

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GRACIELI FERRARI

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE PLANTAS  
E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO E FITOPATOGENICIDADE  
DE *Herbaspirillum* spp.

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GRACIELI FERRARI

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE PLANTAS  
E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO E FITOPATOGENICIDADE  
DE *Herbaspirillum* spp.

Monografia apresentada a Disciplina de Estágio  
Supervisionado em Biologia II como requisito  
parcial à conclusão do Curso de Bacharelado  
em Ciências Biológicas, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.  
Orientador: Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Leonardo Magalhães  
Cruz

CURITIBA

2016

Dedico este trabalho aos meus pais  
Gonçalo e Irene, ao meu esposo Emir e a minha filha Alicia.  
Por estarem sempre ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador Leonardo Magalhães Cruz, pela oportunidade de realizar este trabalho, por sempre incentivar e apoiar. Aos demais professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN) pelas discussões e sugestões.

Agradeço a Coordenação do Curso de Ciências Biológicas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço meus pais, Gonçalo e Irene pela dedicação, compreensão e permitirem que este sonho fosse realizado. Ao Emir por compartilhar cada momento de dificuldade e por estar do meu lado todos os dias, me dando a energia e por me proporcionando muitos momentos felizes.

Agradeço a minha filha Alicia pela paciência, pelo carinho e energia, me revitalizando a cada dia.

Agradeço a todos os amigos estudantes de biologia que passaram pelo meu caminho, alguns trilharam juntos, outros tomaram outros rumos, mas que de alguma forma me incentivaram e me apoiaram fazendo parte dessa caminhada.

Aos meus amigos de laboratório, Vanessa, Rafaela, Rocío, Leilane e Paloma sempre me ajudaram quando foi preciso, pela transmissão de conhecimento e pelo incentivo.

Agradeço também a todos os familiares e demais amigos.

## RESUMO

O gênero *Herbaspirillum* é principalmente conhecido por conter bactérias diazotróficas capazes de assimilar nitrogênio atmosférico através da Fixação Biológica de Nitrogênio e que pode se associar a diversos grupos de plantas, principalmente gramíneas, e promoverem seu crescimento. No entanto, o gênero inclui também bactérias que não fixam nitrogênio e que apresentam grande diversidade ecológica e fisiológica (ex., fixação de carbono, degradação de compostos fenólicos, produção de fitormônios, etc.). Atualmente o gênero *Herbaspirillum* possui 10 espécies descritas, isoladas de diferentes ambientes (endofítico, rizosfera, água e solo) e localizações geográficas (Brasil, Europa, Coreia, Japão e Ilhas Canárias). A espécie *H. rubrisubalbicans* é um conhecido fitopatógeno de algumas variedades de cana-de-açúcar, sorgo e feijão-de-corda. Para testar o potencial fitopatogênico e de colonização das demais espécies, foram realizados ensaios de inoculação na leguminosa no feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp) e em plantas de milho (*Zea mays* L.). Estirpes de *Herbaspirillum* spp. não foram capazes de produzir sintomas de doença semelhantes ao causado pela inoculação com *H. rubrisubalbicans* em *Vigna unguiculata*, apesar de apresentarem formação de áreas de necrose, clorose, enrugamento e deformação. Também foram analisadas o potencial de colonização endofítica de *Herbaspirillum* spp. em milho. A estirpe 266 de *H. huttiense* subsp. *huttiense*, uma bactéria isolada de água destilada, foi capaz de colonizar endofiticamente raízes de milho entre  $10^5$  a  $10^9$  células por raiz, em números semelhantes ao observado para a estirpe SmR1 de *H. seropedicae*, uma espécie conhecidamente capaz de colonizar endofiticamente raízes de milho.

## ABSTRACT

The *Herbaspirillum* genus and mainly known to contain bacteria diazotrophic able to assimilate atmospheric nitrogen through the Biological Nitrogen Fixation and join several groups of plants, especially grasses, and promote their growth. However, the genus includes bacteria that do not fix nitrogen and they have great ecological and physiological diversity (eg., Carbon sequestration, Phenolic compounds degradation, phytohormones production, etc.). Currently the genus *Herbaspirillum* has 10 species described, isolated from different environments (endophytic, rhizosphere, Soil and Water) and geographical locations (Brazil, Europe, Korea, Japan and the Canary Islands). *H. rubrisubalbicans* is a known pathogen of some varieties of sugarcane, sorghum and bean-to-string. To test the plant pathogenic and Colonization potential of other species, we did inoculation trials in legumes not bean-to-string (*Vigna unguiculata* L.) and in maize (*Zea mays* L.). Strains of *Herbaspirillum* spp. They were not able to produce disease symptoms similar to that caused by the inoculation with *H. rubrisubalbicans* in *Vigna unguiculata*, despite having formation areas of necrosis, chlorosis, deformation and wrinkling. We also analyzed the potential of endophytic colonization of *Herbaspirillum* spp. . The 266 strain of *H. huttiense* subsp. *huttiense*, an isolated bacterium of distilled water was able to colonize roots. Among endophytically corn root  $10^5$  to  $10^9$  of cells in numbers similar to that observed for one strain of *H. seropedicae* SMR1, a species known to be capable of colonizing endophytically corn roots.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	10
2.1 GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> .....	10
2.2 FITOPATOGENICIDADE DO GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> .....	14
2.3 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	16
3 OBJETIVO .....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1 ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO DE <i>Herbaspirillum</i> em <i>Vigna unguiculata</i> .....	19
4.1.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	19
4.1.2 INOCULAÇÃO COM <i>Herbaspirillum</i> spp. ....	19
4.1.3 REISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS INOCULADAS .....	20
4.2 IDENTIFICAÇÃO DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA NO MILHO.....	21
4.2.1 MEIO DE CULTURA EMPREGADO PARA O CRESCIMENTO DA PLANTA.....	21
4.2.2 DESINFECÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS SEMENTES DE MILHO .....	21
4.2.3 CULTIVO DE PLANTAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO E INOCULAÇÃO COM BACTÉRIA .....	21
4.2.4 ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO DAS RAÍZES DE MILHO .....	22
4.2.5 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA .....	22
4.2.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	22
4.2.5.2 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR.....	22
4.2.5.3 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO .....	23
4.2.5.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA.....	23
4.2.5.5 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS .....	24
4.2.6 ANÁLISE DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF.....	24

