiente do nitrogênio atmosférico (STOLTZFUS *et al.*, 1997). Dessa forma tem sido proposta a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) que são organismos capazes de fixar nitrogênio, solubilizar fosfatos, produzir hormônios vegetais, além de outros efeitos benéficos para a planta, constituindo assim, uma alternativa biotecnológica para contornar esses problemas, aumentando a produção e diminuindo os danos e custos (GLICK, 2012).

*Herbaspirillum seropedicae* é um exemplo de BPCV. Essa associação é, na maioria dos casos, mutuamente benéfica. Enquanto as bactérias têm acesso aos nutrientes liberados pelas raízes, a planta pode se beneficiar da secreção de fitohormônios e da fixação biológica de nitrogênio pela bactéria

(BALSANELLI *et al.*, 2016). Experimentos em campo mostraram que a inoculação de *H. seropedicae* em arroz fornece pelo menos 15% do nitrogênio requerido pela planta (BALDANI *et al.*, 2000). Contudo, a capacidade da bactéria induzir o crescimento vegetal depende intimamente da sua interação com o hospedeiro. O primeiro mecanismo que contribui para a associação do *H. seropedicae* com plantas é a atração dos microrganismos em direção às raízes, seguida da sua adesão na superfície radicular. Após a adesão, uma população epifítica começa a desenvolver-se juntamente com a penetração de algumas bactérias para os tecidos internos da raiz e consequente desenvolvimento de uma população endofítica (MONTEIRO *et al.*, 2012b). O *H. seropedicae* pode ser utilizado como biofertilizante e, por isso, vários estudos têm sido realizados com esse microrganismo. Entretanto, dados moleculares sobre a interação entre *H. seropedicae* e plantas de interesse comercial ainda são escassos.

Nos últimos anos muitos esforços têm sido feitos para melhor entender os mecanismos relacionados com a promoção de crescimento vegetal induzida por BPCV (GLICK, 2012), contudo, poucos estudos em nível molecular foram realizados até hoje. Assim, o uso de abordagens capazes de caracterizar aspectos específicos desta interação possibilita a compreensão dos mecanismos de colonização, visando uma melhor aceitação desses organismos como eficazes na prática de manejo na agricultura comercial.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para a sobrevivência da planta. Ele é encontrado em abundância no ar atmosférico (cerca de 80%) na forma de nitrogênio molecular ( $N_2$ ), porém esta forma não é acessível às plantas. As plantas absorvem o nitrogênio disponível no solo através de suas raízes na forma de amônio e nitratos. Apenas alguns procariotos são capazes de usar nitrogênio atmosférico através de um processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN), que é a conversão de  $N_2$  atmosférico em  $NH_3$ , que pode então, ser assimilado por outros organismos (FRANCHE *et al.*, 2009).

O crescimento da população mundial e o crescimento econômico dos países em desenvolvimento levam a um aumento da necessidade de alimentos e conseqüentemente à intensificação da agricultura. Desta forma, a disponibilidade de nitrogênio fixado é frequentemente o fator limitante para a produtividade agrícola, e desta forma há uma crescente demanda por fertilizantes nitrogenados para suplementar as lavouras (GLICK, 2012). No entanto, os fertilizantes químicos constituem um dos mais altos custos da agricultura, além de causar grandes danos ambientais. A produção de fertilizantes nitrogenados requer grandes quantidades de fontes de energia não renováveis e produz  $CO_2$ , um gás de efeito estufa (STOLTZFUS *et al.*, 1997). Quando aplicados no solo, apenas metade do nitrogênio é assimilado pela cultura e o restante é perdido através da desnitrificação ou lixiviação, podendo implicar na poluição ambiental e perigos à saúde (DOBBELAERE *et al.*, 2002). Portanto, os custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização destes fertilizantes sem que haja diminuição da produção. Neste contexto a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio se apresenta como uma opção natural para a manutenção da fertilização de plantas de interesse comercial.

## 2.2. BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

A rizosfera é a zona do solo que envolve a raiz da planta onde a biologia e a química do solo sofrem influência das raízes. Os exsudados das raízes incluem aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos, açúcares, mucilagem e proteínas que sustentam o desenvolvimento e a atividade de comunidades bacterianas, incluindo microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014).

Bactérias diazotróficas são microrganismos capazes de fixar nitrogênio. Através do complexo enzimático da nitrogenase, estas bactérias convertem o nitrogênio atmosférico em amônia, uma forma assimilável pela planta. O complexo da nitrogenase é altamente conservado em diazotrofos de vida livre, que são capazes de fixar N<sub>2</sub> independente de um hospedeiro, e em diazotrofos simbióticos que dependem do estabelecimento de uma interação com o hospedeiro vegetal (SANTI *et al.*, 2013).

Os genes relacionados à fixação de nitrogênio são chamados genes *nif*. Eles incluem os genes estruturais da maquinaria da nitrogenase, genes necessários para a biossíntese dessa enzima e os genes regulatórios. O complexo enzimático da nitrogenase é formado por metaloenzimas com estruturas conservadas e mecanismos característicos (REES e HOWARD, 2000) e catalisa a reação:



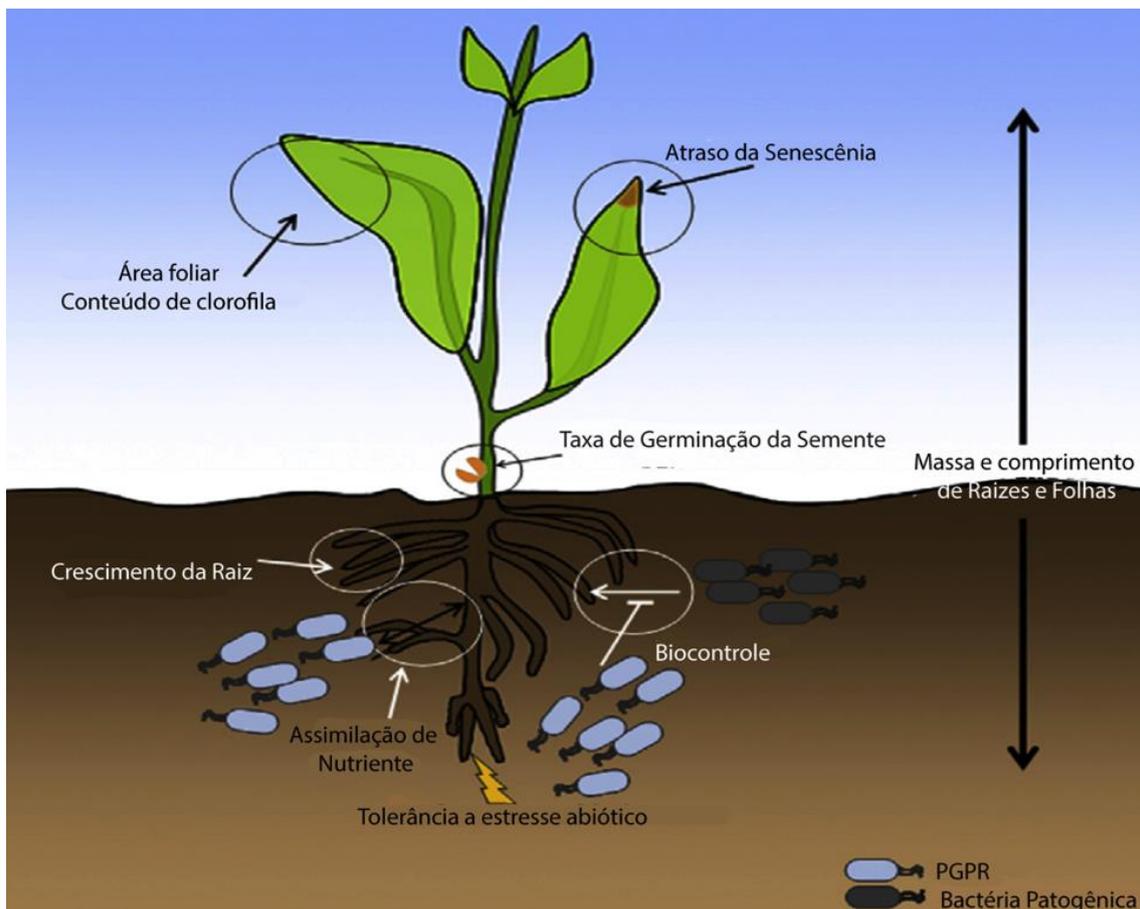
As bactérias diazotróficas promovem o crescimento vegetal por outros mecanismos além da fixação de nitrogênio para a planta, como produção de hormônios, vitaminas e fatores de crescimento, que estimulam o crescimento vegetal principalmente das raízes, atuando na maior absorção de nutrientes e água. Além disso, estimulam outros efeitos benéficos na saúde e crescimento das plantas, como a supressão de agentes patogênicos (BABALOLA, 2010), aumento na taxa de germinação de sementes, crescimento de raiz, aumento da área foliar, teor de clorofila, teor de proteínas, tolerância ao estresse abiótico, comprimento e peso de raiz e folhas, biocontrole e adiamento da senescência vegetal (Figura 1) (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014). Desta forma, bactérias ou

rizobactérias que promovem o crescimento da planta, através do aumento da absorção de nutrientes são chamadas biofertilizantes.

O termo plant-growth promoting rhizobacteria - PGPR (em português BPCP - Bactérias Promotoras do Crescimento de Planta) foi usado pela primeira vez por Kloepper e Schroth (1978) para descrever as bactérias do solo que colonizam a rizosfera, crescendo internamente ou ao redor dos tecidos vegetais, sendo capazes de estimular o crescimento da planta através de diversos mecanismos. Essas bactérias são caracterizadas também por colonizar raízes sem causar doenças à planta (PÜHLER *et al.*, 2004).

Os efeitos das bactérias promotoras de crescimento vegetal fornecem um aumento no rendimento das culturas e, por isso, inoculantes contendo BPCV estão comercialmente disponíveis para uma variedade de culturas. Atualmente a utilização desses inoculantes tem aumentado em consequência de pesquisas que mostram sua eficiência, contribuindo para a crescente aceitação no uso desses tratamentos biológicos na agricultura e aumento do mercado de inoculantes.

Dentre as BPCV se encontram fixadores de nitrogênio dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Rhizobium*, e *Herbaspirillum* (revisado por MONTEIRO *et al.*, 2012b). Dentre as BPCV com potencial uso como biofertilizantes as bactérias endofíticas possuem uma vantagem sobre os diazotrofos associativos da superfície radicular, pois podem colonizar o interior das raízes das plantas e formar associações mais estáveis e ocupar nichos da planta que proporcionam maior acesso aos nutrientes necessários para fixação de nitrogênio (SANTI *et al.*, 2013).



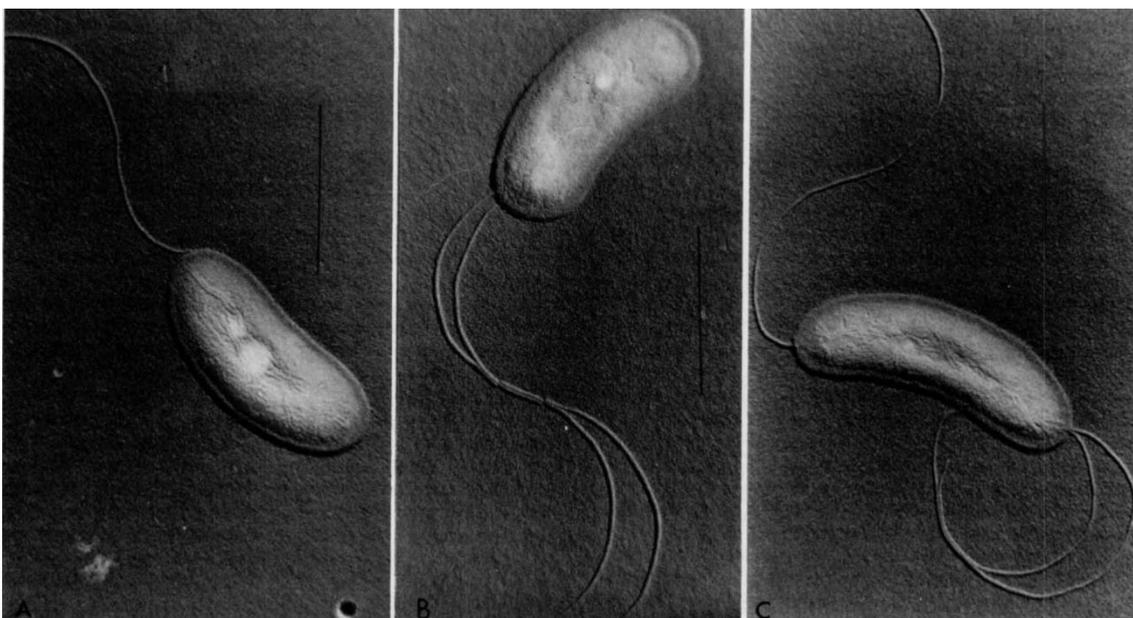
**FIGURA 1 - Benefícios da interação entre planta-bactéria.** FONTE: adaptado de PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014.

### 2.3. *Herbaspirillum seropedicae*

*H. seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio com características endofíticas e foi isolada pela primeira vez no município de Seropédica, Rio de Janeiro (Brasil) a partir de raízes de milho, sorgo e arroz. Foi proposto, primeiramente, que os isolados deveriam ser considerados uma quarta espécie de *Azospirillum* por possuir semelhanças morfológicas e fisiológicas com o gênero, mas estudos da homologia do DNA levaram a proposta de um novo gênero e a bactéria passou a ser chamada de *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986).

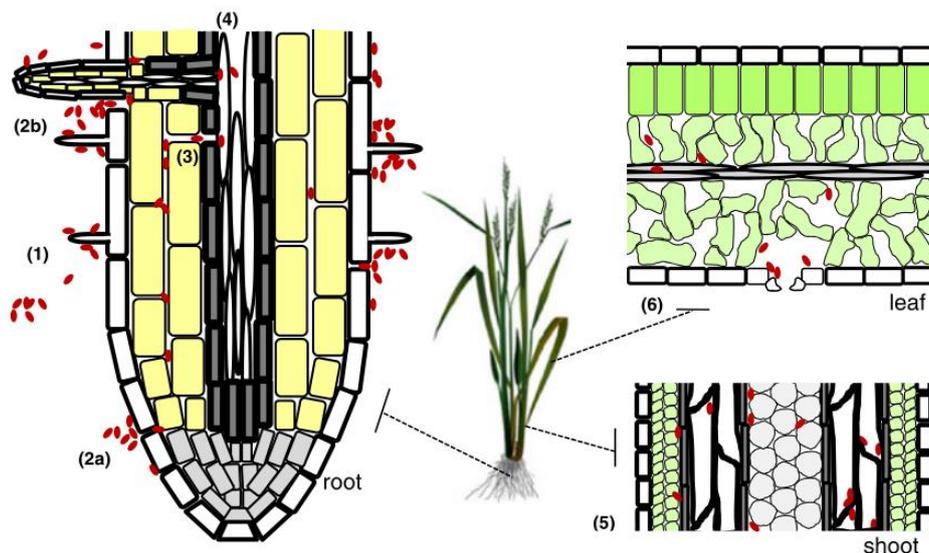
*Herbaspirillum seropedicae* (Figura 2) é uma betaproteobacteria encontrada dentro de tecidos de culturas importantes, como milho, cana-de-

açúcar, arroz, trigo e sorgo sem causar doença à planta (JAMES *et al.*, 2002). Essas bactérias são classificadas como gram-negativas, vibrióides e às vezes helicoidais, móveis quando estão perto de uma fonte de O<sub>2</sub> e apresentam de 0,6 a 0,7 µm de diâmetro e 1,5 a 5 µm de comprimento. As células geralmente têm dois flagelos polares (ocasionalmente um a três flagelos) em um ou ambos os pólos. É um microrganismo capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0)(BALDANI *et al.*, 1986).



**FIGURA 2 -** Micrografia eletrônica de transmissão de *Herbaspirillum seropedicae*.  
FONTE: Baldani *et al.*, 1986

O processo de colonização por *H. seropedicae* (Figura 3) consiste na ligação da bactéria à superfície da raiz, seguida por infecção cortical e invasão do xilema. A invasão das bactérias ocorre através da proliferação nos pontos onde emergem as raízes laterais e então penetram pelas fissuras na epiderme. A disseminação ocorre através dos espaços intercelulares, com posterior ocupação do aerênquima e do xilema das raízes, e subsequentemente atingem os caules e folhas (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). A ocupação dos tecidos internos ocorre muito rapidamente, após um dia de inoculação, em laboratório. Em milho, a adesão por *H. seropedicae* às raízes foi observada 30 minutos após a inoculação (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003; BALSANELLI *et al.*, 2010).



**FIGURA 3 - Colonização de plantas por *Herbaspirillum seropedicae*.** A associação de *H. seropedicae* (pontos vermelhos) com plantas hospedeiras em condições laboratoriais começa com a quimiotaxia das bactérias para a raiz da planta e a fixação nas superfícies radiculares, preferencialmente na zona do pêlo radicular (1). A maioria das bactérias permanece nas superfícies radiculares, mas algumas bacterias penetram através de discontinuidades da epiderme, como a zona de alongamento (2a) e rachaduras laterais (2b), e então ocorre uma ocupação rápida de espaços intercelulares de raiz, juntamente com colonização de aerênquima (em arroz) e xilema (3). Algumas bactérias então se movem das raízes para as partes aéreas no xilema (4), eventualmente colonizando os caules (5) e as folhas (6), onde podem se espalhar para espaços intercelulares e cavidade substomatal. FONTE: Monteiro *et al.*, 2012b

A capacidade de *H. seropedicae* formar uma associação com gramíneas de interesse econômico, sem provocar doença, tem despertado interesse. Muitos trabalhos indicam que *H. seropedicae* tem potencial como biofertilizante, no entanto, ainda pouco se sabe sobre os fatores moleculares envolvidos nesta interação.

A estirpe *H. seropedicae* SmR1 é um mutante espontâneo da estirpe Z78 que apresenta resistência a estreptomicina (PEDROSA *et al.*, 1997). Em 2011, o genoma da estirpe *H. seropedicae* SmR1 foi sequenciado e anotado pelo Programa Genoma do Paraná (Genopar) (PEDROSA *et al.*, 2011), com o objetivo de obter uma compreensão das vias metabólicas globais de *H. seropedicae* visando aumentar a eficiência da associação planta-bactéria. O genoma dessa estirpe apresenta formato circular e 5.513.887 pb, 4.735

potenciais ORFs, são quantificadas 3.108 proteínas conhecidas, 497 preditas e 1.130 com funções ainda desconhecidas. As análises do genoma de *H. seropedicae* possibilitaram a identificação dos genes presentes nessa bactéria e de produtos que são codificados por eles. Tais informações permitiram encontrar muitos genes que podem estar potencialmente envolvidos na interação planta-*H.seropedicae*, tais como genes *nif*; genes envolvidos na biossíntese de ácido indol-acético e giberelinas, sistemas de secreção do tipo 3 e 6, flagelo, pilli tipo 4, genes para a aderência às superfícies (hemaglutininas/hemolisina) e formação de biofilmes (genes de EPS).

#### 2.4. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Praticamente todas as plantas vivem em associação íntima com microrganismos, que podem colonizar as superfícies das plantas (colonização epifítica) ou ocupar espaços internos dos tecidos das plantas (colonização endofítica) (BRENCIC & WINANS, 2005).

Existem dois tipos de interações benéficas planta-bactéria: simbiótica e associativa. A interação simbiótica é caracterizada pela formação de nódulos na raiz que são colonizados por bactérias. Como um resultado, as bactérias fixam nitrogênio atmosférico e fornecem nitrogênio para a planta. A associação benéfica entre planta-bactéria mais bem conhecida é a interação simbiótica entre plantas leguminosas e bactérias do grupo dos rizóbios, por meio de nodulação (PÜHLER *et al.*, 2004). Na interação associativa, as bactérias promotoras do crescimento vegetal não formam nódulos nas raízes e se associam de outras duas maneiras principais: colonização epifítica e endofítica sem causar danos aparentes ao hospedeiro (BRENCIC & WINANS, 2005).

O sucesso do crescimento das plantas por microorganismos depende em grande parte da resposta aos estímulos químicos liberados pelas plantas, sua competição ou interação com outros microorganismos, adesão e colonização na superfície radicular e a persistência ao longo do crescimento. O primeiro mecanismo que contribui para a interação planta-bactéria é a

quimiotaxia, fenômeno pelo qual as bactérias percebem o ambiente químico onde estão inseridas e controlam seu movimento em direção a substâncias atrativas ou se afastam de substâncias repelentes (BERG, 1975). As plantas exsudam grandes quantidades de nutrientes que podem agir como quimioatraentes para as bactérias que, por sua vez, visam obter os nutrientes do exsudato da planta ao mesmo tempo em que estimulam o crescimento da planta (PÜHLER *et al.*, 2004). *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 quimiotaxia auxilia as bactérias na adaptação a ambientes adversos e na amplificação dos sinais. Gradientes de parâmetros físico-químicos afetam o metabolismo bacteriano e o seu movimento é direcionado à planta através do flagelo, que é a primeira estrutura da bactéria que entra em contato com a célula vegetal (ALEXANDRE, 2010). Contudo, a colonização da rizosfera é o evento-chave que sustenta uma interação associativa com uma planta (PÜHLER *et al.*, 2004). Durante o processo de colonização, o contato da bactéria com o hospedeiro depende de diversas biomoléculas. O primeiro passo do processo de colonização é a ligação das bactérias à raiz da planta, um processo mediado por constituintes da superfície bacteriana e hospedeira, como lipopolissacarídeos (LPS), exopolissacarídeos (EPS), flagelos, adesinas e lectinas (BALSANELLI *et al.*, 2010, 2013).