4.2.6.1 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	24
4.2.6.2 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE MASSA .....	24
4.2.6.3 ANÁLISE DOS DADOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	25
5 RESULTADOS .....	26
5.1 AVALIAÇÃO DA FITOPATOGENICIDADE EM <i>Vigna unguiculata</i> .....	26
5.2 COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DO MILHO .....	30
5.2.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	36
5.2.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA .....	41
6 DISCUSSÃO .....	43
7 CONCLUSÃO .....	45
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....	46

# 1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são historicamente conhecidas pela capacidade de colonização endofítica de raízes, caules e folhas de gramíneas e por fixarem nitrogênio. No entanto, ao longo dos anos de descobertas, verificou-se a descrição de espécies isoladas de amostras de água, de solos contaminados e até fluidos de hemodiálise e estirpes associadas com infecções humanas isoladas de amostras clínicas, a maioria delas sem a capacidade de fixar nitrogênio (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1992; BALDANI et al., 1996; KIRCHHOF et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006).

Apesar de algumas espécies serem reconhecidas como Bactérias promotoras do crescimento vegetal, a espécie *H. rubrisubalbicans*, em especial, pode causar sintomas de doenças em cultivares de sorgo e cana-de-açúcar, esta bactéria é capaz de causar a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar e a doença da estria vermelha em algumas variedades de sorgo (SCHIMIDT, 2009; BALDANI et al., 1996; OLIVARES et al, 1996). Enquanto *H. seropedicae* foi descrita como não patogênica (BALDANI et al., 1996; OLIVARES et al, 1996).

A análise das espécies de *Herbaspirillum* de referência por espectrometria de massa tem como objetivo de estabelecer os perfis de massa para estas espécies e permitir sua rápida identificação taxonômica para o controle de qualidade dos estoques mantidos e nos experimentos de inoculação em plantas e re-isolamento. Os perfis protéicos gerados por espectrometria de massa MALDI-TOF foram analisados a partir do agrupamento dos valores de  $m/z$  dos picos das estirpes referência para espécies do gênero *Herbaspirillum*. A técnica é sensível a variações no aparelho, meio de cultivo das bactérias, etc. Desta forma, a obtenção dos espectros foi feita utilizando replicatas técnicas e biológicas. A técnica tem potencial para discriminação tanto de espécies quanto de estirpes. Os espectros irão compor um banco de dados, além ser usado na identificação de novas bactérias isoladas ou na confirmação taxonômica de bactérias reisoladas de plantas inoculadas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das espécies do gênero *Herbaspirillum*, tanto referente a colonização quanto ao seu potencial de fitopatogenicidade, inoculando -as em gramíneas e leguminosa.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* pertence à Família Oxalobacteraceae dentro da classe das Betaproteobactérias do Filo Proteobacteria apresentando células com coloração gram-negativa, geralmente com formato vibrióide, mas dependendo das condições de crescimento podem ser espiraladas, com diâmetro de aproximadamente 0,6–0,7µm. O comprimento das células depende do meio de cultura e varia de 1,5–5µm. São móveis na presença de oxigênio, usando de um a três flagelos em um ou ambos os polos. A temperatura ótima de crescimento é 30–34°C e o pH ótimo de 5.3–8.0 (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1996; BALDANI et al., 2003).

O gênero foi primeiramente relatado por Baldani e colaboradores (1986), tendo como espécie tipo *Herbaspirillum seropedicae*, uma bactéria fixadora de nitrogênio endofítica, inicialmente isolada de amostras de raiz e rizosfera de milho, sorgo e arroz, e mais tarde de cana-de-açúcar e trigo (KENNEDY et al., 2004). Também foi verificada por Cruz e colaboradores (2001), a presença de *Herbaspirillum seropedicae* em plantas não gramíneas, como abacaxizeiro e bananeira.

As bactérias do gênero são historicamente conhecidas pela capacidade de colonização endofítica de raízes, caules e folhas de gramíneas e por fixarem nitrogênio. No entanto, ao longo dos anos de descobertas, verificou-se a descrição de espécies isoladas de amostras de água, de solos contaminados e até fluidos de hemodiálise e estirpes associadas com infecções humanas isoladas de amostras clínicas, a maioria delas sem a capacidade de fixar nitrogênio (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1992; BALDANI et al., 1996; KIRCHHOF et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006).

A partir dos anos 90, novas espécies foram acrescentadas ao gênero *Herbaspirillum* e atualmente ele é composto de onze espécies (Tabela 1) (incluindo o

*H. seropedicae*). A bactéria *Pseudomonas rubrisubalbicans* foi reclassificada como uma nova espécie do gênero *Herbaspirillum* passando a ser chamada de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A espécie coloniza as raízes, caules, e principalmente folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e é capaz de fixar N<sub>2</sub>. Em algumas variedades de sorgo e cana-de-açúcar pode atuar como fitopatógeno (BALDANI et al., 1996; JAMES et al., 1998; OLIVARES, et al., 1997). A reclassificação baseou-se em dados de hibridização DNA:rRNA (BALDANI et al., 1996).

*Herbaspirillum frisingense* foi adicionado ao gênero fundamentado em propriedades fisiológicas, análise filogenética do gene 16S rDNA e hibridização DNA:DNA. Associa-se a folhas, raízes e hastes de plantas forrageiras (gramíneas) como *Spartina pectinata* (Alemanha), *Miscanthus sinensis* (Alemanha), *Miscanthus sacchariflorus* (Alemanha) e *Pennisetum purpureum* (Brasil) (KIRCHHOF *et al.*, 2001). A espécie possui os genes *nif*, e em microaerofilia, fixa nitrogênio. Straub e colaboradores (2013a) sugeriram que o *H. frisingense* melhora o crescimento da

Tabela 1. ESPÉCIES ATUAIS DO GÊNERO *Herbaspirillum* E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.

ESPÉCIE	ESTIRPE	LOCALIZAÇÃO	FONTE	CARACTERÍSTICA	REFERÊNCIA
<i>H. aquaticum</i>	IEH 4439 <sup>T</sup>	EUA	Água deionizada		DOBRISTA <i>et al.</i> , 2010
<i>H. autotrophicum</i>	SA 32 <sup>T</sup>	Suíça	Água de lago	Autotrófico facultativo, oxidação de hidrogênio	ARGNO & SCHELEGEL, 1978; DING & YOKOTA, 2004
<i>H. chlorophenolicum</i>	CPW301 <sup>T</sup>	Coréia	Solo	Cresce em fenol e 4-chlorofenol	BAE <i>et al.</i> , 1996; IM <i>et al.</i> , 2004
<i>H. huttiense</i> subsp. <i>huttiense</i>	266 <sup>T</sup>	Nova Zelândia	Água destilada		LEIFSON, 1962; DING & YOKOTA, 2004
<i>H. huttiense</i> subsp. <i>putei</i>	7-2 <sup>T</sup>	Japão	Água de poço		DING & YOKOTA, 2004; DOBRITSA <i>et al.</i> , 2010
<i>H. massiliense</i>	JC206 <sup>T</sup>	França	Fezes humanas		LAGIER <i>et al.</i> , 2012
<i>H. frisingense</i>	GSF30 <sup>T</sup>	Alemanha/Brasil	Folha, haste e raiz de gramíneas forrageiras	Fixador de N <sub>2</sub>	KIRCHHOF <i>et al.</i> , 2001
<i>H. hiltneri</i>	N3 <sup>T</sup>	Alemanha	Raiz de trigo	L-fenilalanina como fonte de carbono	ROTHBALLER <i>et al.</i> , 2006
<i>H. lusitanum</i>	P6-12 <sup>T</sup>	Portugal	Nódulos de feijão		VALVERDE <i>et al.</i> , 2003
<i>H. rhizosphaerae</i>	UMS 37 <sup>T</sup>	Coréia	Rizosfera do solo de alho		JUNG <i>et al.</i> , 2007
<i>H. rubrisubalbicans</i>	M4 <sup>T</sup>	Brasil	Endofítica	Fixador de N <sub>2</sub> fitopatogênico	PIMENTEL <i>et al.</i> , 1991; BALDANI <i>et al.</i> , 1996
<i>H. seropedicae</i>	Z67 <sup>T</sup>	Brasil	Endofítica	Fixador de N <sub>2</sub>	BALDANI <i>et al.</i> , 1986

planta modulando as vias de sinalização de fitohormônios, e a estirpe GSF30 dessa bactéria teve seu genoma sequenciado (STRAUB *et al.*, 2013b).

*Herbaspirillum lusitanum* foi classificado por Valverde e colaboradores (2003) em Portugal com base na alta similaridade da sequência do gene 16S rDNA de isolados de nódulos das raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) com outros membros do gênero *Herbaspirillum*. Inicialmente, foram vistas como bactérias fixadoras de nitrogênio pela amplificação do gene *nifD* e também pela formação de película em meio sem nitrogênio, mas, posteriormente, num estudo realizado por Weiss e colaboradores (2012) do genoma de *Herbaspirillum lusitanum*, constatou-se a ausência de genes *nif* responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio e também de genes que permitem a nodulação (*nod*). Ainda foi notada a incapacidade da bactéria de reduzir acetileno em meio semi-sólido. A ausência desses genes sugere que *Herbaspirillum lusitanum* seja uma bactéria oportunista capaz de colonizar nódulos de raiz e também outros tecidos vegetais.

*Herbaspirillum huttiense*, foi inicialmente classificada como *Pseudomonas huttiense* por Leifson (1962) isolada de amostras de água destilada originadas de Lower Hutt, na Nova Zelândia. Foi reclassificada por Ding & Yokota (2004) como o *Herbaspirillum huttiense*. No mesmo estudo, os autores também reclassificaram o *Aquaspirillum autotrophicum* (ARAGNO & SCHELEGEL, 1978) em *Herbaspirillum autotrophicum* que foi isolado da água de lago na Suíça e possui uma propriedade marcante que é a capacidade de utilizar hidrogênio como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte de carbono. Ainda, Ding & Yokota (2004), classificaram o *Herbaspirillum putei*, uma bactéria espiralada, isolada da água de poço em Okasaka, Japão. Inicialmente, *Herbaspirillum putei* teve a presença do gene *nifH* verificada através de amplificação do gene (DING & YOKOTA, 2004), no entanto, recentemente, num estudo realizado por Dobritsa e colaboradores (2010), a presença do gene não foi constatada e o organismo foi reclassificado como *Herbaspirillum huttiense* subsp. *putei* e, o *Herbaspirillum huttiense* passou a ser denominado *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense*.