Uma análise transcriptômica de *H. seropedicae* durante interação com milho realizada por Balsanelli e colaboradores (2016) sugere que as bactérias planctônicas empregam sistemas de quimiotaxia específicos para atingir e interagir com o vegetal, e provavelmente utilizam pili tipo IV e LPS para aderir à superfície radicular.

Alguns estudos mostram que as BPCP produzem uma gama de diferentes tipos de metabólitos durante a interação planta-bactéria e que estas substâncias desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa e competição, mas também podem estar envolvidas com interação e comunicação específicas com a planta hospedeira. Além disso, existem alguns exemplos onde a bactéria é capaz de modular a síntese de metabólitos das plantas (BRADER *et al.*, 2014). Por exemplo, a inoculação com *Azospirillum* em raízes de milho levou a importantes modificações dos conteúdos de

metabólitos secundários produzidos pela planta, sugerindo uma adaptação específica da planta em relação à estirpe bacteriana utilizada (WALKER *et al.*, 2011).

## 2.5. ADESÃO BACTERIANA ÀS RAÍZES DE PLANTAS

A adesão de bactérias do solo às células da planta é um passo necessário para a interação planta-bactéria. Vários mecanismos e diversas moléculas de superfície bacteriana e vegetal foram propostos como mediadores desse processo. As bactérias aderem-se às raízes normalmente por dois mecanismos: a primeira fase de ligação é uma ligação fraca, mediada principalmente por proteínas ou moléculas de ancoragem, e a segunda fase é a adesão forte através de polissacarídeos (RODRÍGUEZ-NAVARRO, DARDANELLI & RUÍZ-SAÍNIZ, 2007). Uma variedade de compostos, tais como proteínas de superfície e polissacarídeos, foram implicados na aderência de várias bactérias promotoras de crescimento vegetal às raízes da planta. Normalmente, proteínas de superfície bacteriana são necessárias para a adsorção das células aos componentes da raiz vegetal e geralmente têm função de adesinas. O primeiro passo da ligação das células de *Azospirillum brasilense* às raízes do trigo (*Triticum aestivum*) envolve uma proteína de membrana externa, que exhibe maior afinidade com as raízes do trigo do que com as de outras plantas, o que pode explicar por que *Azospirillum* é principalmente encontrado associado à rizosfera de trigo (RODRÍGUEZ-NAVARRO, DARDANELLI & RUÍZ-SAÍNIZ, 2007). A interação entre os dois organismos parece requerer especificidade entre os constituintes da superfície da bactéria e os receptores da superfície da raiz vegetal e o modo como diferentes espécies se aderem às raízes é variado. Existem diversos mecanismos bacterianos envolvidos na adesão à raízes de plantas e isso deve ser um dos fatores que controlam a especificidade entre bactéria e hospedeiro vegetal. Em *H. seropedicae*, estruturas do envelope bacteriano como lipopolissacarídeos (LPS), exopolissacarídeos (EPS), flagelos e adesinas

constituem a primeira estrutura de contato com o hospedeiro e podem ser requeridas para a adesão da bactéria na superfície da raiz vegetal (BALSANELLI *et al.*, 2013). Balsanelli e colaboradores (2010) mostraram que estirpes mutantes de *H. seropedicae* que não possuíam o antígeno-O do LPS eram menos eficientes na adesão e colonização interna de raízes de milho. Muitas estruturas de superfície e proteínas da membrana externa podem contribuir para a fixação e agregação de células bacterianas em uma superfície de planta.

As bactérias estão sujeitas a alterações ambientais e se adaptam a essas modificações através da regulação da expressão gênica (JAIN *et al.*, 2006). O transcriptoma compreende o conjunto completo dos transcritos de um organismo em um determinado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica. O estudo do transcriptoma é importante para identificação de genes e obtenção de informações sobre os elementos funcionais do genoma (WANG, GERSTEIN & SNYDER, 2009).

Desta maneira, Pankiewicz e colaboradores (2016) realizaram um transcriptoma de *H. seropedicae* aderido às raízes de trigo (*Triticum aestivum*) comparado com as bactérias recuperadas do meio líquido do sistema hidropônico (denominadas plantônicas). O transcriptoma de *H. seropedicae* aderido às raízes de trigo mostrou o panorama geral do perfil de transcritos expressos por esta bactéria durante a colonização de raízes de plântulas de *T. aestivum*. O perfil transcricional revelou uma extensa modificação no metabolismo da bactéria em resposta à interação com a planta. Foi observada a presença de hemaglutininas/hemolisinas que possuem domínios proteicos de adesinas, e podem ser responsáveis pela adesão da bactéria em raízes de trigo. Dois genes codificando para proteínas de hemaglutininas filamentosas estavam mais expressos quando as células estavam aderidas às raízes de trigo. *Hsero\_1294* e *fhaB* (*Hsero\_3251*) tiveram um fold change de 2,8 e 2,3 vezes, respectivamente (p-valor = 0,01 e 0,04, respectivamente). As proteínas de hemaglutinina filamentosas (FHA) são adesinas importantes envolvidas na mediação da ligação das bactérias ao hospedeiro (PANKIEWICZ *et al.*, 2016). Do mesmo modo, uma análise do perfil transcriptômico de *H. seropedicae* durante colonização da rizosfera de milho, revelou expressão do gene *Hsero\_1294* aumentada quando as células estavam aderidas às raízes de

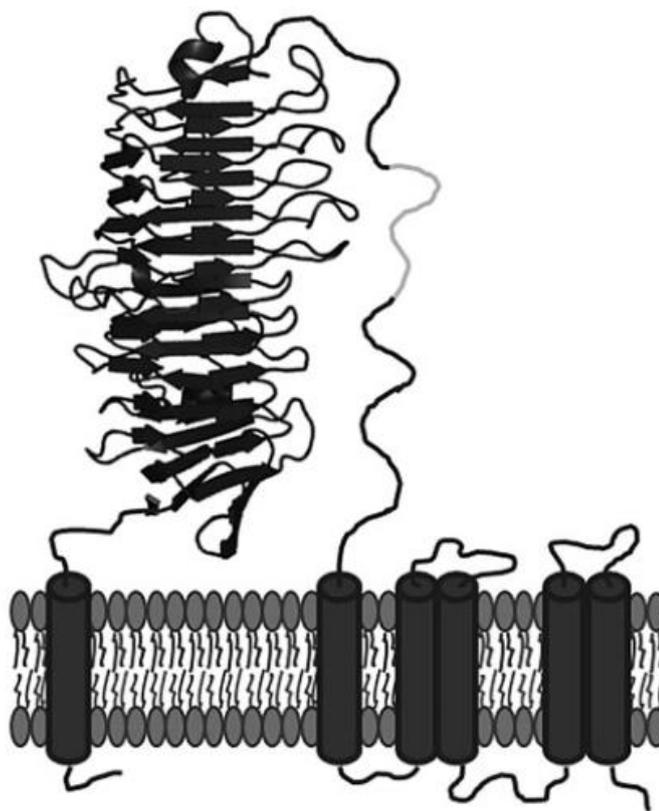
milho 1 dia após a inoculação (d.a.i.) quando comparado com bactérias recuperadas do meio líquido, apresentando um fold change de 2,8 (BALSANELLI *et al.*, 2016).

A proteína hemaglutinina filamentosa tem sido bastante estudada em *Bordetella pertussis*, que usa essa proteína como um fator de virulência. A hemaglutinina filamentosa (FHA) de *Bordetella pertussis* é uma proteína filamentosa grande associada à superfície e desempenha um papel importante na aderência às células do hospedeiro. Está associada à formação de biofilme e possui pelo menos quatro domínios de ligação que podem se ligar a diferentes receptores celulares na superfície da célula eucariota (LOCHT *et al.*, 1993; RELMAN *et al.*, 1989).

Deste modo, os determinantes moleculares da estrutura da superfície celular bacteriana podem ser em grande parte responsáveis por seu comportamento fenotípico durante a colonização da planta. Uma análise comparativa de sete sequências do genoma de bactérias associadas à planta (*Agrobacterium tumefaciens*, *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Xanthomonas campestris pv campestris*, *Xanthomonas axonopodis pv citri*, *Xylella fastidiosa* e *Ralstonia solanacearum*) mostrou que as hemaglutininas codificadas por genes dessas sete espécies bacterianas diferiram nas porções expostas à superfície, sugerindo que essas regiões podem interferir na função do domínio da hemaglutinina e posteriormente na interação do hospedeiro bacteriano (VAN SLUYS *et al.*, 2002). Além disso, homólogos de hemaglutininas filamentosas também estão presentes nos patógenos das plantas *Erwinia chrysanthemi* e *Xylella fastidiosa*, e seu envolvimento na adesão e na virulência foi demonstrado (ROJAS *et al.*, 2002; GUILHABERT & KIRKPATRICK, 2005). Uma cepa mutante de *Xanthomonas axonopodis py citri* fhaB mostrou uma diminuição da aderência à superfície vegetal e na formação de biofilme, resultando na redução da virulência (GOTTIG *et al.*, 2009). Grandes exoproteínas relacionadas à hemaglutinina, também chamadas de adesinas, foram identificadas nas bibliotecas da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* e da estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans* (MONTEIRO, *et al.*, 2012a), uma bactéria diazotrófica que promove o crescimento vegetal, mas tem um comportamento fitopatogênico, causando a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar e estria vermelha em variedades

susceptíveis de sorgo (OLIVARES et al., 1997). O alinhamento da sequência de aminoácidos da adesina específica de *H. rubrisubalbicans* M1 revelou, em grande parte, homologia ao fitopatógeno *R. solanacearum*, enquanto que a hemaglutinina de *H. seropedicae* SmR1 tem baixa semelhança com a bactéria fitopatogênica, sugerindo que as hemaglutininas das espécies de *Hesbaspirillum* podem explicar as diferenças no padrão de colonização da planta (MONTEIRO *et al.*, 2012a). Regiões semelhantes de genes de adesina foram observadas nas sequências específicas de *H. seropedicae* SmR1 (Figura 4).

A superfície celular bacteriana desempenha um papel fundamental na sobrevivência e capacidade de aderir às superfícies das plantas. Além disso, a formação de biofilmes também poderia estar envolvida na ligação bacteriana a superfície do hospedeiro (BOGINO *et al.*, 2013a).



**FIGURA 4 - Modelo estrutural da adesina FhaB de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.** As sequências específicas de espécies identificadas são mostradas em cinza e correspondem ao loop extracelular. As estruturas de previsão dos domínios hemaglutininas das adesinas foram geradas por SWISSMODEL (Schwede et al., 2003); as regiões transmembranas (cilindros) foram preditas pela DAS (Cserzo et al., 1997). FONTE: Monteiro *et al.*, 2012a

## 2.6. FORMAÇÃO DE BIOFILME

Vários fatores estão envolvidos no processo de interação planta-bactéria como, por exemplo, a formação de biofilme. As bactérias podem interagir fisicamente com superfícies sólidas e formar complexos multicelulares com uma forma tridimensional, composta geralmente de exopolissacarídeos (EPS), proteínas e lipídios (CASTIBLANCO & SUDIN, 2016). Essas comunidades microbianas tridimensionais podem ser formadas em todos os ambientes colonizados por bactérias, como em substratos sólidos em contato com a umidade ou sobre superfícies de tecido em organismos vivos (RODRÍGUEZ-NAVARRO, DARDANELLI & RUÍZ-SAÍNZ, 2007).

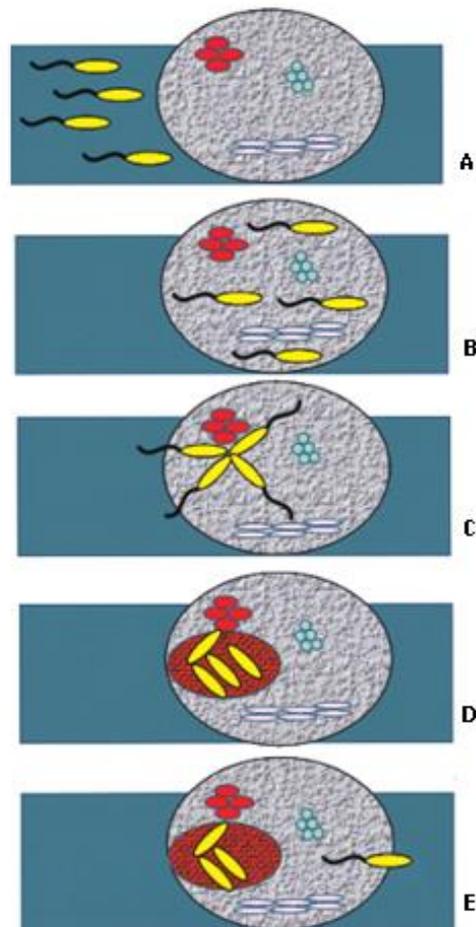
A formação de biofilme se inicia pela aproximação e associação da bactéria com a superfície ou com outras bactérias previamente aderidas na superfície, formando microcolônias. Nesse sentido, o biofilme se caracteriza pelo desenvolvimento tridimensional dos microrganismos formando uma película bacteriana. O reconhecimento entre a bactéria e a superfície pode ocorrer por meio de lectinas e carboidratos específicos. Já a associação entre elas, chamada de adesão, é um dos primeiros passos para a formação do biofilme e ocorre por meio de adesinas, polissacarídeos e outras proteínas de superfície (WATNICK & KOLTER, 2000). A formação de biofilme é eficiente em manter a sobrevivência de microrganismos em microambientes variados (WATNICK & KOLTER, 2000), pois pode aumentar a absorção de nutrientes, aumentar a resistência ao estresse ambiental, bem como resistência a compostos antimicrobianos (BOGINO *et al.*, 2013a). Além disso, o biofilme protege contra a dessecação em ambientes deficientes em água. As comunidades bacterianas estão expostas a vários estresses ambientais, dos quais a disponibilidade limitada de água é tipicamente a mais crítica e tem o maior efeito na sobrevivência e atividade dessas comunidades. A privação de água pode afetar a fisiologia bacteriana de diferentes maneiras como, por exemplo, a dessecação inibe as interações planta-bactéria e a fixação biológica do nitrogênio (BOGINO *et al.*, 2013b). Os biofilmes de *Pseudomonas putida* sofreram alterações na composição da arquitetura e exopolissacarídeo (EPS) para criar um microambiente mais hidratado em resposta à limitação de água,

protegendo as bactérias do estresse por dessecação e aumentando a sobrevivência (CHANG *et al.*, 2007).

Os biofilmes também representam uma estratégia fundamental na patogênese de uma ampla gama de bactérias tanto nos animais quanto nas plantas. Os patógenos formam biofilmes para criar resistência aos compostos de defesa do hospedeiro. A adesão à superfície é geralmente o primeiro passo da patogênese. *Pseudomonas aeruginosa* forma biofilme nas raízes de *A. thaliana* sendo capaz de causar a mortalidade das plantas 7 dias após a inoculação (WALKER *et al.*, 2004). Porém, os biofilmes também podem funcionar no estabelecimento de interações benéficas com plantas. Para bactérias associadas a plantas, a formação de biofilmes evoluiu como uma estratégia adaptativa para alcançar com sucesso a colonização do hospedeiro, por exemplo, nas superfícies foliares ou na rizosfera (CASTIBLANCO & SUDIN, 2016).

Estudos sobre os passos na formação do biofilme foram realizados utilizando espécies bacterianas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae* (PRATT & KOLTER, 1998; O'TOOLE & KOLTER, 1998; WATNICK & KOLTER, 1999). Nesses estudos, mutantes aleatórios foram cultivados em placas de 96 poços e após a remoção das células plantônicas, as células associadas ao biofilme foram coradas com violeta cristal, um corante roxo que cora as células bacterianas, mas não cora o plástico de PVC. Este procedimento de coloração permitiu visualizar células que se aderiram à superfície, uma vez que tais células são coradas com violeta cristal, enquanto que as superfícies abióticas não são coradas. Portanto, os poços sem coloração correspondiam aos mutantes defeituosos na formação de biofilme. Esses trabalhos também mostraram que a interação com a superfície se inicia através do pili e o flagelo do tipo IV. Depois do contato com a superfície, as bactérias usam flagelos ou pili tipo IV para se mover ao longo da superfície até que outras bactérias sejam encontradas e as microcolônias são formadas ou ampliadas. Finalmente, a produção de exopolissacarídeos é necessária para estabilizar o biofilme (Figura 5). Por outro lado, em *H. seropedicae*, a mutagênese de um cluster de biossíntese de EPS indicou que os exopolissacarídeos são necessários para a formação de biofilmes em

superfície abiótica, mas não para colonização de plantas (BALSANELLI *et al.*, 2014).



**FIGURA 5 - Representação esquemática dos passos que uma nova espécie bacteriana assume a formação de um biofilme em uma rocha previamente colonizada com múltiplas espécies de bactérias.** A) As bactérias amarelas representam uma espécie que nada para a rocha usando flagelos polares, B) forma anexos soltos aleatórios à rocha, C) migra sobre a superfície para formar uma microcolônia e, finalmente, D) produz exopolissacarídeo para formar um biofilme tridimensional. E) Quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis, algumas bactérias podem se separar e nadar para encontrar uma superfície em um ambiente mais favorável. FONTE: Watnick & Kolter, 2000.

As bactérias ganham várias vantagens em viver em biofilmes, principalmente porque fornecem proteção e aumentam o potencial da bactéria para sobreviver e evoluir no ambiente da planta. Vários trabalhos demonstram a importância da formação de biofilme bacteriano nos processos de interação planta-bactéria. Tendo isso em vista, torna-se importante estudar o papel desse processo bem como evidenciar possíveis relações entre a formação de biofilme

e sua relação com o fenótipo observado na associação da bactéria com algumas plantas de interesse econômico.

### 3. JUSTIFICATIVA

O uso de fertilizantes nitrogenados, além de constituir um alto custo na agricultura, vem ocasionando diversos problemas ambientais. A busca por alternativas para diminuir a utilização destes fertilizantes tem estimulado a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), as quais se associam com plantas e promovem o crescimento vegetal através da produção e secreção de fitormônios, proteção do hospedeiro contra fitopatógenos e realizam a fixação biológica de nitrogênio. Dentre as espécies de BPCV destaca-se *H. seropedicae* como um importante microrganismo endofítico capaz de estabelecer associação com diversas culturas de importância econômica. Contudo, a capacidade da bactéria induzir o crescimento vegetal depende de uma interação eficiente com a planta. Portanto, é importante estudar genes envolvidos com os fatores que podem estar relacionados na interação planta-bactéria a fim de entender o mecanismo que pode contribuir para o melhoramento dessas interações, visando, além do acúmulo de conhecimento científico, a utilização da fixação biológica de nitrogênio como prática de manejo na agricultura comercial. A utilização desta bactéria como inoculante para importantes culturas de interesse comercial, como milho, arroz e trigo, pode gerar benefícios na agricultura, dispensando parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados, o que resulta em economia para produtores e benefícios para o meio ambiente. A associação entre planta-bactéria tem sido observada em muitos trabalhos. Resultados obtidos por diversos pesquisadores mostraram que, a inoculação com diazotrófos é capaz de promover o crescimento da planta hospedeira por mecanismos ainda não completamente esclarecidos. Portanto, é importante entender quais são os mecanismos tanto fisiológicos como moleculares da associação do microrganismo com plantas, pois o entendimento desta interação é essencial para sua utilização no aumento da eficiência da produção agrícola pela

utilização de inoculantes. Em função disso, diferentes estratégias podem ser utilizadas na pesquisa sobre a interação entre bactérias associativas e plantas, como a identificação e estudo de genes envolvidos em tais associações. Entender o mecanismo de interação entre plantas e microrganismos promotores do crescimento vegetal pode contribuir para o melhoramento dessas interações.

#### 4. OBJETIVOS

A bactéria de estudo, *H. seropedicae* SmR1, interage com plantas de interesse comercial sem causar doença e ainda pode beneficiá-las através da fixação biológica de nitrogênio e produção de fatores de crescimento. A identificação e estudo de genes envolvidos em tais associações é importante para o entendimento e melhoramento da interação entre plantas e bactérias. O objetivo desse trabalho é determinar se o gene *Hsero\_1294*, que codifica para uma hemaglutinina, está envolvido na interação planta-*H. seropedicae*. Para isso temos os seguintes objetivos específicos:

- Determinar o fenótipo da colonização epifítica e endofítica pela estirpe mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* em arroz;
- Determinar a capacidade de produção de biofilme da estirpe mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*
- Realizar experimentos de competição entre as estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*.
- Realizar ensaios de microscopia de fluorescência das estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* isoladas e co-inoculadas , colonizando raízes de arroz;
- Determinar o perfil de LPS do mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*;
- Identificar proteínas da membrana externa da estirpe mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*

## 5. MATERIAS E MÉDODOS

### 5.1. BACTÉRIAS

As bactérias utilizadas nesse trabalho estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS.