Baseado em características fenotípicas, quimiotaxonômicas e na análise da sequência do gene 16S rDNA, a bactéria capaz de degradar 4-clorofenol, anteriormente designada como *Comamonas testosteroni* (BAE *et al.*, 1996), foi reclassificada como *Herbaspirillum chlorophenicum*. Foi isolada de sedimentos do

solo coletados de um córrego próximo a uma região industrial na Coreia (IM *et al.*, 2004). Outro membro do gênero trata-se de *Herbaspirillum hiltneri*, um isolado da superfície esterilizada de raízes de trigo (*Triticum aestivum*), que foi submetido à análise da sequência dos genes 16S rDNA e 23S rDNA, bem como a hibridizações DNA-DNA (ROTHBALLER *et al.*, 2006). Os membros mais recentes do grupo tratam-se de: *Herbaspirillum rhizosphaerae*, isolado do solo da rizosfera de *Allium victorialis* var. *platyphyllum* na Coreia (JUNG *et al.*, 2007); *Herbaspirillum aquaticum*, isolado de água deionizada (DOBRITSA *et al.*, 2010). *Herbaspirillum canariense*, *Herbaspirillum aurantiacum* e *Herbaspirillum soli*, três novas espécies isoladas de solo vulcânico no Tenerife, Ilhas Canárias (CARRO *et al.*, 2011). Ainda recentemente foram descritas as espécies *Herbaspirillum massiliense* (LAGIER *et al.*, 2012) e *Herbaspirillum psychrotolerans* (BAJERSKI *et al.*, 2013), a primeira isolada das fezes de um paciente senegalês saudável e a segunda isolada da superfície de solo de uma geleira em Larsemann Hills, Antártida Oriental. No entanto, recentemente em um estudo realizado por Lin e colaboradores (2013), *Herbaspirillum canariense*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum soli* e *Herbaspirillum psychrotolerans* foram reclassificadas como pertencentes a um novo gênero denominado pelos mesmos autores como *Noviherbaspirillum*. Outro novo gênero muito próximo ao *Herbaspirillum* foi descrito por Anandham e colaboradores (2013) e denominado gênero *Paraherbaspirillum* com a espécie *Paraherbaspirillum soli*, isolada de amostras de solo da Ilha Jeju, República da Coreia. A espécie apresentou grande similaridade com *Herbaspirillum autotrophicum* e *Herbaspirillum frisingense*.

## 2.2 FITOPATOGENICIDADE DO GÊNERO *Herbaspirillum*

Apesar de algumas espécies serem reconhecidas como Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (PGPB, do inglês, *Plant-Growth Promoting Bacteria*), a espécie *H. rubrisubalbicans*, em especial, pode causar sintomas de doenças em cultivares de sorgo e cana-de-açúcar, enquanto *H. seropedicae* foi descrita como não patogênica (BALDANI et al., 1996; OLIVARES et al, 1996). Sintomas de doença foram também observados na leguminosa *Vigna unguiculata* inoculada com *H. rubrisubalbicans* (SCHIMIDT, 2009). Esta bactéria é capaz de causar a doença da estria mosqueada na variedade B-4362 de cana-de-açúcar e a doença da estria vermelha em algumas variedades de sorgo (SCHIMIDT, 2009; BALDANI et al., 1996; OLIVARES et al, 1996).

A infecção de uma planta por um fitopatógeno pode desencadear uma reação de hipersensibilidade(HR), que nada mais é que a morte celular programada que limita o ataque dos patógenos, ou ainda pode levar ao desenvolvimento da doença(GOODMAN& NOVACKY,1994). A compatibilidade e incompatibilidade entre a bactéria e a planta são controladas por um conjunto de genes bacterianos que codificam para proteínas efetoras secretadas pelo Sistema de Secreção Tipo III(SST3)(GOODMAN & NOVACKY,1994), e seus respectivos receptores vegetais (MUDGETT&STASKAWICZ,1998;HUECK,1998;GOODMAN&NOVACKY,1994).

Com isso, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* tornaram-se modelos de estudo na interação planta-bactéria, para estudos dos mecanismos moleculares envolvidos na interação benéfica e fitopatogênica respectivamente. O modelo de colonização de *H. rubrisubalbicans*, seguido ou não de aparecimento de sintomas de doença é uma forma viável de visualizar a capacidade de colonização e de causar doenças em plantas. Avanços nesta área foram obtidos a partir do sequenciamento completo do genoma destas duas espécies pelo Programa GENOPAR ([www.genopar.org](http://www.genopar.org)), e agora os genes envolvidos nos processos de patogenicidade e de colonização estão sendo estudados a fim de se desvendar como se dá o processo de interação planta bactéria. Por outro lado, o conhecimento sobre a capacidade associativa e/ou patogênica das demais espécies do gênero pode

fornecer mais conhecimento sobre este processo e sobre a possível utilização destas bactérias na agricultura, bem como os riscos para a saúde humana.

### **2.3 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**

A espectrometria de massas(EM)pode ser compreendida como uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto ou de diferentes compostos em uma mistura complexa, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, ou seja, com carga elétrica líquida positiva ou negativa, baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por  $m/z$ . Assim, conhecendo o valor de  $m/z$  de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura (Van BRAMER, 1998). A espectrometria de massas pode ser utilizada em análises quantitativas, mas é em análises qualitativas que ela tem se destacado, como na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, que pode ser alcançado através da formação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmentos.

Em 1996, Holland e colaboradores descreveram pela primeira vez o uso de MALDI para análise de células microbianas intactas (HOLLAND et al., 1996), com Claydon e colaboradores concorrentemente informando que os espectros resultantes eram convenientes para o uso com objetivos de identificação de microrganismos (CLAYDON et al., 1996). A capacidade da espectrometria de massas (EM) em identificar organismos é vantajosa em vários aspectos: não é restrita a marcadores pré-estabelecidos; é rápida, sendo um experimento típico concluído em alguns minutos; é sensível, podendo um sinal ser detectado a partir de uma amostra que contenha menos de  $10^4$  células (DEMIREV and FENSELAU, 2008; RAJAKARUNA et al.,2009); uma variedade de módulos de coleção e processamento de amostras para coleta de microrganismos e os seus constituintes de ambientes diferentes (de aerossóis a biofluidos) podem ser inter-relacionados a instrumentos de EM; os instrumentos de proteômica, desenvolvidos inicialmente para a caracterização de proteínas, podem ser com sucesso adaptados a caracterização rápida de microrganismos (DEMIREV and FENSELAU,2008).

Três ferramentas gerais envolvendo espectrometria de massa MALDI-TOF e caracterização bacteriana tem sido desenvolvidas: i) detecção de proteínas biomarcadoras específicas indicativas de genótipo específico ou propriedades fenotípicas; ii) pesquisas em banco de dados de proteína para agrupar ou identificar microorganismos; iii) comparações espectrais projetadas para identificar ou excluir espécies específicas ou estirpes. Enquanto todas estas ferramentas necessitam certo nível de reprodutibilidade, a comparação de espectros de referência e desconhecidos para identificação bacteriana (ou diferenciação) necessitam de um nível mais alto de reprodutibilidade entre espectros (WILLIAMS et al., 2003).

A capacidade da EM de caracterizar rapidamente microrganismos tem aplicações potenciais em um grande número de áreas junto á diagnóstica médica, biossegurança, monitoramento ambiental, agricultura, controle de qualidade de alimentos, segurança ocupacional, e caracterização de cultura (DEMIREV and FENSELAU, 2008). Contudo, esta técnica ainda possui algumas limitações tais como: pouca cobertura de bancos de dados, variações entre instrumentos, dependência de protocolo e não diferenciação entre estirpes. Porém, com o desenvolvimento de pesquisas nesta área, será possível analisar e comparar dados obtidos em condições diferentes (WUNSCHERL et al., 2005).

A espectrometria de massa vem sendo cada vez mais empregada na identificação de bactérias em nível de gênero, espécie e estirpe (MURRAY, 2010). De acordo com os resultados dos espectros obtidos, sugere-se que a espectrometria de massa por MALDI-TOF seja uma ferramenta útil para identificação e diferenciação de espécies dentro do gênero *Herbaspirillum*.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolamento e caracterização de bactérias associativas e avaliação da capacidade de colonização e fitopatogênica do gênero *Herbaspirillum* em gramíneas e leguminosas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliação da fitopatogenicidade de *Herbaspirillum* spp. em *Vigna*
2. Avaliação do potencial de colonização de *Herbaspirillum* spp. em milho e identificação dos re-isolados por MALDI-TOF e sequenciamento do gene 16S rRNA

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO DE *Herbaspirillum* em *Vigna unguiculata*

##### 4.1.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas estirpes de 9 espécies diferentes: *Herbaspirillum frirsigense* GSF30<sup>T</sup> (=CCUG 47444<sup>T</sup> =DSM 13128<sup>T</sup> = JCM 21445<sup>T</sup> = NBRC 102522<sup>T</sup>); *H. rubrisulbalbicans* M1(=ATCC 19308= CCUG 17392 = CCUG 17679 = CFBP 1202 = CIP 105019 =DSM 11543=DSM 9440= ICMP 5777 = JCM 21447 = LMG 2286 = NBRC 102523 = NCPPB 1027) , *H. hiltineri* N3<sup>T</sup>(=DSM 17495<sup>T</sup> = LMG 23131<sup>T</sup>); *H. rhizosphaerae* UMS37<sup>T</sup> (= CIP 108917<sup>T</sup> = KCTC 12558<sup>T</sup>) ;*H. huttiense* subsp. *huttiense* 266<sup>T</sup> (=ATCC 14670<sup>T</sup> =DSM 10281<sup>T</sup> =IAM 14941<sup>T</sup> =LMG 2199<sup>T</sup>), *H. huttiense* subsp. *putei* 7-2<sup>T</sup>(=ATCC BAA-806<sup>T</sup>= CCUG 49453<sup>T</sup> = IAM 15032<sup>T</sup> = JCM 21495<sup>T</sup> = NBRC 102406<sup>T</sup>);*H. chlorophinolicum* CPW 301<sup>T</sup> (IAM 15024<sup>T</sup> = JCM 21487<sup>T</sup> = KCTC 12096<sup>T</sup> = NBRC 102525<sup>T</sup>) *H. autotrophicum* SA32<sup>T</sup> (ATCC 29984<sup>T</sup>= CCUG 12808<sup>T</sup> =DSM 732<sup>T</sup>= IAM 14942<sup>T</sup> = JCM 21424<sup>T</sup> = NBRC 15327<sup>T</sup> = LMG 4326<sup>T</sup> = VKM B-1394<sup>T</sup>) ;*H. seropediceae* SmR1(ATCC 35892= CCUG 24564 =DSM 6445= JCM 21448 = LMG 6513 = NBRC 102524) , *H. lusitanum* P6-12<sup>T</sup> (CCUG 48869<sup>T</sup> = CECT 5661<sup>T</sup> = LMG 21710<sup>T</sup>).

As estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram estocadas em meio NFbHPN, contendo malato como fonte de carbono e solução de fostatos (KLASSEN et al., 1997), semi-sólido e sólido, a temperatura ambiente. Para o meio NFbHPN sólido foi adicionado 15 g/L de ágar e para o meio semi-sólido 1,75 g/L. Após o preparo dos meios de cultura, todos foram autoclavados a 120 °C, 1,2 atm, durante 20 minutos.

#### **4.1.2 INOCULAÇÃO COM *Herbaspirillum* spp.**

Sementes da leguminosa *Vigna unguiculata* cultivar Red Caloona, foram esterilizadas ao serem imersas em ácido sulfúrico 97% durante 10 minutos. Em seguida, o ácido foi retirado cuidadosamente e neutralizado, e as sementes foram lavadas quatro vezes com água ultrapura estéril, rapidamente para impedir o aquecimento da água. As sementes foram então plantadas em placas de petri contendo ágar-água 0,7% para germinação, incubadas a 30 °C durante dois dias. Passado este tempo, as plântulas foram transferidas para vasos contendo vermiculita, esferas de polipropileno na superfície e solução nutritiva BD (Broughton et al., 1971). Esse sistema de vaso passou pelo processo de autoclavação para esterilização. Após aproximadamente 3 semanas de desenvolvimento no vaso a 30 °C, com um período de luz de 16 horas, as plantas estavam prontas para a inoculação.