Estirpe	Características	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
S17.1	Sm <sup>R</sup> , Tra <sup>+</sup>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
SmR1	Variante espontâneo da estirpe tipo Z78, Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup>	Pedrosa <i>et al.</i> , 1997
RAM 4	Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup> , Km <sup>R</sup> , dsRed	Monteiro <i>et al.</i> , 2008
<i>Hsero_1294</i>	Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup> , Km <sup>R</sup>	Pankievicz, não publicado
SmR1 pH60	Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup> , Tc <sup>R</sup> , gfp, contendo plasmídeo pH60	Este trabalho
<i>Hsero_1294</i> pH60	Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup> , Km <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , gfp, contendo plasmídeo pH60	Este trabalho

### 5.2. MEIOS DE CULTIVO PARA *Herbaspirillum seropedicae*

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHP Malato (KLASSEN *et al.*, 1997) (Tabela 2) contendo como fonte de nitrogênio 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl. As culturas foram crescidas sob agitação (120 rpm) por 18 a 24h a 30°C.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFbHP-MALATO

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

Solução de Oligonutrientes:

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

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

### 5.3. MEIOS DE CULTIVO PARA *Escherichia coli*

As estirpes de *E. coli* foram crescidas em meio Luria Broth (LB) (SAMBROOK et al., 1989) sob agitação de 160 rpm ou em meio sólido LA, sempre a 37°C. O meio sólido (LA) é obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB). O meio LB possui a composição descrita na Tabela 3.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO LB

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	10 g/L
Triptona	10 g/L

#### 5.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 4.

TABELA 4 – ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADOS NAS CULTURAS

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentração final para culturas de <i>H. seropedicae</i></b>	<b>Concentração final para culturas de <i>E. coli</i></b>
Canamicina (Km)	500 µg/mL	100 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	80 µg/mL	20 µg/mL
Tetraciclina (Tc)	10 µg/mL	10 µg/mL

#### 5.5. MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

As estirpes de *H. seropedicae* foram mantidas em curto prazo, em placas contendo meio sólido NfbHPN Malato. Para estocagem por longo período, as estirpes de *H. seropedicae* foram inoculadas em 3mL de meio NfbHPN Malato com antibióticos. Foram então incubados a 30°C e 120rpm por 24 horas. No dia seguinte 20µL de cultura foram inoculados em 3mL de meio NfbHP Malato semi-sólido e incubadas por 2 dias em estufa 30°C. As estirpes foram então estocadas a temperatura ambiente e repicadas uma vez a cada 6 meses.

As estirpes de *E.coli* foram mantidas em curto prazo, em placas contendo meio LA e antibióticos a 4°C. Para estocagem por longo período, as estirpes de *E. coli* foram inoculadas em 3mL de meio LB com antibióticos. Foram então incubados a 37°C e 120rpm por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, 1mL da cultura foi centrifugada em centrífuga minispin Eppendorf® (13400rpm por 1 minuto em temperatura ambiente). O meio de cultura foi descartado e foi adicionado 1 mL de Glicerol 50%. As estirpes foram armazenadas a -20°C e repicadas uma vez por ano.

## 5.6. CURVA DE CRESCIMENTO

As estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* foram cultivadas como descrito no item 5.2. As estirpes foram pré-inoculadas em meio NFbHPN - Malato, e após alcançarem a saturação foram reinoculadas nos meios numa  $D.O_{595nm}$  inicial de 0,1 e o crescimento foi acompanhado de hora em hora por até 9 horas. A cada hora, alíquotas de 200  $\mu$ L das culturas em crescimento foram transferidas para placas do tipo ELISA para leitura de sua turbidez a um comprimento de onda de 595nm em leitor de microplacas.

## 5.7. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MICROPLACA

As estirpes de *H. seropedicae* SmR1 e mutante *Hsero\_1294* foram cultivadas em 3mL de NFbHPN - Malato e após atingirem a  $DO_{595}$  de interesse (0,05 e 0,1), 200 $\mu$ l foram inoculados em microplacas e as placas foram incubadas por 24h e 48h a 30°C sem agitação. Após esse período, o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente e transferido para outra placa. Os poços foram lavados suavemente duas vezes com água Milli-Q para remoção das células livres (plantônicas). Após esta etapa, as células aderidas foram então coradas com violeta de genciana a 1% por 15 min e em seguida os poços foram lavados cuidadosamente 3 vezes com água Milli-Q. O que restou na placa foi ressuspendido em etanol absoluto e esta solução foi utilizada para determinar a absorbância em 540nm. Em cada placa utilizou-se um poço contendo somente meio NFbHPN - Malato como controle negativo. Os dados foram expressos como  $DO_{540}$  das amostras subtraída da  $DO_{540}$  do controle negativo.

## 5.8. FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO

10 $\mu$ L de cultura com  $DO_{595nm} = 1,0$ , foram diluídos em 10 mL de meio NFbHPN com adição de 50 mg de fibra de vidro, e depois foram cultivadas em shaker a 30°C e 120rpm. Amostras foram coletadas em 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação para determinação da absorbância em 595nm. As fibras de vidro foram lavadas uma vez, sob agitação (120rpm), com salina 0,9% (m/v) e depois coradas com 200 $\mu$ L de violeta de genciana 1% (m/v) por 5min, e então, as fibras foram novamente lavadas três vezes, sob agitação (120rpm), com solução salina 0,9% (m/v). Em seguida, 1 mL de etanol absoluto foi adicionado para remover o corante, e esta solução foi utilizada para determinar a absorbância em 550nm. O controle negativo deste procedimento foi realizado sem inoculação bacteriana. Os dados foram expressos como  $DO_{550}$  das amostras subtraída da  $DO_{550}$  do controle negativo. Amostras da fibra de vidro corada após crescimento bacteriano foram preparadas para análise por microscopia ótica.

## 5.9. ENSAIOS *in planta*

### 5.9.1. Cultivares vegetais

Neste trabalho foram utilizadas plântulas de arroz (*Oryza sativa*) da variedade Nipponbare.

### 5.9.2. Desinfecção da superfície das sementes de arroz

As sementes de *Oryza sativa* foram esterilizadas em etanol 70% (v/v) por 5 minutos e, em seguida, com uma solução de hipoclorito de sódio 6% (v/v) e Tween20 0,01% (v/v) por 30 minutos. As sementes foram então lavadas 3 vezes com água Milli-Q estéril.

### 5.9.3. Cultivo de plantas em sistema hidropônico e inoculação com as estirpes de *H. seropedicae*

Após a desinfecção, as sementes foram pré-germinadas em placas de petri contendo ágar-água (0,8%). As placas foram envoltas em papel-alumínio e mantidas a 30°C por 48-72 horas para germinação. Cada plântula foi inoculada por imersão em suspensão de bactérias na concentração de  $10^5$  células por mL das estirpes selvagem e mutante de *H. seropedicae*, por 30 min, sem agitação a 30°C. As plântulas foram então lavadas com solução salina (NaCl 0,9%), transferidas para tubos de ensaio contendo 25 mL de Plant Medium (Tabela 5) e 10 g de esferas de polipropileno (para dar sustentação a semente), e crescidas a 28°C com período de luz de 12h (Figura 6).

TABELA 5 - SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS PLANT MEDIUM

	1L
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O – 10%	0,2g
NaCl – 10%	0,1g
CaCl <sub>2</sub> .2.H <sub>2</sub> O – 1%	0,026g
Solução de Microelementos	1mL
Fe-EDTA – 1,64%	1mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5g
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5g
Solução de microelementos:	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2.H <sub>2</sub> O	1g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,175g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,4g/L
CuSO <sub>4</sub> .5.H <sub>2</sub> O	0,04g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,12g/L



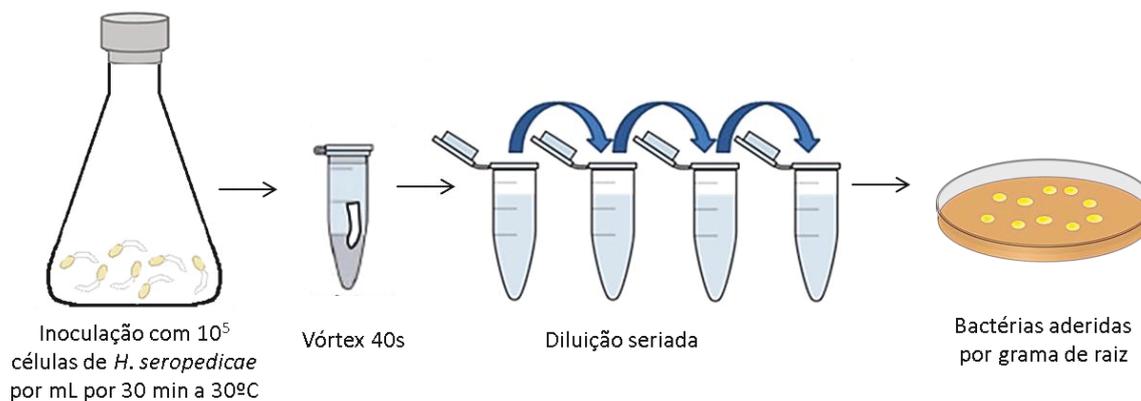
**FIGURA 6 – Esquema de desinfecção das sementes, inóculo das plântulas e plantio hidropônico em tubo de ensaio.**

#### **5.9.4. Preparação dos inóculos de *Herbaspirillum seropedicae***

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em meio NFbHPN-malato e antibiótico por aproximadamente 24 horas até atingirem D.O.<sub>600</sub> de 1,0. Foram então diluídas até a concentração de  $10^5$  células/mL.

#### **5.9.5. Ensaio de adesão das estirpes de *H. seropedicae* às raízes de arroz**

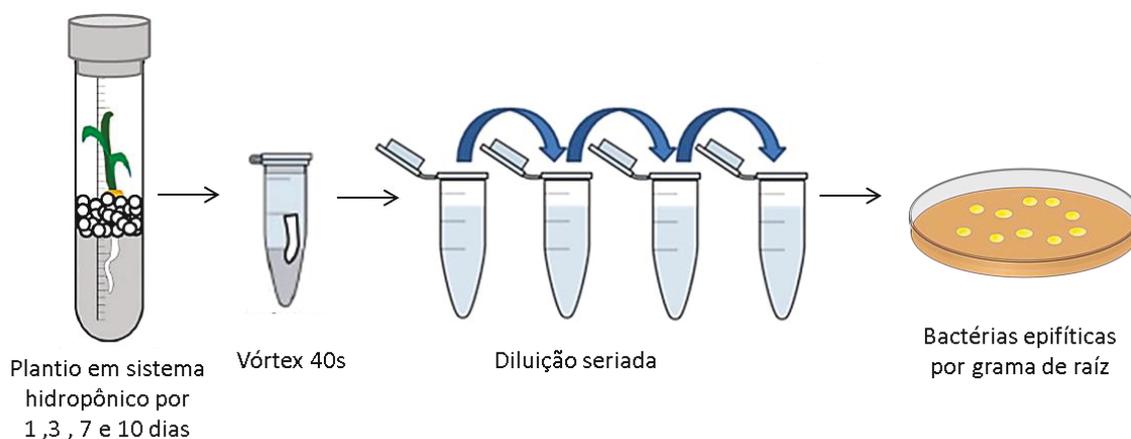
Imediatamente após a inoculação, as amostras de raízes foram cortadas, pesadas, lavadas por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e então agitadas em vórtex vigorosamente por 40 segundos em 1mL de solução salina estéril (NaCl 0,9% + Tween20 0,001%). O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama de raiz úmida através de diluição seriada, e contagem em meio sólido NFbHPN – malato (Figura 7).



**FIGURA 7 – Esquema do ensaio de adesão em plântulas de arroz.**

### 5.9.6. Ensaio de colonização epifítica das raízes de arroz pelas estirpes de *H. seropedicae*

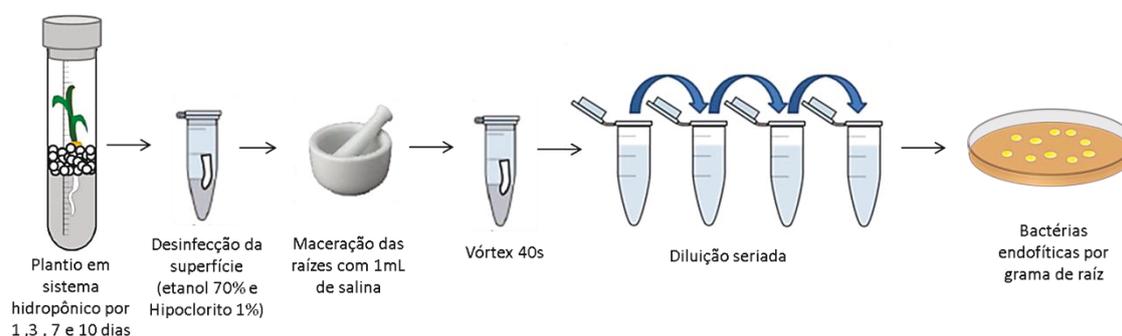
A determinação do número de bactérias epifíticas de raiz foi realizada 1, 3, 7 e 10 dias após inoculação. As amostras de raízes foram cortadas, pesadas, lavadas por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e então vortexadas vigorosamente por 40 segundos em 1mL de solução salina estéril (NaCl 0,9% + Tween20 0,001%). O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias epifíticas por grama de raiz úmida através de diluição seriada e contagem em meio sólido NFbHPN – malato (Figura 8).



**FIGURA 8 – Esquema do ensaio de colonização epifítica de raízes de arroz por *Herbaspirillum seropedicae*.**

### 5.9.7. Ensaios de colonização endofítica das raízes de arroz pelas estirpes de *H. seropedicae*

A determinação do número de bactérias endofíticas foi realizada 1, 3, 7 e 10 dias após inoculação. As raízes foram desinfetadas superficialmente por uma lavagem com hipoclorito 1% por 1 minuto, seguida de uma lavagem com etanol 70% por 1 minuto e, por fim, uma lavagem em solução salina estéril (NaCl 0,9%). Posteriormente, as raízes foram cortadas e pesadas. As raízes foram, então, maceradas em gral estéril em 1mL de solução salina estéril (NaCl 0,9% + Tween20 0,001%). Os extratos foram utilizados para determinar o número de bactérias endofíticas colonizando os tecidos radiculares internos de arroz, através de diluição seriada e contagem em meio sólido NFbHPN – malato (Figura 9).



**FIGURA 9 – Esquema do ensaio de colonização endofítica de raízes de arroz por *Herbaspirillum seropedicae*.**

### 5.9.8. Ensaios de competição pela colonização de arroz entre as estirpes de *H. seropedicae*

Ensaios de competição pela colonização de arroz foram realizados utilizando as estirpes *H. seropedicae* SmR1 e mutante *Hsero\_1294* na proporção de 1:1, mantendo o total de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de inóculo por planta. A determinação das UFC foi realizada como descrito anteriormente, e a resistência a antibióticos foi utilizada para identificar as estirpes.

## 5.10. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* EM RAÍZES DE ARROZ

### 5.10.1. Conjugação bacteriana

As estirpes selvagem e mutante de *H. seropedicae* foram marcadas com GFP, para visualização em microscópio, por conjugação com *E. coli* S17.1 contendo o plasmídeo pHC60 (CHENG & WALKER, 1998). A estirpe de *E. coli* S17.1 doadora e a estirpe receptora foram cultivadas em meio próprio por 16 horas, sob temperatura adequada e agitação constante. Cinco microlitros da estirpe doadora foram misturados com 50µL da estirpe receptora. Esta mistura foi depositada em forma de gota em meio NFbHPN acrescido de meio LA na proporção de 3:1. As placas foram incubadas a 30°C por aproximadamente 16 horas. A massa de células foi raspada e ressuspensa em 200µL de meio NFbHPN líquido e, então, essa suspensão foi plaqueada em NFbHPN sólido na presença dos antibióticos específicos para a seleção dos transconjugantes. As placas foram incubadas a 30°C até a visualização das colônias dos transconjugantes.

### 5.10.2. Microscopia confocal de fluorescência

A colonização de plântulas de arroz por *H. seropedicae* foi acompanhada e avaliada através de microscopia confocal de fluorescência utilizando o microscópio marca Nikon (NIKON Instruments Inc., Tokyo, Japan) utilizando objetiva de 20x.

Para a colonização isolada, foram utilizadas as estirpes SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*, contendo plasmídeo pHC60 que expressa proteína fluorescente verde (GFP) (CHENG & WALKER, 1998). Para examinar a competição de *H. seropedicae* na colonização dos tecidos radiculares de *Oryza sativa*, utilizamos a estirpe mutante *Hsero\_1294* contendo o plasmídeo pHC60 e a estirpe RAM4 que expressa constitutivamente a proteína DsRed que codifica uma proteína fluorescente vermelha (MONTEIRO *et al.*, 2008).

As raízes de arroz foram inoculadas e crescidas como descrito acima. Após 30min, 1 dia, 3 dias, 7 dias e 10 dias de inoculação as raízes foram lavadas, cortadas e colocadas em uma lâmina, em uma gota de salina. A amostra foi coberta com uma lamínula de vidro para observar sob um microscópio confocal para detectar a fluorescência verde emitida por *H. seropedicae* SmR1 marcada com GFP (excitação a 488 nm e detecção a 500-550 nm) e fluorescência vermelha emitida pela estirpe RAM4 marcada com DsRed (excitação a 543 nm e detecção a 488-633 nm).

Também foram preparadas lâminas contendo raízes que não foram vortexadas e raízes que foram vortexadas com salina 0,09% e Tween 0,001%, para analisar se as células se desprendem do tecido vegetal.

As imagens de fluorescência vermelha obtidas no microscópio confocal foram sobrepostas com as imagens das bactérias com marcação GFP e com imagens de luz transmitidas de raiz. Todas as imagens compostas foram produzidas usando o software NIS - Elements Microscope Imaging Software.

#### 5.11. EXTRAÇÃO RÁPIDA DE LPS DAS ESTIRPES DE *H. seropedicae* PARA VERIFICAÇÃO DE FENÓTIPO POR SDS-PAGE

A extração do LPS total para análise eletroforética foi realizada segundo Broughton e colaboradores (2006), com algumas modificações. As células bacterianas foram obtidas por centrifugação de 1mL de culturas das estirpes de *H. seropedicae* ( $DO_{595} = 1,5$ ) e foram lisadas em 80  $\mu$ l de tampão de lise (1M Tris pH6,8; 4%  $\beta$ -mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,005% bromofenol azul) à 100°C por 10 min. Depois de resfriado a temperatura ambiente, foram adicionados ao sistema 2% de SDS (m/v) e 0.08  $mg.mL^{-1}$  de proteinase K, misturados e incubados à 60°C por 16 horas. Após incubação, 2 volumes de tampão de amostra (120mM Tris pH6,8; 3% SDS; 9%  $\beta$ -mercaptoetanol; 30% glicerol; 0,03% bromofenol azul) foram adicionados, e 5 $\mu$ l da mistura final foram aplicados em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 16% m/v), submetido a um

campo elétrico de 100 V por 2 h e 30 min. Esse gel foi visualizado por oxidação com periodato e coloração com prata (TSAI & FRISCH, 1982).

## 5.12. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MEMBRANA EXTERNA DA ESTIRPE MUTANTE *Hsero\_1294* DE *H. seropedicae*

### 5.12.1. Purificação de proteínas da membrana externa de *H. seropedicae*

As estirpes selvagem e mutante de *H. seropedicae* foram cultivadas em 50mL de meio NFbHPN até D.O.<sub>600</sub> aproximadamente 1,0. As células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm, 8 minutos), ressuspensas em 800µL de tampão SP (NaCl 8.5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L; pH 7.2) e sonicadas com 15 pulsos de 15seg com 15seg de intervalo. O extrato celular foi centrifugado (13.000 rpm, 10 minutos, 4°C). A solução sobrenadante foi retirada com cuidado e submetida a ultracentrifugação (144.000 g, 1 hora e 30 minutos, 4°C) em ultracentrífuga Optima™ MAX-XP (rotor MLS-50). O precipitado foi lavado com 1mL de tampão SP e ultracentrifugado novamente nas mesmas condições. O precipitado foi então dissolvido em 1mL tampão SP para purificação. Proteínas de membrana externa foram isoladas do extrato de envelope celular por tratamento com 0,5% de Sarkosyl NL97 por 30 min a 28°C, seguido de centrifugação a 100.000 g por 60 min (BACHHAWAT & GHOSH, 1987). O precipitado contendo proteínas de membrana externa foi lavado com tampão SP, coletado por ultracentrifugação nas mesmas condições, ressuspenso em tampão SP e armazenado a -20°C.

### 5.12.2. Separação de proteínas de membrana externa por SDS-PAGE

A separação das proteínas foi feita a partir da eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida (7,5% - 15%) em condição desnaturante utilizando um sistema Hoefer. As amostras, antes de serem analisadas por SDS-PAGE, foram misturadas com tampão de amostra (120mM Tris pH 6,8; 3% SDS (m/v);

9%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v); 30% glicerol (v/v); 0,03% bromofenol azul (v/v)) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. As eletroforeses foram realizadas a 140V em tampão contendo 30 g/L Tris-base; 140 g/L glicina; 1 g/L SDS (1x) durante aproximadamente 1h, o gel foi corado com solução de azul de Coomassie e em seguida descorado com solução descorante. As soluções para o preparo do gel foram misturadas na ordem nas quantidades indicadas na Tabela 6. Para o gel de empilhamento foram utilizados os componentes nas quantidades indicadas na Tabela 7.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DO GEL DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DESNATURANTE DE PROTEÍNAS.