Para inoculação das plantas, estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram cultivadas em meio NFbHPN líquido utilizando malato como fonte de carbono (KLASSEN et al., 1997) (Tabela 3) e com adição de 50 mmol/L de solução de fosfatos (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,8 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 159,5 g/L) e 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl, previamente autoclavados a uma temperatura de 30 °C, a 120 rpm de agitação, durante aproximadamente 16 horas.

O procedimento de inoculação foi realizado a partir de 1 mL da cultura de cada bactéria com D.O. 600nm igual a 1,0, que foi centrifugado a 13.400 rpm, por 1 minuto e ressuspenso em 1 mL de solução de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 10 mmol/L. Esse volume de suspensão foi inoculado na face dorsal (abaxial) da folha com o auxílio de uma seringa sem agulha por infiltração. Uma pressão leve foi aplicada para que a cultura líquida fosse capaz de preencher os vasos da folha através de seus poros até onde fosse possível, próximo sempre do seu vaso principal e central. Usou-se como controle as plantas infiltradas somente com a solução de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 10 mmol/L, e, para cada um dos 11 tratamentos (9 espécies de *Herbaspirillum* e controle) foram

despendidas 3 plantas. Por um período de 10 dias, as plantas permaneceram incubadas novamente a 30 °C, com um fotoperíodo de 16 horas.

#### **4.1.3 REISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS INOCULADAS**

Após 10 dias da infiltração, as folhas inoculadas foram coletadas, tiveram as duas faces imersas em etanol 70% e em seguida em água ultrapura autoclavada. Uma área foliar circular de 1 centímetro de diâmetro foi cortada e macerada em 1 mL de salina 0,9%, em seguida foi feita a diluição seriada do triturado, em que 100 µL do mesmo foi diluído em 900 µL de salina 0,9%. Este procedimento foi equivalente a diluição  $10^{-1}$ ; em seguida 100 µL desta diluição foram diluídos em mais 900 µL de salina 0,9%, sendo equivalente a diluição  $10^{-2}$ , e assim diluiu-se o restante sucessivamente até a diluição  $10^{-5}$ . Ao final, cada diluição foi plaqueada em meio NFbHPN sólido com malato como fonte de carbono e solução de fosfatos, na forma de microgota com volume de 10 µL, em triplicata.

### **4.2 IDENTIFICAÇÃO DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA NO MILHO**

#### **4.2.1 MEIO DE CULTURA EMPREGADO PARA O CRESCIMENTO DA PLANTA**

Para o cultivo de milho foi utilizado o meio Plant Medium que possui a seguinte composição por litro: 0,2 g de  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g de NaCl; 0,026 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 13 mg de Fe-citrate; 5 mg de Malato; 1,5 g de  $K_2HPO_4$ ; e 1,5 g de  $KH_2PO_4$ . O pH foi ajustado para 6,8 usando NaOH 0,1 M.

#### **4.2.2 DESINFECÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS SEMENTES DE MILHO**

As sementes de milho (*Zea mays*) cultivar SHS-3031 passaram inicialmente por um processo de esterilização onde permaneceram durante 20 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio 6% (v/v) e Tween 20 0,1% (v/v), em seguida, em etanol 70% por 5 minutos. As sementes foram então lavadas 4 vezes com água destilada estéril e tratadas com fungicida Vitavax-Thiram (0,005% m/v), deixado em repouso por 2 horas. A quantidade das soluções seguiu sempre a proporção de um mililitro para cada semente.

#### **4.2.3 CULTIVO DE PLANTAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO E INOCULAÇÃO COM BACTÉRIA**

Após esterilização, as sementes foram transferidas para placas contendo ágar – água (0,7%). As placas foram enroladas em papel-alumínio e mantidas a 30 °C por

três dias para germinação. As plântulas foram inoculadas com  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC) de *Herbaspirillum huttiense* por 15 minutos e então transferidas para tubos de ensaio (30 cm) contendo 30 mL de meio Plant Medium e 10 g de esferas de polipropileno, e crescidas a 25°C. . Foram utilizadas 3 repetições para cada bactéria, em dois experimentos independentes onde foram analisados *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (controle positivo), *Herbaspirillum huttiense* IAM14941, controle negativo interno (sem inóculo). E *Escherichia coli* (TOP10 e DH10B) como controle negativo.

#### **4.2.4 ENSAIOS DE COLONIZAÇÃO DAS RAÍZES DE MILHO**

A quantificação do número de bactérias endofíticas foi realizada no 3º e 7º dias após a inoculação. As raízes tiveram sua superfície desinfetada por uma lavagem de 1 minuto em hipoclorito 1%, em seguida 2 minutos em etanol 70% (v/v), e então lavadas duas vezes com água destilada estéril. As raízes foram cortadas e maceradas em grau estéril em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%). A partir dos extratos realizou-se diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ), 100µL do triturado foi diluído 10 vezes, constituindo a diluição  $10^{-1}$  e, em seguida, diluído serialmente até a diluição  $10^{-7}$ , em solução salina. Finalmente, 10µL da diluição foram plaqueados em meio de cultivo em triplicada e as UFC contadas após 24h de incubação a 30°C. Para os cálculos de número de células por raiz, o inverso de cada diluição foi multiplicada por  $10^2$  para converter o número de UFC observadas para o número total de células em 1.000µL do triturado.

#### **4.2.5 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA**

##### **4.2.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA**

Uma alçada de colônia re-isolada do milho foi colocada em tubo plástico de 1,5 mL para ser, lavado com 1mL de água ultrapura duas vezes, fundido a 65 °C durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 volume de solução contendo 250,0 mmol/L de NaCl, 100,0 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 1,0 mmol/L de EDTA (concentrações finais). Na sequência, foi adicionado 1 volume de fenol equilibrado (pH 8,0) e a mistura homogeneizada cuidadosamente por inversão. O material foi centrifugado a 12.100 g por 15 minutos, o sobrenadante (fase aquosa) transferido para um novo tubo e precipitado com 1 volume de isopropanol, sendo centrifugado

por 10 minutos a 12.100 g. Após a precipitação, lavou-se o DNA com etanol 70%, seguido de centrifugação com retirada do sobrenadante e o precipitado foi seco e dissolvido em 10,0 µL de água ultrapura.

#### **4.2.5.2 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR**

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* e do gênero *Escherichia* foram crescidas em 5 mL de meio NfbHP com malato líquido, durante 24 horas, a 30 °C e a 120 rpm; e 5mL de meio L.B durante 16 horas, a 37 °C respectivamente. Uma alíquota de 5 µL da cultura foi diluída em 45 µL de água ultrapura para um volume final de 50 µL. Em seguida a mistura foi fervida durante 10 minutos. Foi utilizado 1 µL de cultura fervida para o sistema de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER & WILSON, 1991). O aparelho utilizado nas amplificações foi o termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Foram realizadas amplificações parciais dos genes 16S rRNA. O sistema de reação com volume final de 25 µL continha 1 µL de cultura fervida, 17,75 µL de água ultrapura, 1 µL de oligonucleotídeos iniciadores 27F (5' – ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT – 3') e 1492R (5' – GGYTACCTTGTTACGACTT – 3') (10 pmol/µL), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 1 µL de dNTP (5 mmol/L), 2,5 µL de solução tampão (PCR buffer 10x, kit PCR Fermentas), 1 µL de Taq DNA polimerase (kit PCR Fermentas) (5U/µL). Os ciclos de temperatura da amplificação utilizados foram: 94 °C durante 2 minutos para a desnaturação inicial, 30 ciclos consecutivos a 94 °C por 45 segundos para desnaturação, anelamento a 55 °C durante 45 segundos e alongamento a 72 °C durante 1 minuto e 15 segundos e, por fim, um ciclo final de alongamento a 72 °C durante 10 minutos. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídeo e fotografadas sob luz ultra violeta (UV).

#### **4.2.5.3 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO**

O excesso de iniciadores e desoxinucleotídios das reações de PCR foram removidos por reação enzimática contendo 5,2 U de Exonuclease I (EXO I – Fermentas) e 0,77 U de Fosfatase Alcalina (AP – Fermentas), respectivamente, para um volume de 23 µL do produto de amplificação. A reação foi incubada durante 1 h e 30 min a 37 °C, seguido de inativação das enzimas a 80 °C por 30 minutos.

#### **4.2.5.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA**

O sequenciamento foi realizado a partir de 3 µL do produto da PCR tratado com as enzimas de restrição utilizando o oligonucleotídeo iniciador 27F (0,5 µL), 1 µL de BigDyeR, 3 µL de tampão Save Money e água MilliQ estéril para completar um volume final de 10 µL de reação. Ao término da reação de sequenciamento, os produtos foram precipitados pela adição de 2,5 µL de acetato de amônio (7,5 mol.L<sup>-1</sup>), 60 µL de etanol absoluto, 10 µL de água MilliQ estéril e centrifugados por 45 min a 13.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 150 µL de etanol 70% e centrifugado novamente por 45 min a 13.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 37 °C.

#### **4.2.5.5 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS**

As sequências parciais do gene 16S rRNA obtidas para os isolados foram utilizadas para busca de similaridade contra o banco de dados “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)” do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa BLASTn (JOHNSON et al., 2008). O resultado da busca foi usado na identificação e confirmação taxonômica dos isolados.

#### **4.2.6 ANÁLISE DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF**

##### **4.2.6.1 PREPARO DAS AMOSTRAS**

Para a lise dos isolados foi inicialmente utilizado o método convencional, onde as amostras foram lavadas duas vezes em água ultra pura, lisadas com 20µL de acetonitrila e ácido fórmico 70% e analisadas em espectrômetro de massa.

##### **4.2.6.2 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE MASSA**

As amostras foram processadas em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF (Autoflex; Bruker Daltonics) equipado com um laser de nitrogênio, utilizando o software Flex Control v. 3.0 (Bruker Daltonics). Os íons positivos foram extraídos usando uma voltagem de aceleração de 20kV no modo linear. Cada espectro resultou da soma dos íons obtidos de 1.000 pulsos do laser com etapas de 100 pulsos em pontos da amostra. A aquisição dos espectros foi realizada de forma manual e automática com espectros de 600 a 1.200. A calibração externa foi realizada utilizando como calibrante a mistura de insulina B (3.496,89m/z), insulina

(5.734,51m/z), Apronitina (5.601m/z) e citocromo C (12.360,97m/z). Os espectros obtidos foram processados pelo software Flex Analysis v. 3.0 (Bruker Daltonics) utilizando o modo centroide, altura de 80%, picos com 0,1 de relação m/z, linha de base subtraída e *smoothing*.

#### **4.2.6.3 ANÁLISE DOS DADOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA**

A presença ou ausência de picos foi considerada como um *fingerprint* de um isolado particular. Os perfis foram agrupados e analisados utilizando o programa MS-Analyser (Santos,R.S.MS-Analyser.,2013) que implementa o algoritmo do programa Speclust (Alm et al., 2006). O programa permite a manipulação e comparação de espectros da massa MALDI-TOF para agrupamento e identificação de microrganismos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA FITOPATOGENICIDADE EM *Vigna unguiculata*

As estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram inoculadas em folhas de *Vigna unguiculata* para verificar a capacidade das estirpes em induzir o aparecimento de lesões nas folhas inoculadas. Nos ensaios de inoculação, para cada estirpe de bactéria, três folhas foram inoculadas em três diferentes plantas em três experimentos independentes.

Um ensaio inicial foi realizado para verificar se diferentes espécies do gênero *Herbaspirillum* inoculadas em folhas da leguminosa *Vigna unguiculata* seriam capazes de: i) colonizar endofiticamente a planta; ii) induzir uma resposta da planta, semelhante a observada para *H. rubrisubalbicans* M1 (fitopatogênica) ou; iii) não induzir resposta pela planta, como ocorre na colonização por *H. seropedicae* SmR1 (não fitopatogênica). Um total de 10 estirpes, de 9 espécies diferentes de *Herbaspirillum* foram testadas e avaliadas para capacidade de colonização e resposta da planta, na forma de necrose das folhas.