<b>Gel Separador</b>	<b>Gel 7,5%</b>	<b>Gel 15%</b>
Água	2,8mL	1,87mL
Tris HCl pH 8,8 1,5M	1,25mL	1,25mL
SDS 10%	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Acrilamida 40%	0,94mL	1,88mL
APS 10%	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO GEL DE EMPILHAMENTO PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS

<b>Gel Empilhamento</b>	<b>Gel 4,5%</b>
Água	3,162mL
Tris HCl pH 8,8 1,5M	1,3mL
SDS 10%	50 $\mu$ L
Acrilamida 40%	487,5mL
APS 10%	25 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L

### 5.12.3. Identificação das proteínas da membrana externa da estirpe mutante de *H. seropedicae* por espectroscopia de massa (MALDI-TOF)

A preparação das amostras para análise foi realizada de acordo com Shevchenko *et al.* (1996), com algumas modificações. As bandas proteicas foram cortadas do gel e divididas em pedaços de cerca de 1 mm<sup>2</sup>. Os pedaços de gel foram descorados em solução de acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0, com três lavagens de 300 µL por 1 hora. Em seguida o gel foi desidratado com 200 µL de acetonitrila 100% por 5 min e seco completamente a temperatura ambiente. O gel foi reidratado com solução de tripsina 15 ng/µL em bicarbonato de amônio 40 mM/10% acetonitrila em gelo por 30 minutos. A digestão foi realizada por 16 horas a 37°C. Um microlitro do sobrenadante foi misturado com 1 µL de matriz HCCA (10 mg.mL<sup>-1</sup> em acetonitrila 50%, TFA 0,1%), e colocado na placa de amostras do MALDI-TOF. O espectros de massa foram obtidos usando o espectrômetro MALDI-TOF-MS Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) no modo positivo, 20 kV de voltagem de aceleração, janela de aquisição de 800 – 3200 Da. A calibração externa foi realizada com kit de calibração de peptídeos do fabricante, e a lista de íons foi criada usando o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A lista de picos foi utilizada para busca PMF contra o banco de dados do genoma de *H. seropedicae*, utilizando o programa MASCOT (MATRIX SCIENCE).

### 5.13. ANÁLISE *in silico*

A sequência do gene *Hsero\_1294* (atualmente anotado como *Hsero\_RS06485l*) de *H. seropedicae* foi obtida do genoma da estirpe SmRI sequenciado pelo consórcio GENOPAR (PEDROSA *et al.*, 2011). A busca por domínios conservados da proteína hemaglutinina filamentosa de *H. seropedicae* foi feita pelo portal do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2017). Para a construção dos modelos estruturais teóricos da proteína hemaglutinina filamentosa de *H. seropedicae*, baseados em

homologia, foi utilizado o programa SWISS-MODEL disponível em <<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>> (BIASINI *et al.*, 2014; BIENERT *et al.*, 2017; GUEX *et al.*, 2009; BENKERT *et al.*, 2011, BERTONI *et al.*, 2017). Estes modelos foram gerados com bases em estruturas depositadas no “Protein Data Bank (PDB)” disponível em <<http://www.rcsb.org>> (WESTBROOK *et al.*, 2003).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. PROTEÍNA HEMAGLUTININA FILAMENTOSA DE *H. seropedicae*

As ferramentas de bioinformática são muito importantes na análise da função de genes e proteínas. Várias abordagens podem ser utilizadas para contribuir na caracterização funcional dos produtos gênicos. Dentre elas, podemos citar a predição da estrutura tridimensional de proteínas e a busca por domínios já caracterizados (LIU & ROST, 2003).

O NCBI permite fazer busca por domínios conservados (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2017). E a identificação dos domínios de uma proteína pode fornecer informações sobre sua função.

O gene *Hsero\_1294*, atualmente anotado como *Hsero\_RS06485*, de *H. seropedicae* SmR1 codifica para uma hemaglutinina filamentosa. A análise *in silico* foi feita a partir da seqüência primária de aminoácidos do gene *Hsero\_1294*, obtida do genoma da estirpe SmRI (PEDROSA *et al.*, 2011).

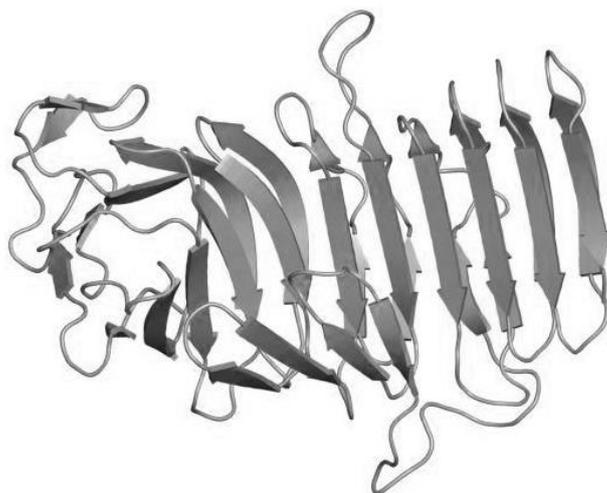
A seqüência do gene *Hsero\_1294* gera uma proteína hemaglutinina filamentosa (FHA) de 2658 aminoácidos, com peso molecular elevado de aproximadamente 270 kDa e com alguns domínios característicos (Figura 10). A proteína contém um domínio N-terminal de hemaglutinina filamentosa (Haemagg\_act). Esse domínio possui 133 aminoácidos e é sugerido como um sítio de atividade de hemaglutinação. O domínio de atividade de hemaglutinação é um domínio proteico conservado encontrado próximo ao terminal N de um número de proteínas bacterianas grandes e repetitivas, incluindo muitas proteínas de mais de 2.500 aminoácidos. Este domínio é sugerido como sendo um local de atividade de hemaglutinação dependente de carboidrato (KAJAVA *et al.*, 2001). A proteína é constituída também do domínio AidA com 436 aminoácidos. AidA pertence a uma superfamília encontrada em proteínas autotransportadoras bacterianas que medeia a agregação bacteriana e a formação de biofilme, bem como a adesão à células (CHARBONNEAU &

MOUREZ, 2007). Além deste domínio, possui também um domínio FhaB, encontrados em exoproteínas de grande tamanho envolvidas na utilização do grupo heme ou na adesão. Gottig e colaboradores (2009) mostraram por meio de deleção a importância de FhaB na adesão e formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas. E por fim, a proteína contém também dois domínios Fil\_haemagg\_2 (repetição de hemaglutinação). Esta repetição altamente divergente ocorre em proteínas implicadas na agregação celular (RELMAN *et al.*, 1989).



**FIGURA 10 - Representação esquemática dos domínios da proteína Hemaglutinina Filamentosa do gene *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*.** Os domínios conservados foram identificados de acordo com o banco de dados do NCBI (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2017). A proteína contém domínios Haemagg\_act (cinza), AidA (azul), FhaB (verde) e Fil\_haemagg\_2 (vermelho). Os números em preto indicam a posição dos aminoácidos na proteína.

Na ausência de dados experimentais, é possível prever a estrutura tridimensional de proteínas a partir de sua estrutura primária. A construção de modelos da estrutura tridimensional de proteínas baseada na homologia é um dos métodos mais confiáveis para a obtenção da informação estrutural. Para a construção dos modelos estruturais teóricos baseados em homologia, da proteína hemaglutinina filamentosa de *H. seropedicae* (Figura 11), foi utilizado o programa SWISS-MODEL (BIASINI *et al.*, 2014; BIENERT *et al.*, 2017; GUEX *et al.*, 2009; BENKERT *et al.*, 2011, BERTONI *et al.*, 2017), utilizando-se as sequências de aminoácidos do gene *Hsero\_RS06485* (*Hsero\_1294*) (PEDROSA *et al.*, 2011).



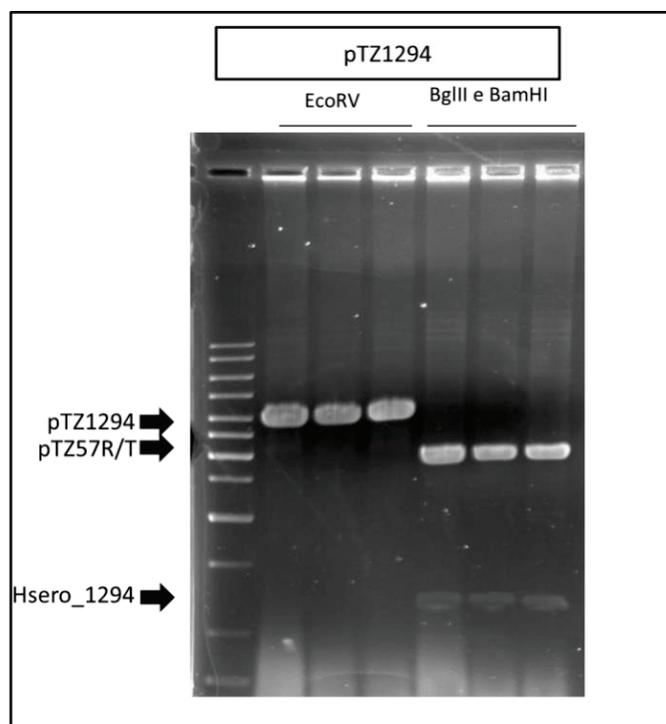
**FIGURA 11 - Modelo estrutural teórico da proteína hemaglutinina filamentosa (FHA) de *H. seropedicae*.** A estrutura predita da proteína hemaglutinina filamentosa de *H. seropedicae* foi gerada pelo programa SWISS-MODEL (BIASINI *et al.*, 2014; BIENERT *et al.*, 2017; GUEX *et al.*, 2009; BENKERT *et al.*, 2011, BERTONI *et al.*, 2017).

## 6.2. ESTIRPE MUTANTE DE *H. seropedicae* SmR1 NO GENE *Hsero\_1294*

No genoma de *H. seropedicae* foram encontrados genes que codificam para proteínas que podem ser hemaglutininas/hemolisinas. O perfil transcricional de *H. seropedicae*, aderido às raízes de trigo, revelou que o gene *Hsero\_1294*, que codifica para uma proteína hemaglutinina filamentosa, teve a sua expressão aumentada durante a interação planta-bactéria, apresentando um fold change de 2,8 quando comparado com as células planctônicas (PANKIEVICZ *et al.*, 2016). A proteína codificada pelo gene *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* possui um domínio do tipo adesina e pode estar relacionado com adesão e formação de biofilme durante a colonização dos tecidos da planta. Portanto, esse gene foi escolhido para ser mutagenizado, a fim de avaliar se a bactéria mutante perde a capacidade de colonizar a planta.

Para a construção da estirpe mutante no gene *Hsero\_1294* (PANKIEVICZ, dados não publicados), o gene foi amplificado com os *primers* 1294F (TGCAGATCTCTACTCCGAGCG) e 1294R

(CGCATGGATCCGGGCATCAG) e o fragmento amplificado foi clonado no vetor pTZ57R/T, gerando pTZ1294. A clonagem foi confirmada por restrição com as enzimas *BglII/BamHI* e *EcoRV* (Figura 12). Em seguida, um cassete de resistência ao antibiótico canamicina (Km) foi retirado do vetor pUC4-KIXX (BARANY, 1985) e subclonado no plasmídeo pTZ1294 e inserido no meio do gene *Hsero\_1294*, interrompendo o gene, gerando o plasmídeo pTZ1294Km (Figura 13). O plasmídeo pTZ1294Km foi digerido com as enzimas *BamHI*, *EcoRI* e *PstI* para confirmar a correta inserção do cassete Km (Figura 14). Depois, o fragmento 1294Km foi subclonado no vetor pSUP202, gerando o plasmídeo pSUP1294Km o qual foi conjugado com *H. seropedicae* e a estirpe mutante foi obtida por recombinação homóloga. Novamente, a confirmação da construção foi feita através de restrição com as enzimas *HindIII*, *BamHI* e *Sall* (Figura 15) (PANKIEVICZ, dados não publicados).



**FIGURA 12 - Confirmação do plasmídeo pTZ1294.** Na restrição *BglII/BamHI* observa-se dois fragmentos: um de 3kb que corresponde ao vetor pTZ57R/T e outro de 1,2 kb que corresponde ao gene *Hsero\_1294*. Com a enzima *EcoRV* observa-se somente uma banda de aproximadamente 4kb que corresponde ao plasmídeo pTZ1294 aberto. FONTE: Pankiewicz, dados não publicados.

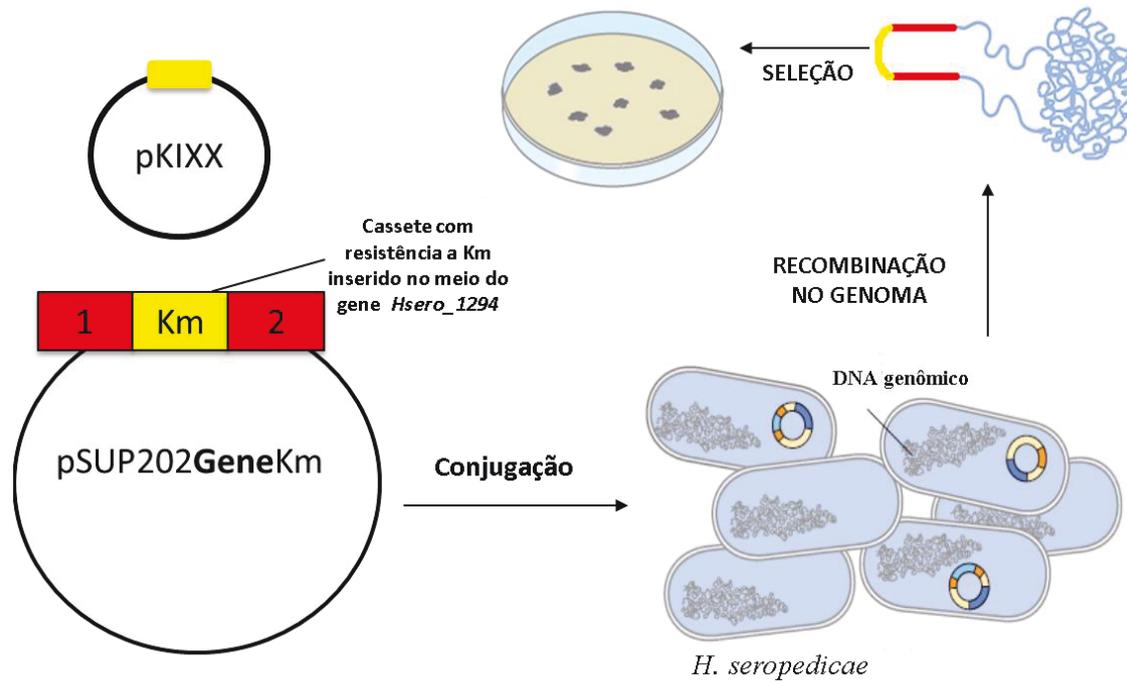


FIGURA 13 – Esquema da obtenção do mutante no gene *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*.

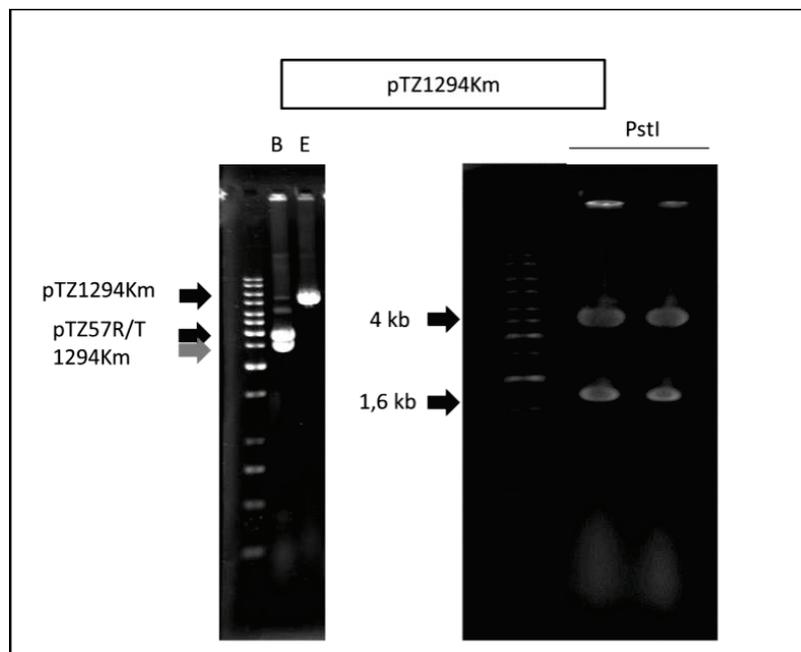
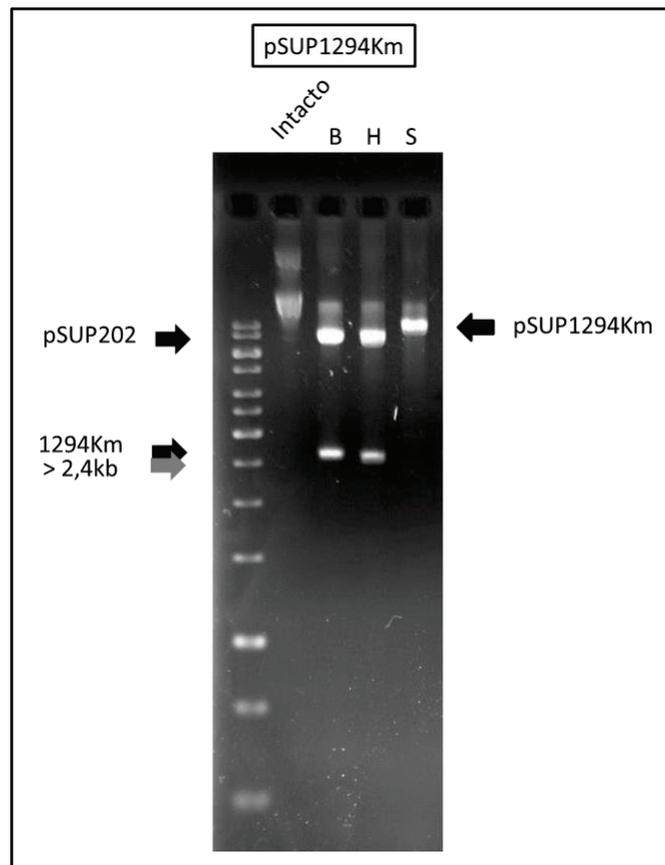


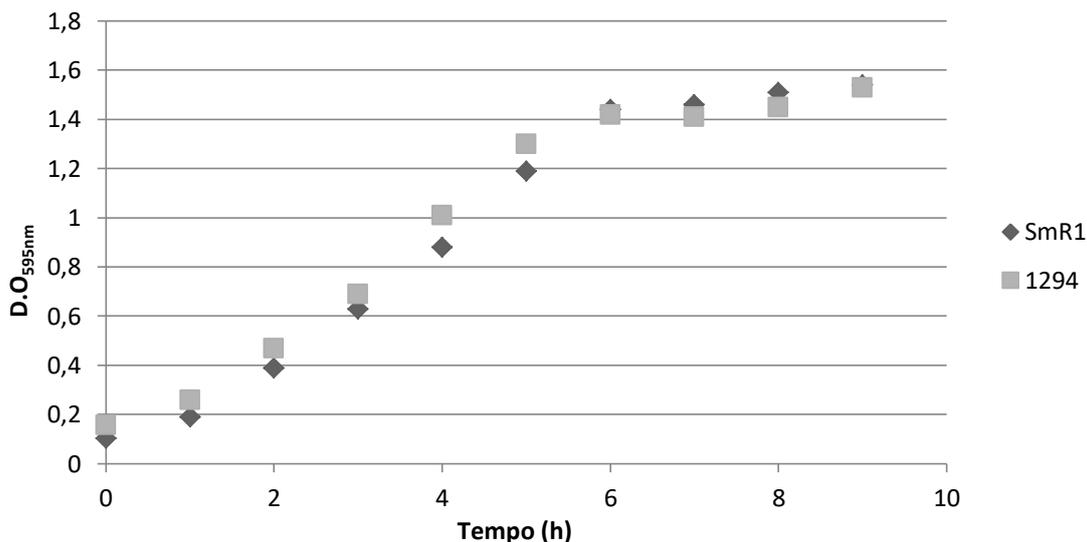
FIGURA 14 - Confirmação do plasmídeo pTZ1294Km. Na restrição *BamHI* observa-se dois fragmentos: um de 3kb que corresponde ao vetor pTZ57R/T e outro de aproximadamente 2,5kb que corresponde ao gene *Hsero\_1294* com o cassete de resistência a canamicina. Com a enzima *EcoRI* observa-se somente uma banda de aproximadamente 6kb que corresponde ao plasmídeo pTZ1294Km aberto. Na restrição *PstI* observa-se um fragmento de aproximadamente 4kb correspondente ao plasmídeo pTZ1294 e outro fragmento de 1,6kb que corresponde ao cassete de resistência a canamicina. FONTE: Pankievicz, dados não publicados.



**FIGURA 15 - Confirmação do plasmídeo pSUP1294Km.** Na restrição *BamHI* e *HindIII* observa-se um fragmento de aproximadamente 8kb correspondente ao plasmídeo pSUP202 e outro de aproximadamente 2,5kb que corresponde ao 1294km. Na restrição com a enzima *Sall* observa-se apenas uma banda de aproximadamente 10kb correspondente ao plasmídeo pSUP1294Km aberto. FONTE: Pankiewicz, dados não publicados.

### 6.3. CURVA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE *Hsero\_1294*

Para verificar se a mutação no gene *Hsero\_1294* afeta o crescimento da bactéria, uma curva de crescimento foi feita comparando a estirpe mutante com a estirpe selvagem SmR1 (Figura 16). Na figura 16 podemos observar que as curvas de crescimento são semelhantes, sugerindo que a mutação no gene *Hsero\_1294* não altera o crescimento da bactéria em meio NFbHPN - Malato.



**FIGURA 16 - Curva de crescimento das estirpes de *H. seropedicae* SmR1 e *Hsero\_1294*.**

Padrão de crescimento das estirpes de *H. seropedicae* através da medição da densidade ótica em um comprimento de onda de 595nm ao longo do tempo. As estirpes foram crescidas em meio líquido NFbHPN - malato líquido. O crescimento bacteriano foi acompanhado através da medição feita a cada uma hora, durante 10 horas. O ponto zero corresponde ao primeiro ponto da curva com D.O.<sub>595</sub> de 0,1.

#### 6.4. A MUTAÇÃO NO GENE *Hsero\_1294* AUMENTA A FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *H. seropedicae*

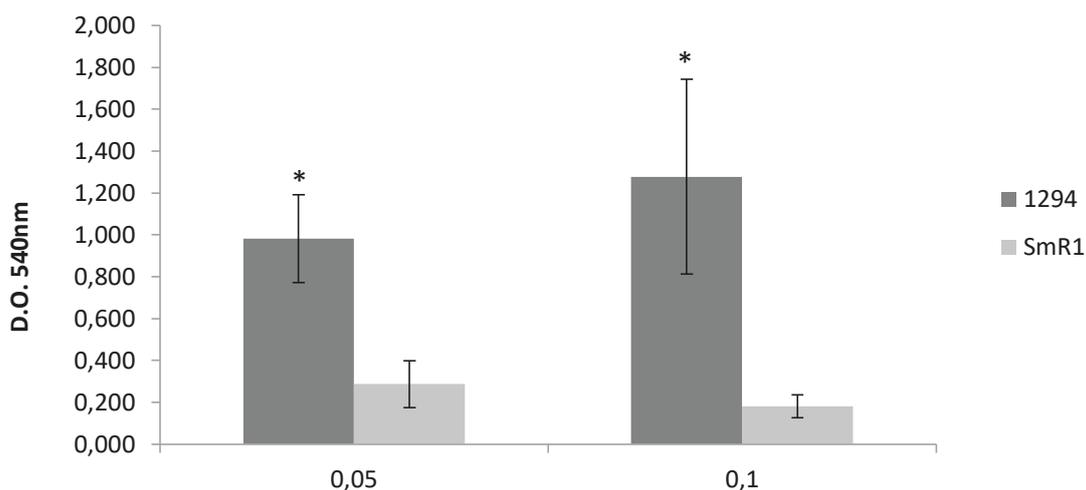
Uma vez que a mutação no gene *Hsero\_1294*, que codifica para uma proteína contendo domínio N-terminal de hemaglutinina filamentosa, pode influenciar na formação de biofilme, a estirpe mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* foi testada quanto à capacidade de formar biofilme.

Primeiramente foi realizado um ensaio de formação de biofilme (Figura 17) com as estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* em microplaca. As estirpes foram inoculadas com D.O.<sub>595nm</sub> inicial de 0,05 e também 0,1. A formação de biofilme foi avaliada quantitativamente após 24 horas e após 48 horas de crescimento (Figura 18 e 19) através da medida da

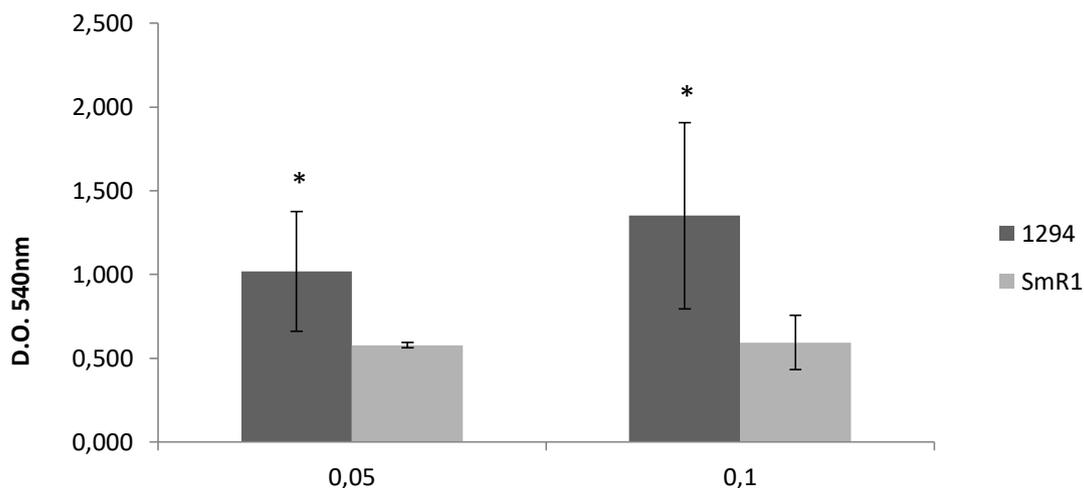
D.O<sub>540nm</sub> após descoloração da placa com etanol absoluto. Os resultados apresentados nas figuras 18 e 19 mostram uma diferença significativa entre a formação de biofilme das estirpes nos pontos de 24 e 48 horas. O mutante apresenta maior formação de biofilme em microplaca.



**FIGURA 17 - Formação de biofilme em microplaca.** Biofilme formado pelas estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* em microplaca após 48h de inoculação, com DO<sub>595nm</sub> inicial de crescimento 0,05 e 0,1. Coloração com violeta de genciana.



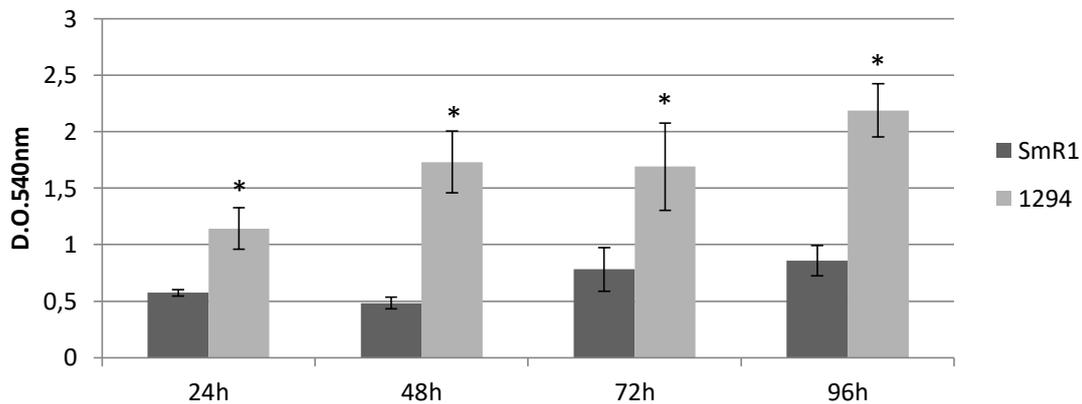
**FIGURA 18 - Capacidade das estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* em formar biofilme em microplaca após 24 horas de inoculação.** As estirpes de *H. seropedicae* SmR1 e mutante *Hsero\_1294* foram cultivadas até atingirem a DO<sub>595</sub> de 0,05 e 0,1. Após 24 horas, a formação de biofilme das estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* foi avaliada através do processo de descoloração da placa medido por D.O<sub>540nm</sub>. Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes, n=9. (\*) Diferença significativa entre a estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* (Teste T: valor de p < 0,05).



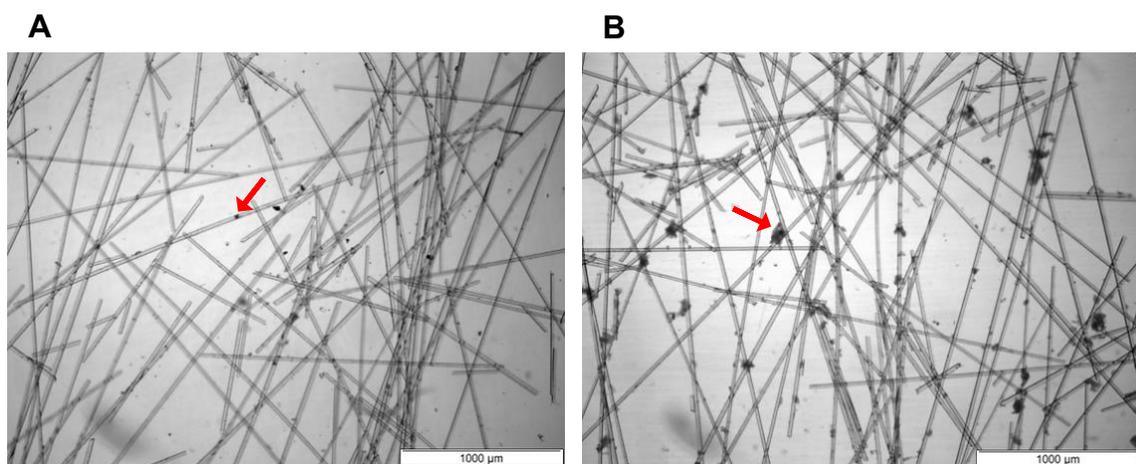
**FIGURA 19 - Capacidade das estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* em formar biofilme em microplaca após 48 horas de inoculação.** As estirpes de *H. seropedicae* SmR1 e mutante *Hsero\_1294* foram cultivadas até atingirem a DO<sub>595</sub> de 0,05 e 0,1. Após 48 horas, a formação de biofilme das estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* foi avaliada através do processo de descoloração da placa medido por D.O.<sub>540nm</sub>. Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes, n=9. (\*) Diferença significativa entre a estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* (Teste T: valor de p < 0,05).

Ensaio de formação de biofilme também foram realizados em fibra de vidro. As estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* na concentração  $10^6$  células/mL foram inoculadas em 10mL de NFBHNP – malato contendo 50 mg de fibra de vidro. A formação de biofilme foi avaliada ao longo do tempo, no intervalo entre 24 e 96 horas. Estes ensaios foram avaliados quantitativamente através da medida da D.O.<sub>540nm</sub> (Figura 20) e também qualitativamente através de microscopia óptica (Figura 21, 22, 23 e 24). A coloração utilizada foi violeta de genciana. Os resultados obtidos neste experimento indicam que há uma diferença significativa após 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento das estirpes na presença de lã de vidro. A estirpe mutante mostrou um aumento na formação de biofilme quando comparada com a estirpe selvagem. Observações microscópicas após 24, 48, 72 e 96 horas de

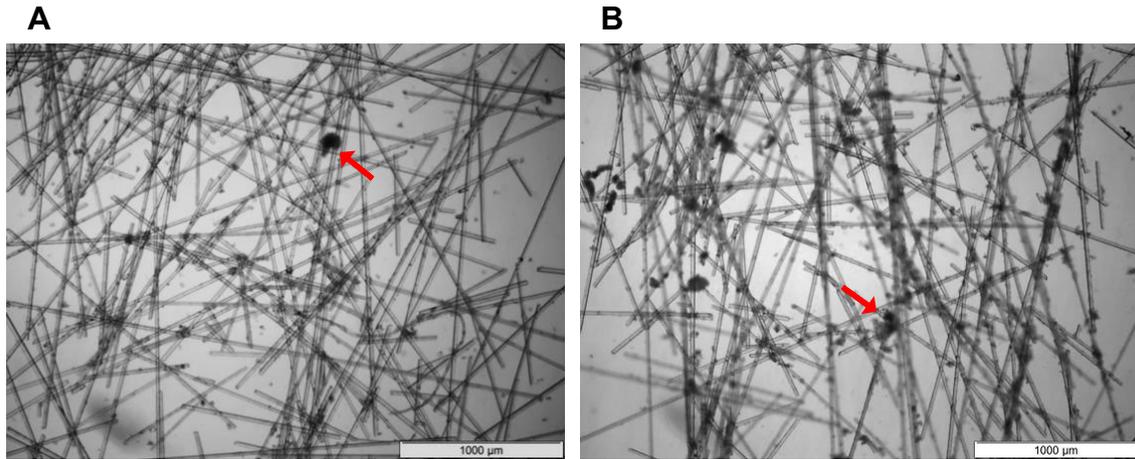
crescimento mostraram que a estirpe mutante forma mais agregados, apresentando mais células aderidas à lã de vidro do que a estirpe selvagem.



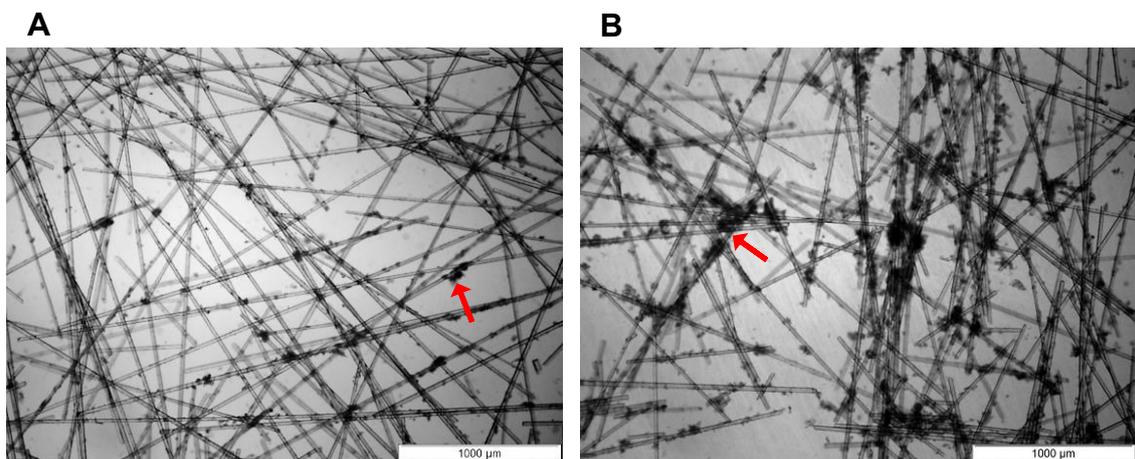
**FIGURA 20 - Ensaio quantitativo da formação de biofilme em fibra de vidro da estirpe selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*.** Avaliação da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* no decorrer de 96 horas, através do processo de descoloração da lã de vidro medido por D.O.<sub>540nm</sub>. Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes realizados em triplicata biológica. (\*) Diferença significativa entre a estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* (Teste T: valor de  $p < 0,05$ ).



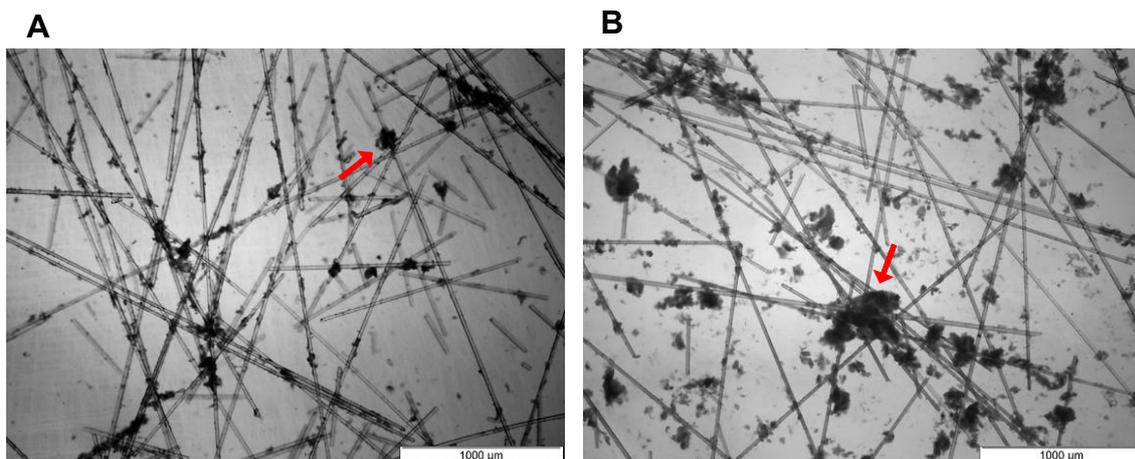
**FIGURA 21 – Ensaio qualitativo da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* após 24 horas de inoculação.** Microscopia óptica da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 (A) e mutante *Hsero\_1294* (B) após 24 horas de crescimento em objetiva de 4X. Setas indicam bactérias aderidas às fibras.



**FIGURA 22 – Ensaio qualitativo da formação de biofilme em fibra de vidro da estirpe selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* após 48 horas de inoculação.** Microscopia óptica da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 (A) e mutante *Hsero\_1294* (B) após 48 horas de crescimento em objetiva de 4X. Setas indicam bactérias aderidas às fibras.



**FIGURA 23 – Ensaio qualitativo da formação de biofilme em fibra de vidro da estirpe selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* após 72 horas de inoculação.** Microscopia óptica da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 (A) e mutante *Hsero\_1294* (B) após 72 horas de crescimento em objetiva de 4X. Setas indicam bactérias aderidas às fibras.



**FIGURA 24 – Ensaio qualitativo da formação de biofilme em fibra de vidro da estirpe selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* após 96 horas de inoculação.** Microscopia óptica da formação de biofilme da estirpe selvagem SmR1 (A) e mutante *Hsero\_1294* (B) após 96 horas de crescimento em objetiva de 4X. Setas indicam bactérias aderidas às fibras.

Os dados quantitativos e qualitativos indicam que a estirpe mutante analisada apresenta um padrão diferente da estirpe selvagem. Nossos resultados indicam que a mutação no gene *Hsero\_1294*, um gene relacionado com a adesão, não diminui a formação de biofilme no método utilizado e interessantemente aumenta a formação de biofilme.

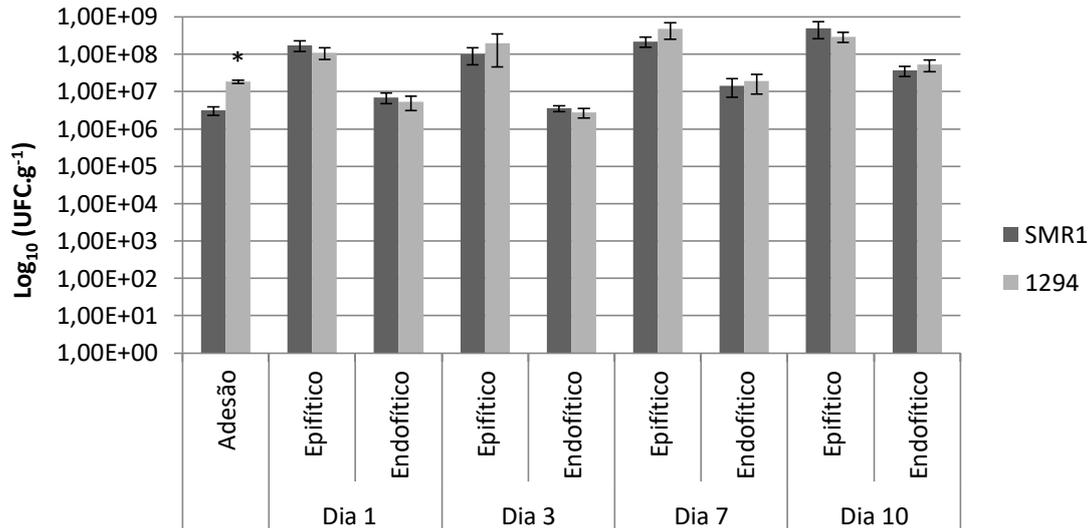
A formação de biofilmes em superfícies representa uma estratégia de sobrevivência utilizada por muitos microrganismos. A fixação do tecido vegetal e a agregação célula a célula dependem da ação coordenada de exopolissacarídeos e adesinas (GOTTIG *et al.*, 2009).

Gottig *et al.* (2009) estudaram uma hemaglutinina FhaB de *Xanthomonas*. Mutantes FhaB mostraram uma diminuição da adesão e na formação do biofilme. Aqui, no entanto, mostramos que embora um gene que codifica para uma hemaglutinina tenha sido mutagenizado, houve um aumento na formação de agregados dessa bactéria. Dados de transcriptoma indicam que essa adesina é um fator importante para a colonização (PANKIEVICZ *et al.*, 2016), mas a mutação no gene *Hsero\_1294* aumentou a adesão da bactéria às superfícies abióticas, sugerindo vias divergentes para a formação de biofilme em superfícies.

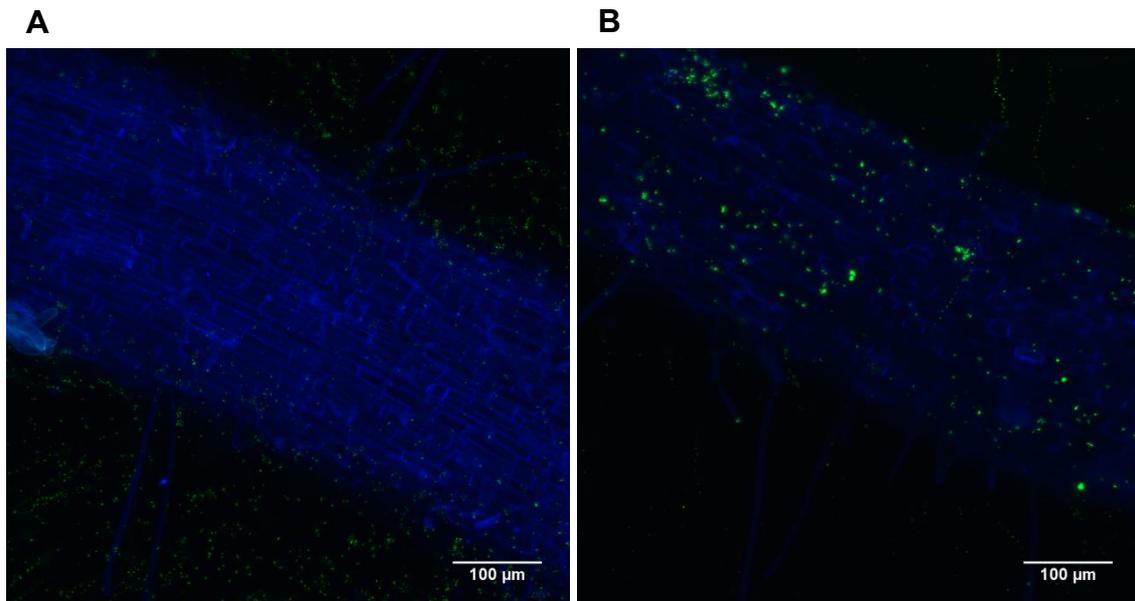
## 6.5. MUTAÇÃO NO GENE *Hsero\_1294* NÃO ALTERA A CAPACIDADE DO *H. seropedicae* COLONIZAR RAÍZES DE ARROZ E AUMENTA A ADESÃO

A estirpe mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* foi utilizada em ensaios de adesão e colonização em arroz (*Oryza sativa*). Mutações em genes relacionados com adesinas podem afetar a adesão e colonização das estirpes em plantas, uma vez que estes genes já foram descritos como importantes na interação planta-bactéria. Dados de transcriptoma sugerem que *H. seropedicae* adere às raízes do trigo provavelmente através de adesinas específicas. Comparação do perfil de RNA de bactérias aderidas e planctônicas revelou adaptações metabólicas, que incluem a expressão de adesinas específicas e re-modelagem da parede celular bacteriana para anexar a raiz (PANKIEVICZ *et al.*, 2016).

Os dados de colonização epifítica e endofítica mostram que a estirpe mutante não apresentou padrão diferencial em comparação com a estirpe selvagem 1, 3, 7 e 10 d.a.i. (Figura 25). Entretanto, a estirpe mutante *Hsero\_1294* apresentou maior adesão em raízes de arroz após 30 minutos de inoculação, quando comparadas ao tipo selvagem. Esse resultado pode ser observado também por imagens de microscopia confocal de fluorescência (Figura 26, 27, 28, 29 e 30). De acordo com as imagens microscópicas, as estirpes selvagem e mutante parecem não apresentar diferenças na colonização em 1, 3, 7 e 10 d.a.i. No entanto, assim como observado nos dados quantitativos, a figura 26 indica que pode haver diferença na adesão após 30 minutos de inoculação, apresentando um maior número de bactérias mutantes aderidas à raiz de arroz em comparação com a estirpe selvagem.

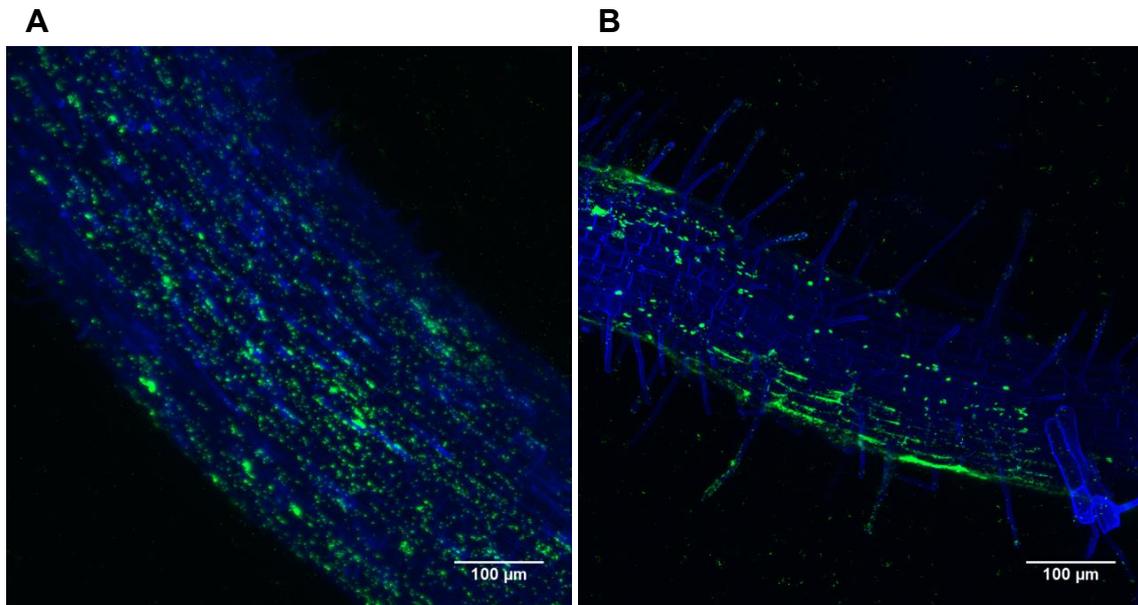


**FIGURA 25 - Adesão e colonização de raízes de arroz pelas estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae*.** Plântulas de arroz foram inoculadas com  $10^5$  células das estirpes de *H. seropedicae*, e o número de bactérias aderidas à raiz após lavagem foi determinado. O número de células epifíticas e endofíticas foi determinado 1, 3, 7 e 10 dias após inoculação (d.a.i.). Resultados expressos como média de Log<sub>10</sub> das unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de raiz fresca  $\pm$  desvio padrão. Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes, n=3 plantas por dia e condição. (\*) Diferença significativa entre as estirpes selvagem SmR1 e mutante *Hsero\_1294* (Teste T: valor de p < 0,05).

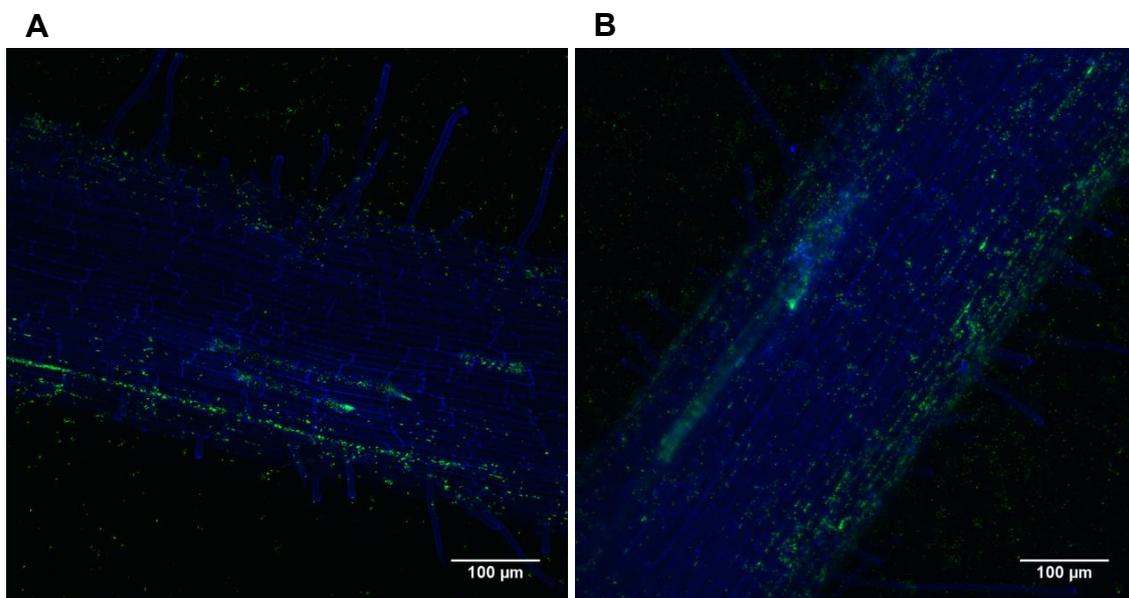


**FIGURA 26 – Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz após 30 minutos de inoculação.** Imagens de microscópio confocal na objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pelas estirpes selvagem SmR1 (A) e

mutante *Hsero\_1294* (B) contendo plasmídeo pHC60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência verde obtidas foram sobrepostas com as imagens de luz transmitidas da raiz.

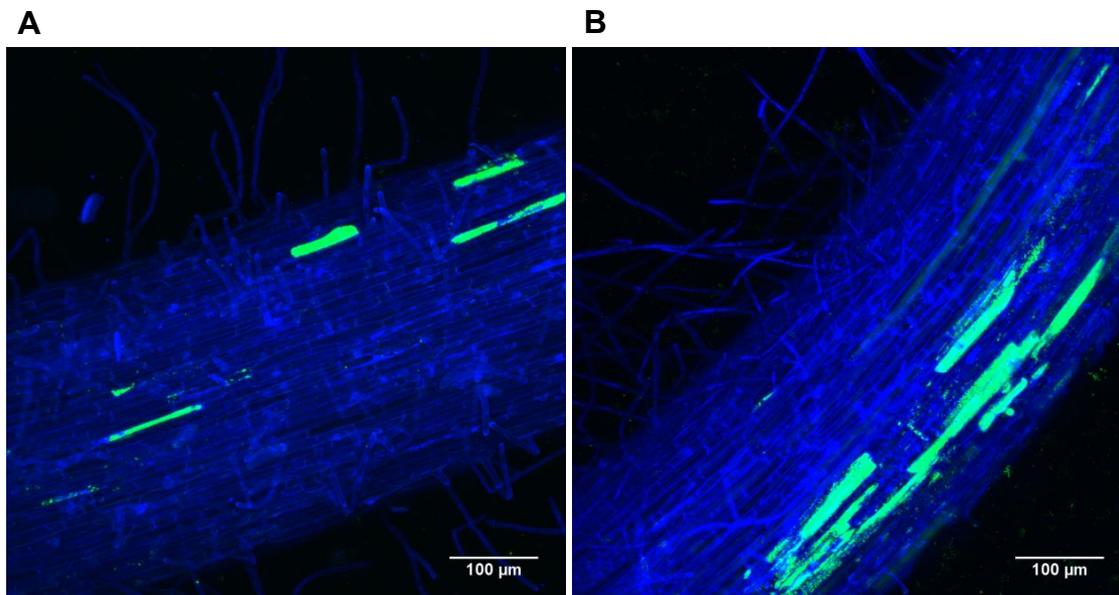


**FIGURA 27 – Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 1 d.a.i.** Imagens de microscópio confocal na objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pelas estirpes selvagem SmR1 (A) e mutante *Hsero\_1294* (B) contendo plasmídeo pHC60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência verde obtidas foram sobrepostas com as imagens de luz transmitidas da raiz.

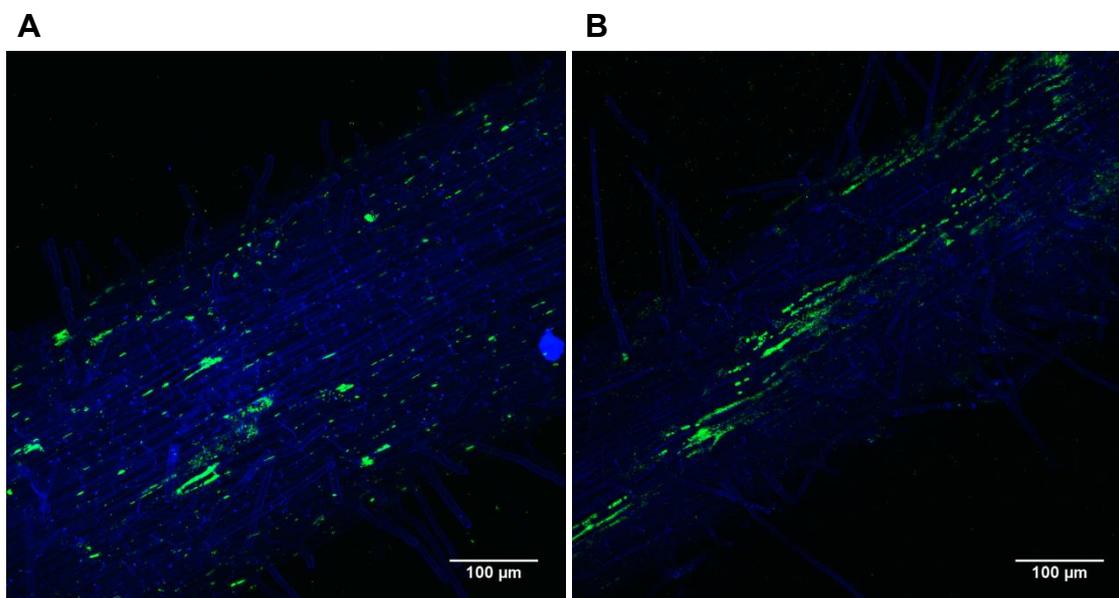


**FIGURA 28 – Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 3 d.a.i.** Imagens de microscópio confocal na objetiva 20X de

raízes de arroz colonizadas pelas estirpes selvagem SmR1 (A) e mutante *Hsero\_1294* (B) contendo plasmídeo pHC60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência verde obtidas foram sobrepostas com as imagens de luz transmitidas da raiz.



**FIGURA 29 –** Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 7 d.a.i. Imagens de microscópio confocal na objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pelas estirpes selvagem SmR1 (A) e mutante *Hsero\_1294* (B) contendo plasmídeo pHC60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência verde obtidas foram sobrepostas com as imagens de luz transmitidas da raiz.

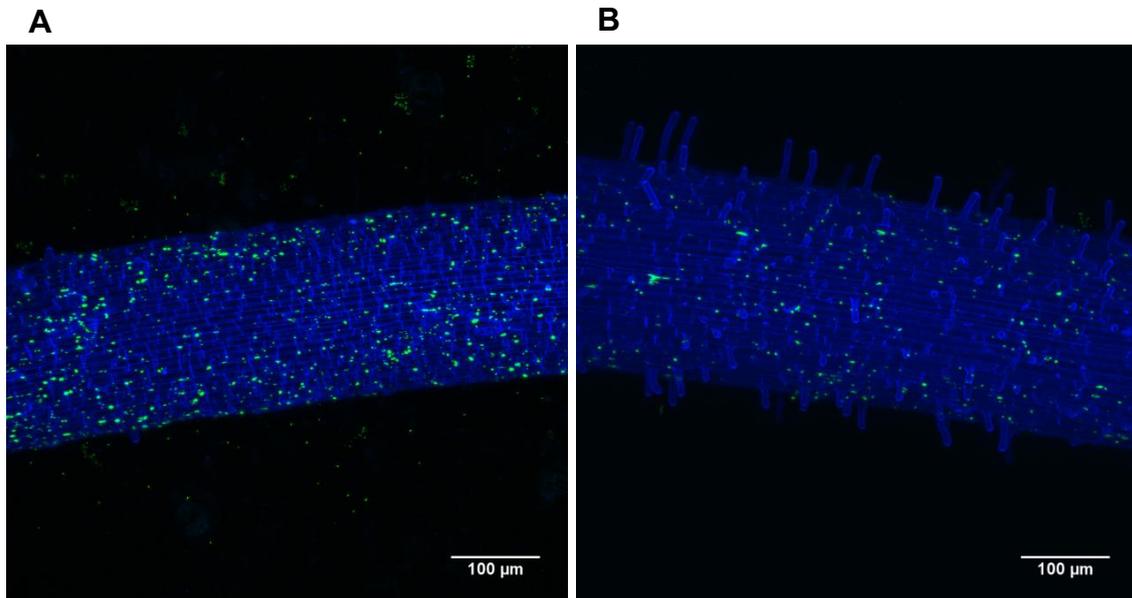


**FIGURA 30 –** Microscopia confocal de fluorescência das estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 10 d.a.i. Imagens de microscópio confocal na objetiva 20X de

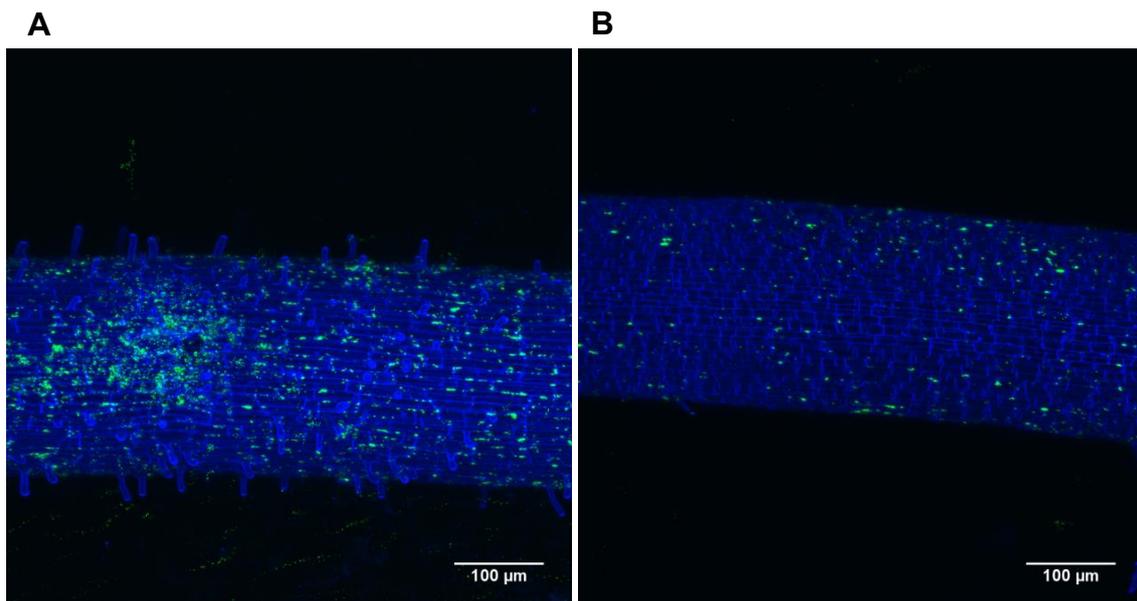
raízes de arroz colonizadas pelas estirpes selvagem SmR1 (A) e mutante *Hsero\_1294* (B) contendo plasmídeo pHc60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência verde obtidas foram sobrepostas com as imagens de luz transmitidas da raiz.

Vários genes apresentam níveis de transcrição alterados durante a interação de bactérias com superfícies vegetais, o que pode influenciar a morfologia e o comportamento das células, incluindo genes essenciais para motilidade e fixação da superfície (BALSANELLI *et al.*, 2016). Porém esse fenótipo ainda não é bem compreendido. Este ensaio de adesão sugere que a mutação no gene *Hsero\_1294*, que elimina a produção de uma hemaglutinina, pode estar influenciando a produção ou presença de outros componentes da superfície bacteriana, modificando o envelope celular e causando as mudanças observadas no processo de adesão bacteriana às raízes das plântulas de arroz.

Com o intuito de verificar se as células bacterianas estavam desprendendo da superfície vegetal de forma semelhante, nós também analisamos lâminas preparadas com raízes antes e depois do vórtex com salina 0,9% e Tween20 0,001% 1 d.a.i. (Figura 31 e 32). Tanto na figura 31 correspondente a estirpe selvagem quanto na figura 32 correspondente ao mutante, observamos o desprendimento das bactérias após o vórtex, mas não totalmente. Além disso, podemos notar um padrão diferente entre as estirpes selvagem e mutante. De acordo com as imagens, as bactérias mutantes parecem se desprender mais facilmente do que as bactérias selvagens. No entanto, para a análise microscópica uma lâmina foi preparada com uma raiz antes do vórtex e outra lâmina foi preparada com outra raiz após o vórtex. O método utilizado não permite analisar a mesma raiz nas duas condições, portanto, esses resultados podem gerar incertezas e, dessa forma, outros testes devem ser realizados para confirmar tal resultado.



**FIGURA 31 –** Microscopia confocal de fluorescência do efeito do vortex na recuperação da estirpe selvagem SmR1 de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 1 d.a.i. Imagens de microscópio confocal na objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pelas estirpes selvagem SmR1 contendo plasmídeo pHC60 que expressa GFP antes (A) e depois (B) do vórtex com salina 0,9% e Tween20 0,001%. As imagens de fluorescência verde obtidas foram sobrepostas com as imagens de luz transmitidas da raiz.



**FIGURA 32 –** Microscopia confocal de fluorescência do efeito do vortex na recuperação da estirpe mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 1 d.a.i. Imagens de microscópio confocal na objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pelas estirpes mutante *Hsero\_1294* contendo plasmídeo pHC60 que expressa GFP antes (A) e depois (B) do vórtex com salina 0,9% e Tween20 0,001%. As imagens de fluorescência verde obtidas foram sobrepostas com as imagens de luz transmitidas da raiz.

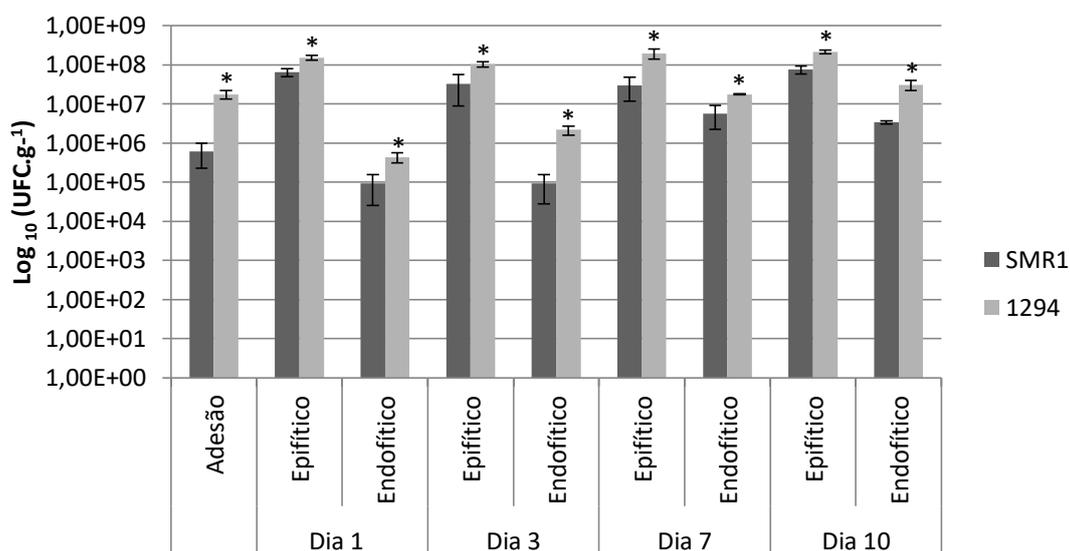
O vórtex produz um movimento orbital vibratório que cria um vórtice no líquido submetido ao aparelho, e como resultado remove ou reduz a adesão dos microrganismos em uma superfície (PARIZZI, 2004). Muitas pesquisas mostraram a utilização de vórtex para recuperar bactérias aderidas ao tecido vegetal para a realização da contagem bacteriana por grama de raiz (BALSANELLI *et al.*, 2010; BALSANELLI *et al.*, 2016; PANKIEVICZ *et al.*, 2016). Neste estudo mostramos qualitativamente uma diferença na quantidade de bactérias aderidas após a vortexagem da raiz em 1ml de salina 0,9% e Tween20 0,001%. As imagens de microscopia confocal de fluorescência sugerem que o vórtex promove o desprendimento das bactérias da superfície vegetal, mas não consegue remover totalmente todas as células aderidas. Dessa forma, podemos inferir que o vórtex não é um método completamente eficiente para o desprendimento das bactérias aderidas à raiz vegetal e, por consequência, pode haver um equívoco na contagem de bactérias. Por conta disso, é importante ter dados quantitativos e qualitativos que se complementem para obtenção de dados mais robustos.

#### 6.6. A ESTIRPE MUTANTE *Hsero\_1294* DE *H. seropedicae* É MAIS COMPETITIVA QUE A ESTIRPE SELVAGEM SmR1 EM COLONIZAR EPIFITICAMENTE E ENDOFITICAMENTE RAÍZES DE ARROZ

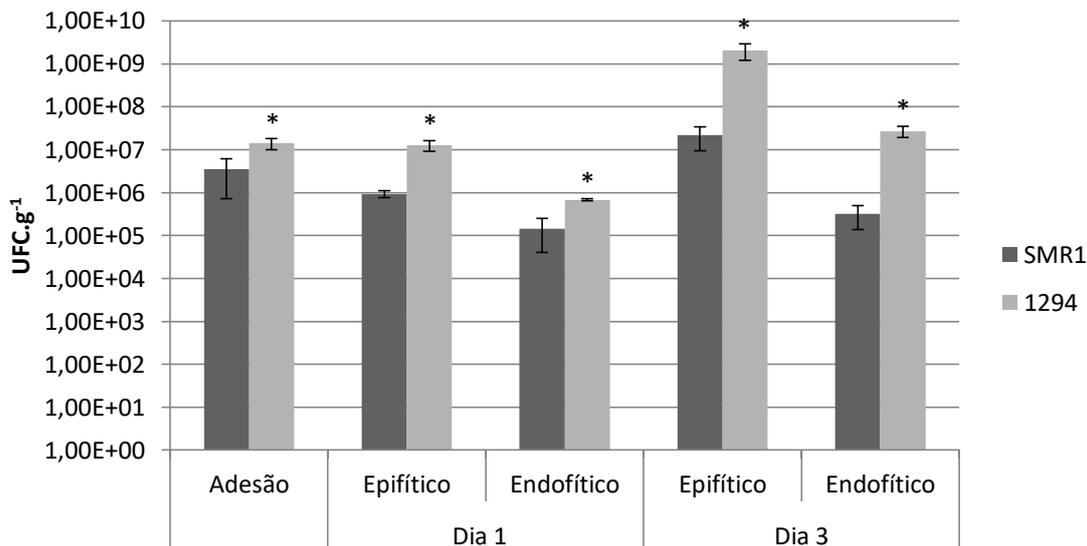
A capacidade de ligação microbiana em células vegetais provavelmente atua como fator chave na determinação da competitividade das bactérias em colonizar as raízes. Nossos resultados de inoculação com o mutante *Hsero\_1294* em raízes de arroz revelaram um maior número de bactérias aderidas à superfície após 30 minutos de inoculação quando comparadas com o ensaio de colonização da estirpe selvagem. Dessa forma, testamos a capacidade competitiva entre as duas estirpes.

Ensaio de co-inoculação revelaram que a mutação no gene *Hsero\_1294* não diminuiu a capacidade competitiva, e teve um efeito diferente comparado ao experimento com inoculação separada. Surpreendentemente, o

número de células epifíticas e endofíticas do mutante foi maior que o de células selvagens co-inoculadas (Figura 33). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na colonização entre as estirpes, sugerindo uma vantagem competitiva para a estirpe mutante de *Herbaspirillum seropedicae* durante todas as etapas da colonização. Este resultado foi semelhante em trigo (Figura 34) (PANKIEVICZ, dados não publicados).



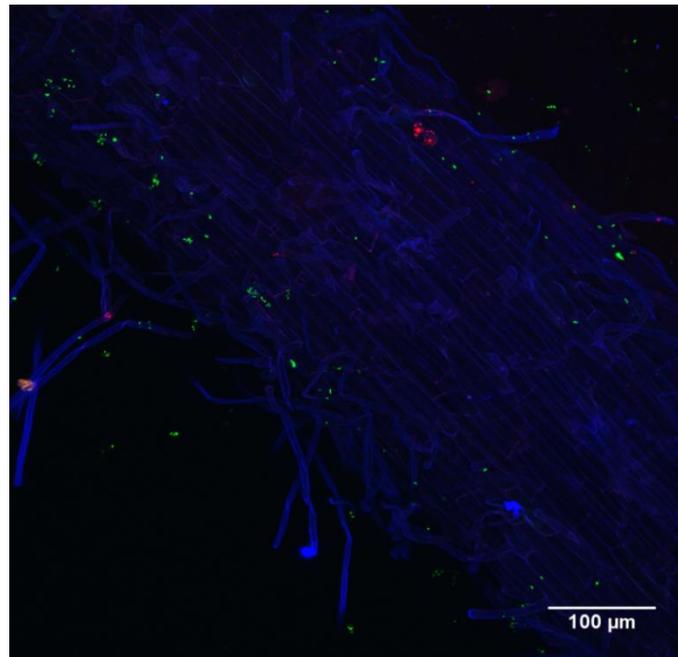
**FIGURA 33 - Ensaio de competição entre as estirpes selvagem SmR1 e mutante Hsero\_1294 de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz.** Plântulas de arroz foram inoculadas com  $10^5$  células das estirpes de *H. seropedicae*, e o número de bactérias aderidas à raiz após lavagem foi determinado. O número de células epifíticas e endofíticas foi determinado 1, 3, 7 e 10 dias após inoculação (d.a.i.). Resultados expressos como média de Log<sub>10</sub> das unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de raiz fresca  $\pm$  desvio padrão, n=3 plantas por dia e condição. (\*) Diferença significativa entre SmR1 e mutante Hsero\_1294 (Teste T: valor de p < 0,05).



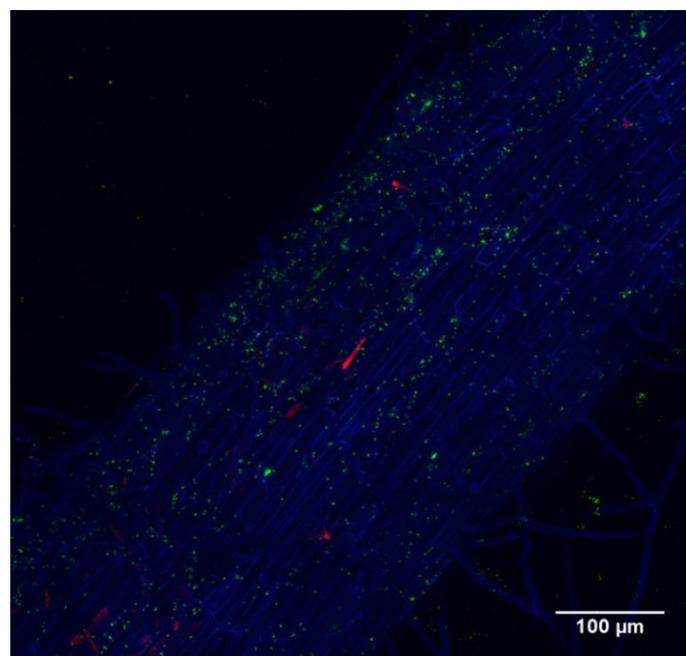
**FIGURA 34 - Ensaio de competição entre as estirpes selvagem SmR1 e mutante Hsero\_1294 de *H. seropedicae* colonizando raízes de trigo.** Plântulas de trigo foram inoculadas com  $10^5$  células das estirpes de *H. seropedicae*, e o número de bactérias aderidas à raiz após lavagem foi determinado. O número de células epifíticas e endofíticas foi determinado 1 e 3 dias após inoculação (d.a.i.). Resultados expressos como média de  $\text{Log}_{10}$  das unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de raiz fresca  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$  plantas por dia e condição. (\*) Diferença significativa entre SmR1 e mutante Hsero\_1294 (Teste T: valor de  $p < 0,05$ ). FONTE: Pankiewicz, não publicado.

Esses resultados mostram que a mutação no gene *Hsero\_1294* não altera a colonização da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* somente em arroz, uma vez que o mesmo padrão também foi observado em trigo.

Podemos notar o mesmo padrão de competição entre as estirpes selvagem e mutante em arroz a partir das imagens de microscopia confocal de fluorescência (Figuras 35, 36, 37, 38 e 39). As imagens de microscopia confocal mostram menor fluorescência vermelha, correspondente às bactérias selvagens, do que fluorescência verde, correspondente às bactérias mutantes, indicando que o mutante apresenta uma vantagem competitiva quando co-inoculado com a estirpe selvagem, corroborando com os dados quantitativos. Desta forma, nossos dados de microscopia confocal de fluorescência junto com os dados quantitativos de colonização das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* sugerem que a mutação no gene *Hsero\_1294* leva a uma vantagem competitiva na colonização da bactéria em raízes de arroz.

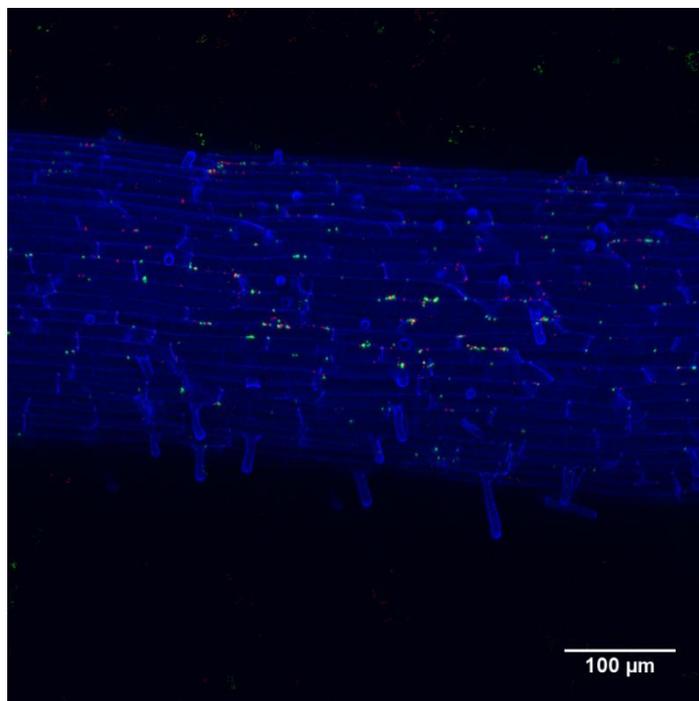


**FIGURA 35 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz após 30 minutos de inoculação.** Imagens de microscópio confocal em objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pela estirpe RAM4 que expressa constitutivamente a proteína DsRed que codifica uma proteína fluorescente vermelha e estirpe mutante *Hsero\_1294* contendo plasmídeo pHC60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência vermelha obtidas no microscópio confocal foram sobrepostas com as imagens das bactérias com marcação GFP e com imagens de luz transmitidas de raiz.

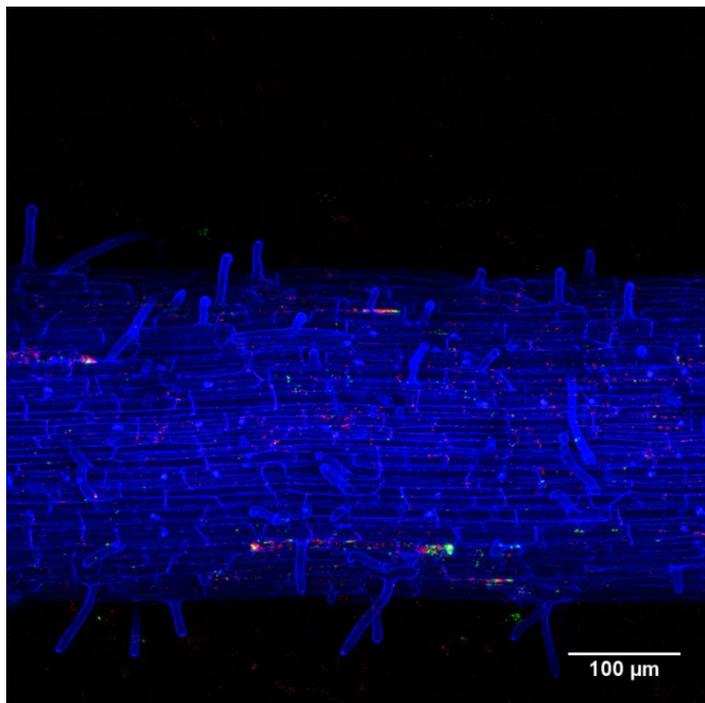


**FIGURA 36 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 1 d.a.i.** Imagens de microscópio

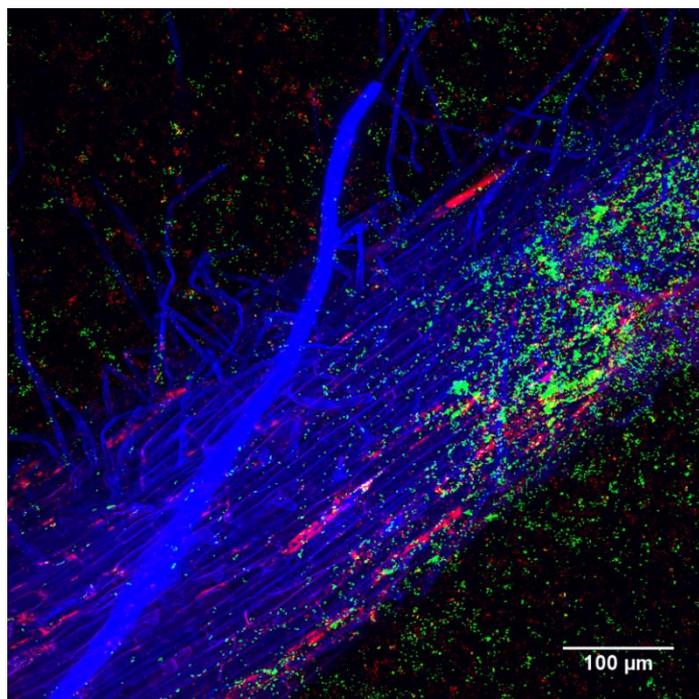
confocal em objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pela estirpe RAM4 que expressa constitutivamente a proteína DsRed que codifica uma proteína fluorescente vermelha e estirpe mutante *Hsero\_1294* contendo plasmídeo pHc60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência vermelha obtidas no microscópio confocal foram sobrepostas com as imagens das bactérias com marcação GFP e com imagens de luz transmitidas de raiz.



**FIGURA 37 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 3 d.a.i.** Imagens de microscópio confocal em objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pela estirpe RAM4 que expressa constitutivamente a proteína DsRed que codifica uma proteína fluorescente vermelha e estirpe mutante *Hsero\_1294* contendo plasmídeo pHc60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência vermelha obtidas no microscópio confocal foram sobrepostas com as imagens das bactérias com marcação GFP e com imagens de luz transmitidas de raiz.



**FIGURA 38 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 7 d.a.i.** Imagens de microscópio confocal em objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pela estirpe RAM4 que expressa constitutivamente a proteína DsRed que codifica uma proteína fluorescente vermelha e estirpe mutante *Hsero\_1294* contendo plasmídeo pHc60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência vermelha obtidas no microscópio confocal foram sobrepostas com as imagens das bactérias com marcação GFP e com imagens de luz transmitidas de raiz.

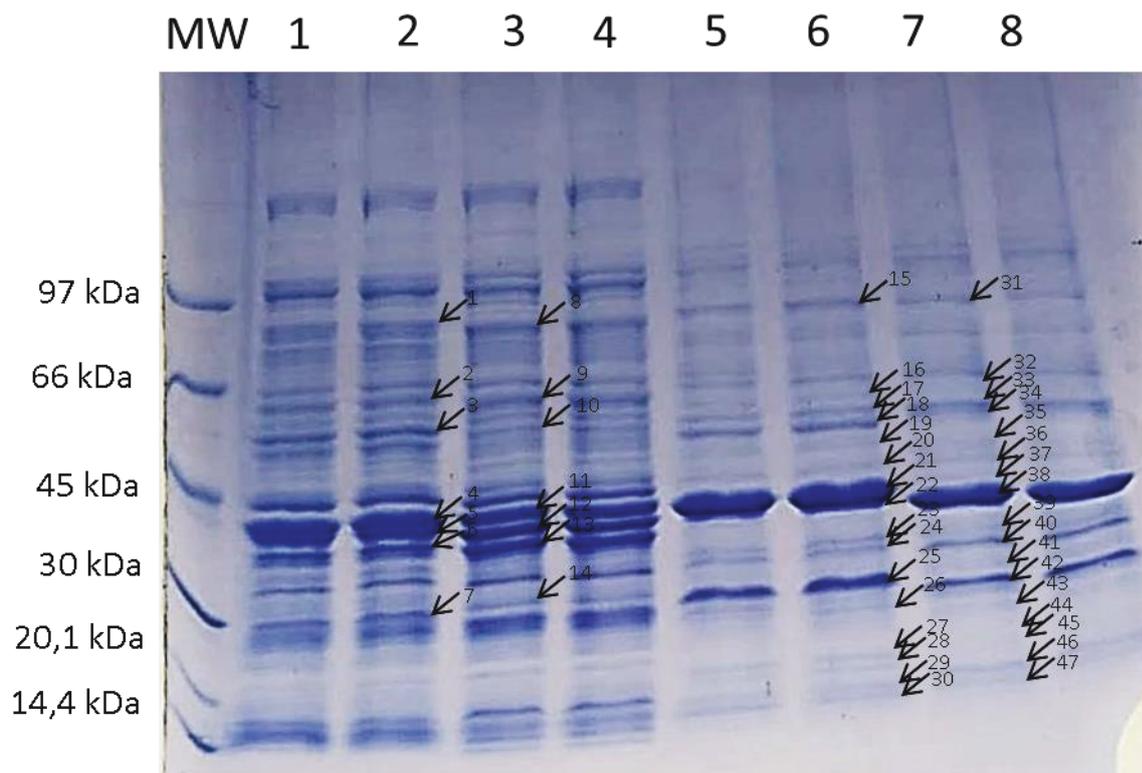


**FIGURA 39 – Microscopia confocal de fluorescência do ensaio de competição entre as estirpes de *H. seropedicae* colonizando raízes de arroz 10 d.a.i.** Imagens de microscópio

confocal em objetiva 20X de raízes de arroz colonizadas pela estirpe RAM4 que expressa constitutivamente a proteína DsRed que codifica uma proteína fluorescente vermelha e estirpe mutante *Hsero\_1294* contendo plasmídeo pHc60 que expressa GFP. As imagens de fluorescência vermelha obtidas no microscópio confocal foram sobrepostas com as imagens das bactérias com marcação GFP e com imagens de luz transmitidas de raiz.

#### 6.7. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DA ESTIRPE MUTANTE *Hsero\_1294* DE *H. seropedicae*

Muitas estruturas de superfície e proteínas da membrana externa podem contribuir para a fixação e agregação de células bacterianas em uma superfície de planta. Visando identificar diferentes proteínas de membrana externa entre as estirpes SmR1 e mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* com provável função de adesinas, proteínas totais de membrana externa foram isoladas de células de *H. seropedicae* crescidas em meio NFbHPN por ultracentrifugação após tratamento com sarcosil. Os extratos proteicos foram analisados por eletroforese em gradiente de acrilamida (SDS-PAGE 7,5-15%). As bandas proteicas foram coradas com Coomassie, e após fotodocumentação foram recortadas do gel e tratadas para análise por espectroscopia de massa (MS) (Figura 40).



**FIGURA 40 - Eletroforese das frações de membrana da estirpe mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* por SDS-PAGE 7,5-15%. Proteínas de membrana externa foram purificadas por ultracentrifugação após tratamento com sarcosil do extrato de proteínas totais de membrana. Linhas: MW – marcadores de massa molecular (em kDa); 1 e 2: replicatas biológicas do extrato total de proteínas de membrana da estirpe selvagem SmR1; 3 e 4: replicatas biológicas do extrato total de proteínas de membrana da estirpe mutante *Hsero\_1294*; 5 e 6 replicatas biológicas da fração de proteínas de membrana externa da estirpe selvagem SmR1; 7 e 8 replicatas biológicas da fração de proteínas de membrana externa da estirpe mutante *Hsero\_1294*. As proteínas foram coradas com Coomassie blue. Setas indicam as bandas analisadas por espectroscopia de massa.**

47 bandas proteicas foram excisadas do gel e os fragmentos tripticos foram analisados por MALDI-TOF (Tabela 8). As comparações de massa dos peptídeos ao banco de dados e respectivo score foram obtidos utilizando o programa MASCOT. Scores de proteínas superiores a 49 são significativos. Apenas 31 das 47 bandas proteicas foram identificadas com score aceitável.

TABELA 8 – IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DO MUTANTE *Hsero\_1294* DE *H. seropedicae* POR ESPECTROSCOPIA MALDI-TOF.

Número da banda	Score	Identificação
2	97	Hsero_0996: groEL1 chaperonin GroEL (HSP60) protein
3	121	Hsero_4362: atpD FOF1-type ATP synthase, beta subunit protein
5	52	Hsero_4295: outer membrane (porin) protein
6	76 56	Hsero_3857: ABC-type glutamate/aspartate transport system, periplasmic component protein Hsero_0964: adhA alcohol dehydrogenase protein
7	49	Hsero_3696: signal peptide protein
8	106 78	Hsero_1755: pnp polyribonucleotide nucleotidyltransferase protein Hsero_0111: fusA elongation factor G1 (EF-G1) protein
9	132	Hsero_0996: groEL1 chaperonin GroEL (HSP60) protein
10	119	Hsero_4362: atpD FOF1-type ATP synthase, beta subunit protein
11	170	Hsero_3499: qor NADPH: quinone oxidoreductase protein
12	142	Hsero_4295 outer membrane (porin) protein
13	103	Hsero_0964: adhA alcohol dehydrogenase protein
14	66	Hsero_2488: uspA universal stress protein
15	72	Hsero_2186: outer membrane/protective ONA87 antigen protein
17	77	Hsero_4362: atpD FOF1-type ATP synthase, beta subunit protein
18	114 74	Hsero_4364: atpA FOF1-type ATP synthase, alpha subunit protein Hsero_2070: fliC flagellin protein; filament structural protein
23	50	Hsero_4363: atpG FOF1-type ATP synthase, gamma subunit protein
24	130	Hsero_0120: rpsC 30S ribosomal subunit S3 protein
25	53	Hsero_1192: conserved hypothetical protein
26	97	Hsero_1769: nuoC NADH dehydrogenase I (Chain C) oxidoreductase protein
28	56	Hsero_2912: signal peptide protein
31	152	Hsero_2186: outer membrane/protective ONA87 antigen protein
32	52	Hsero_0230: conserved hypothetical protein
34	144 120	Hsero_4364: atpA FOF1-type ATP synthase, alpha subunit protein Hsero_0482: drug efflux lipoprotein
35	100	Hsero_2070: fliC flagellin protein: filament structural protein
36	57	Hsero_1770: nuoD NADH dehydrogenase I (Chain D) oxidoreductase protein
37	60 53	Hsero_3275: transmembrane lipoprotein Hsero_4295: outer membrane (porin) protein
38	238	Hsero_4295: outer membrane (porin) protein
40	62 56	Hsero_0474: conserved hypothetical protein Hsero_0120: rpsC 30S ribosomal subunit S3 protein
41	50	Hsero_2488: uspA universal stress protein
42	105	Hsero_3696: signal peptide protein

43	64	Hsero_3202: fixO cbb3-type cytochrome c oxidase, subunit II transmembrane protein
----	----	---

Dentre as proteínas identificadas por PMF, quase todas as proteínas encontradas não apresentaram diferença entre as estirpes selvagem e mutante e não tinham potencial envolvimento na interação com a planta. Porém uma proteína *uspA* (do inglês “universal stress protein”) foi identificada apenas no extrato total e na membrana externa da estirpe mutante *Hsero\_1294*.

Diversos membros da família de proteínas UspA são encontrados nos genomas de bactérias, arqueias e eucariotas, mas as funções biológicas e bioquímicas dessas proteínas não são completamente conhecidas. Nachin *et al.* (2005) mostraram que seis genes UspA de *E. coli* têm funções diferentes relacionadas à motilidade, à adesão e à resistência ao estresse oxidativo. Curiosamente, as proteínas Usp parecem ter efeitos nas propriedades da superfície celular e podem aumentar a adesão.

Infelizmente, existem dificuldades técnicas para purificar e identificar todas as possíveis moléculas de superfície bacteriana que poderiam estar envolvidas na ligação bacteriana. Mas a determinação e caracterização de moléculas de superfície bacteriana aparece como a maneira promissora de investigar quais moléculas estão realmente envolvidas na ligação bacteriana.

Além disso, através da figura 40, podemos notar diferenças nas concentrações de proteínas das estirpes selvagem e mutante. Desta forma, a realização de experimentos para determinação da concentração das proteínas se torna necessário.

Nossos resultados indicam que as mutações que eliminam a produção de uma determinada molécula de superfície podem influenciar a produção e a presença de outros componentes da superfície bacteriana, dificultando a identificação da molécula específica da superfície diretamente responsável pelas mudanças observadas.

## 6.8. MUTAÇÃO NO GENE *Hsero\_1294* ALTERA O PERFIL DE LPS DE *H. seropedicae*

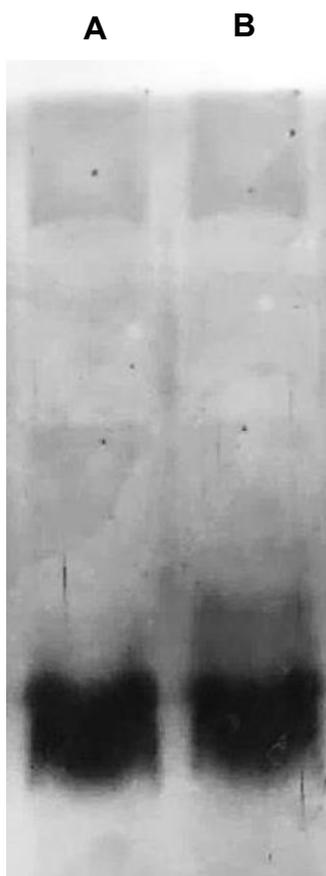
Os lipopolissacarídeos (LPS) são moléculas encontradas exclusivamente na membrana externa das bactérias gram-negativas. Normalmente, estas moléculas são formadas por três subestruturas principais distintas: o antígeno – O, a região central ou oligossacarídeo central e o lipídeo-A, porção responsável por ancorar toda a estrutura à membrana externa da bactéria (BRAUN *et al.*, 2005).

A importância dos LPS na comunicação celular planta-bactéria já foi demonstrada, mas o papel exato dessas moléculas no processo ainda não é conhecido. Alguns trabalhos sugerem que os LPS estão envolvidos no processo de adesão às células hospedeiras. Balsanelli e colaboradores (2010) propuseram que o LPS de *H. seropedicae* participa na adesão da bactéria ao ancorá-la em receptores vegetais por seus resíduos de N-acetil glucosamina. Alterações da estrutura de LPS reduz a capacidade da fixação bacteriana por cerca de 90% (BALSANELLI *et al.*, 2013).

No entanto, em um estudo com *Pseudomonas fluorescens*, a mutagênese de transposon foi utilizada para gerar mutantes com adesão alterada (WILLIAMS & FLETCHER, 1996). Suspensões dos mutantes foram passadas através de colunas de vidro contendo areia de sílica e demonstraram maior adesão e retenção nas colunas. A electroforese em gel de poliacrilamida das estirpes mutantes demonstrou que o antígeno-O no lipopolissacarídeo estava atenuado ou ausente. A falta deste polissacarídeo e a consequente exposição aumentada da fração lipídica do lipopolissacarídeo são provavelmente responsáveis pelo aumento da adesão ao substrato hidrofóbico e pela retenção na coluna de areia.

Dessa maneira, SDS-PAGE foi utilizado para determinar o padrão do LPS das estirpes de *H. seropedicae* (Figura 41) com a finalidade de encontrar alguma diferença que possa contribuir para o aumento da adesão. Comparações com perfis eletroforéticos de LPS conhecidos de outras bactérias sugerem que as bandas de baixa massa molecular correspondem ao lipídeo-A ligado ao oligossacarídeo central, e as bandas de alta massa molecular

correspondem às moléculas completas de LPS com diferentes números de unidades de antígeno-O (BRAUN *et al.* , 2005). O LPS da estirpe mutante aparentemente apresenta alterações na porção do lipídeo-A quando comparada ao da estirpe selvagem. O perfil da estirpe selvagem apresentou uma intensa banda de baixa massa molecular enquanto que o mutante apresenta duas migrações próximas correspondendo ao LPS de baixo peso molecular (provavelmente compreendendo o lipídeo-A).



**FIGURA 41 - Perfil eletroforético do LPS das estirpes de *H. seropedicae*.** SDS-PAGE foi realizado com o LPS total extraído da estirpe selvagem (A) e da estirpe mutante *Hsero\_1294* (B) pelo método de proteinase K / SDS. Amostras em triplicata.

Variações no lípido A consistem principalmente em diferentes composições de ácidos graxos (QURESHI *et al.*, 1985). O aumento de ácidos graxos na porção do lipídio-A causa um aumento na hidrofobicidade e este resultado reflete tanto num aumento na hidrofobicidade de toda a superfície

celular, quanto, possivelmente, em adesão aumentada (KANNENBERG & CALRSON, 2001).

Este resultado indica que a mutação no gene *Hsero\_1294* pode ter alterado a composição química do LPS de *H. seropedicae* e pode ter resultado em um aumento da hidrofobicidade da superfície celular e possivelmente adesão.

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, mostramos que uma mutação no gene *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* afetou a produção de biofilme. Surpreendentemente, a mutação aumentou a formação de biofilme da estirpe mutante comparada com a estirpe selvagem, sugerindo vias divergentes para a formação de biofilme em superfícies.

A mutação no gene *Hsero\_1294* também afetou a adesão da bactéria à superfície radicular. Apesar de a hemaglutinina parecer estar envolvida na interação planta-bactéria, a sua mutação provocou um aumento na adesão após 30 minutos de inoculação.

O mutante *Hsero\_1294* também pode ser mais eficiente na adesão quando co-inoculada com a estirpe selvagem SmR1.

Uma proteína UspA foi isolada da membrana externa do mutante *Hsero\_1294* de *H. seropedicae* e pode ter efeitos nas propriedades da superfície celular e aumentar a adesão.

O perfil de LPS da estirpe mutante parece apresentar alterações na porção de lipídeo-A quando comparada ao perfil de LPS da estirpe selvagem, sugerindo que a mutação no gene *Hsero\_1294* pode ter alterado a composição química do LPS de *H. seropedicae*.

Apesar de não ser possível atribuir funções específicas do gene *Hsero\_1294* durante a interação *H. seropedicae*-planta, nossos resultados permitirão o direcionamento de futuras pesquisas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, G. Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. **Microbiology**. v. 156, n. Pt 8, p. 2283-2293, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLEER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**. v. 32, n. 11, p. 1559–1570, 2010.

BACHHAWAT, A. K.; GHOSH, S. Iron transport in *Azospirillum brasilense* : role of the siderophore spirilobactin. **Journal of General Microbiology**. v. 133, p. 1759-1765, 1987.

BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae*, a root-associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* **Biology and Fertility of Soils**. v. 30, p. 485-491, 2000.

BALSANELLI, E.; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A. Exopolysaccharide Biosynthesis Enables Mature Biofilm Formation on Abiotic Surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. **PLoS ONE**. v.9, ed. 10, e110392, p. 1-10, 2014.

BALSANELLI, E. ; SERRATO, R. V. ; BAURA, V. A. ; SASSAKI, G. ; YATES, M. G. ; RIGO, L. U. ; PEDROSA, F. O. ; SOUZA, E. M. ; MONTEIRO, R. A. *Herbaspirillum seropedicae rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**. v. 12, n. 8, p. 2233–2244, 2010.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; PANKIEVICZ, V. C. S.; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343-2356, 2016

BALSANELLI, E.; TULESKI, T. R.; BAURA, V. A.; YATES, M. G.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A. Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. **PLoS One**, v. 8, n. 10, e77001, 2013.

BARANY, F. Two-codon insertion mutagenesis of plasmid genes by using single-stranded hexameric oligonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** . v. 82, n. 12, p. 4202-4206, 1985.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**. v. 27, p. 343-350, 2011.

BERG, H. C. Chemotaxis in bacteria. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**. v. 4, p. 119-136, 1975.

BERTONI, M.; KIEFER, F.; BIASINI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**. 7, 2017.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**. v. 42, p. W252-W258, 2014.

BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; DE BEER, T. A.; TAURIELLO, G.; STUDER, G.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository -

new features and functionality. **Nucleic Acids Research**. v. 45, p. D313-D319, 2017.

BOGINO, P.C.; OLIVA, M.M.; SORROCHE, F.G.; GIORDANO, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, n. 8, p. 15838–15859, 2013a.

BOGINO, P.; ABOD, A.; NIEVAS, F.; GIORDANO, W. Water-Limiting Conditions Alter the Structure and Biofilm-Forming Ability of Bacterial Multispecies Communities in the Alfalfa Rhizosphere. **PLoS ONE**. v. 8, n. 11, e79614, 2013b.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.

BRAUN, S. G.; MEYER, A.; HOLST, O.; PÜLER, A.; NIEHAUS, K. Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Lipopolysaccharide Substructures Essential for Elicitation of an Oxidative Burst in Tobacco Cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 18, n. 7, p. 674-681, 2005.

BRENCIC, A; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host- microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 69, p. 155-194, 2005.

BROUGHTON, W. J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUÉRÉ, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W. J. 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.

CASTIBLANCO, L.F.; SUNDIN, G.W. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria, J. Integr. **Plant Biology**. v. 58, p. 362–372, 2015.

CHANG, W.S.; VAN DE MORTEL, M.; NIELSEN, L. *et al.* Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. **Journal of Bacteriology**. v. 189, p. 8290–8299, 2007.

CHARBONNEAU, M.; MOUREZ, M. Functional Organization of the Autotransporter Adhesin Involved in Diffuse Adherence. **Journal of Bacteriology**. v. 189, n. 24, p. 9020-9029, 2007.

CHENG, H.-P.; WALKER, G.C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**. v. 180, p. 5183-5191, 1998.

CSERZO, M.; WALLIN, E.; SIMON, I.; VON HEIJNE, G.; ELOFSSON, A. Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. **Protein Engineering, Design and Selection**. v. 10, p. 673–676, 1997.

DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H. M.; KUIPER, I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G. V.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT, R.; LUGTENBERG, B. J. J. Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 15, n. 11, p. 1173-1180, 2002.

DOBBELAERE, S. *et al.* Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, n. 4, p. 284–297, 2002.

FRANCHE, C.; LINDSTROM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**. v. 321, p. 35-59, 2009.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. The Challenge of Food Security. **Science**, v. 327, n. February, p. 812, 2012.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B.S.; GAROFALO, C.G.; ORELLANO, E.G.; OTTADO, J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. **PLoS ONE**. v. 4, n. 2, e4358, 2009.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**. v. 30, p. S162-S173, 2009.

GUILHABERT, M.R.; KIRKPATRICK, B.C. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 18, n. 8, p. 856–868, 2005.

JAIN, V.; KUMAR, M.; CHATTERJI, D. ppGpp: stringent response and survival. **The Journal of Microbiology**. v.44, p. 1–10, 2006.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F. L.; LADHA, J. K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

KAJAVA, A.V.; CHENG, N.; CLEAVER, R.; KESSEL, M.; SIMON, M. N.; WILLERY, E.; JACOB-DUBUISSON, F.; LOCHT, C.; STEVEN, A. C. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. **Molecular Microbiology**. v. 42, p. 279–292, 2001

KANNENBERG, E. L.; CARLSON, R. W. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. **Molecular Microbiology**. v. 39, n. 2, p. 379-391, 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. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 887-891, 1997.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: PHYTO-BACTERIOLOGIE, S. D. P. V. E., **Proceedings of the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**. v. 2, p.879-882, 1978.

LIU, J.; ROST, B. Domains, motifs and clusters in the protein universe. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 7, p. 5-11, 2003

LOCHT, C.; BERTIN, P.; MENOZZI, F. D.; RENAULD, G. The filamentous hemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella spp.* **Molecular Microbiology**. v. 9, p. 653–660, 1993.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**. v. 45, D200-D203, 2017.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; TULESKI, T.; FAORO, H.; CRUZ, L. M.; WASSEM, R., et al. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 80, p. 441–451, 2012a.

MONTEIRO, R. A. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, p. 175–196, 2012b.

MONTEIRO, R.A., SCHMIDT, M.A., BAURA, V.A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., YATES, M.G., RANDI, M.A.F., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. *Poales*, *Poaceae*) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (*Burkholderiales*, *Oxalobacteraceae*). **Genetics and Molecular Biology**. v. 31, n. 4, p. 932- 937, 2008.

NACHIN, L., U. NANNMARK, AND T. NYSTRÖM. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. **Journal of Bacteriology**. v. 187, p. 6265–6272, 2005.

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

PANKIEVICZ, V.C.S et al. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Plant Molecular Biology**. v. 90, p. 589-603, 2016.

PARIZZI, S.Q.F.; DE ANDRADE, N.J.; SILVA, C.A.D.S.; SOARES, N.D.F.F.; DA SILVA, E.A.M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 47, n. 1, p. 77–83, 2004.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics** 7, 2011.

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

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R. A.; DEL CERRO, P.; ESPUNY, M. R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; OLLERO, F. J.; CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5-6, p. 325-36, May-Jun 2014.

PRATT, L.A.; R. KOLTER. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**. v. 30, p. 285–293, 1998.

PÜHLER, A.; ARLAT, M.; BECKER, A.; GÖTTFERT, M.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? **Current Opinion in Plant Biology**. v. 7, n. 2, p. 137-47, 2004.

O'TOOLE, G.A.; R. KOLTER. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**. v. 30, p. 295–304, 1998.

QURESHI, N.; MASCAGNI, P.; RIBI, E.; TAKAYAMA, K. Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of *Salmonella-Minnesota* R595—Purification of the dimethyl derivative by high-performance liquid-chromatography and complete structural determination. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 260, p. 5271-5278, 1985.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 4, n. 5, p. 559-66, 2000.

RELMAN, D. A.; DOMENIGHINI, M.; TUOMANEN, E.; RAPPUOLI, R. FALKOW, S. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: Nucleotide sequence and crucial role in adherence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 86, p. 2637-2641, 1989.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; DARDANELLI, M. S.; RUÍZ-SAÍNIZ, J. E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 272, n.2, p. 127-36, 2007.

ROJAS, C. M.; HAM, J. H.; DENG, W. L.; DOYLE, J. J. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, p. 13142–13147, 2002.

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 Microbiology Ecology**. v. 45, p. 39-47, 2003.

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

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**. v. 111, p. 743-67, 2013.

SCHWEDE T.; KOPP, J.; GUDEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**. v. 31, p. 3381–3385, 2003.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**. v. 68, p. 850-858, 1996.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**. v. 1, p. 784-791, 1983.

STOLTZFUS, J. R. et al. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, v. 194, p. 25–36, 1997.

TSAI, C.; FRISCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. v. 119, p. 115-119, 1982.

VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, M. B.; CAMARGO, L. E. A. et al. Comparative genomic analyses of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. v. 40, p. 169–189, 2002.

WALKER T. S.; BAIS, H. P.; DEZIEL, E.; SCHWEIZER, H. P.; RAHME, L. G.; *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. **Plant Physiology**; 134:320–31. 2004.

WALKER, V.; BERTRAND, C.; BELLVERT, F.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; BALLY, R.; COMTE, G. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**. v. 189, p. 494-50, 2011.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**. v. 10, p. 57– 63, 2009.

WATNICK, P.; KOLTER, R. MINIREVIEW - Biofilm, City of Microbes. **Journal of bacteriology**. v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WATNICK, P.I.; R. KOLTER. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm. **Molecular Microbiology**. v. 34, p. 586–595, 1999.

WESTBROOK, J.; FENG, Z.; CHEN, L.; YANG, H.; BERMAN, H. M. The protein data bank and structural genomics. **Nucleic Acids Research**. v. 33, p. 489-491, 2003.

WILLIAMS, V.; FLETCHER, M. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolyssaccharide composite. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p. 100-104, 1996.