Como mostrado na Illustration 2, foi utilizado um controle interno, inoculado somente com água ultrapura, um controle negativo inoculado com *H. seropedicae* SmR1 (não fitopatogênico) e um controle positivo, inoculado com *H. rubrisubalbicans* M1 (fitopatogênico). Nas folhas inoculadas não foram observados os mesmos sintomas que o controle positivo, inoculado com *H. rubrisubalbicans* M1. Entretanto, foram observados sintomas diferenciados em relação ao controle negativo, inoculado com *H. seropedicae* SmR1. *Herbaspirillum hiltineri* N3 apresentou maior grau de dano seguida de *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* 266. Em nenhum caso foi observada a formação de áreas de necrose, características para a inoculação com *H. rubrisubalbicans* M1, mas as folhas mostraram pontos de clorose, enrugamento e deformação. Essas mudanças podem ter sido causados por algum fator ainda desconhecido. Não houve correlação entre os sintomas observados e a contagem de bactérias por unidades formadoras de colônias (UFC), o *H. hiltineri* N3 apresentou maior grau de dano nas folhas e baixa contagem de UFC; e o *H. huttiense* subsp. *huttiense* 266 apresentando um grau de dano menor nas folhas e

alta contagem de UFC. A contagem de *H. rubrisubalbicans* M1 ficou em valor intermediário, mas superior ao observado para *H. seropedicae* SmR1. (Illustration 3). É importante notar ainda que, apesar dos valores de contagem de UFC variarem, os resultados indicam que todas as espécies testadas são capazes de colonizar endofiticamente a planta, com a maioria delas atingindo  $10^4$  UFC/folha, semelhante a *H. rubrisubalbicans* M1 e *H. seropedicae* SmR1 (Illustration 3).

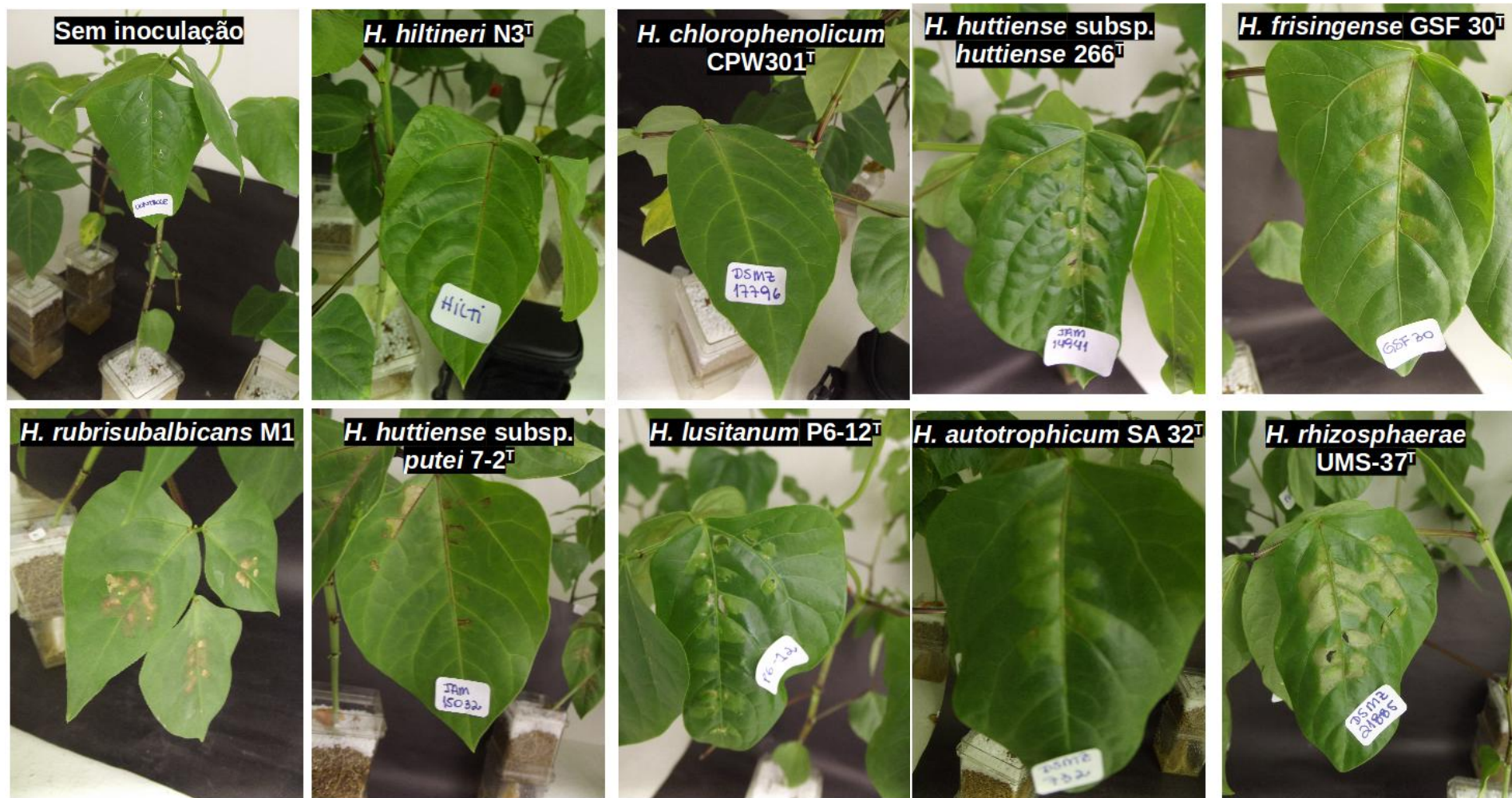
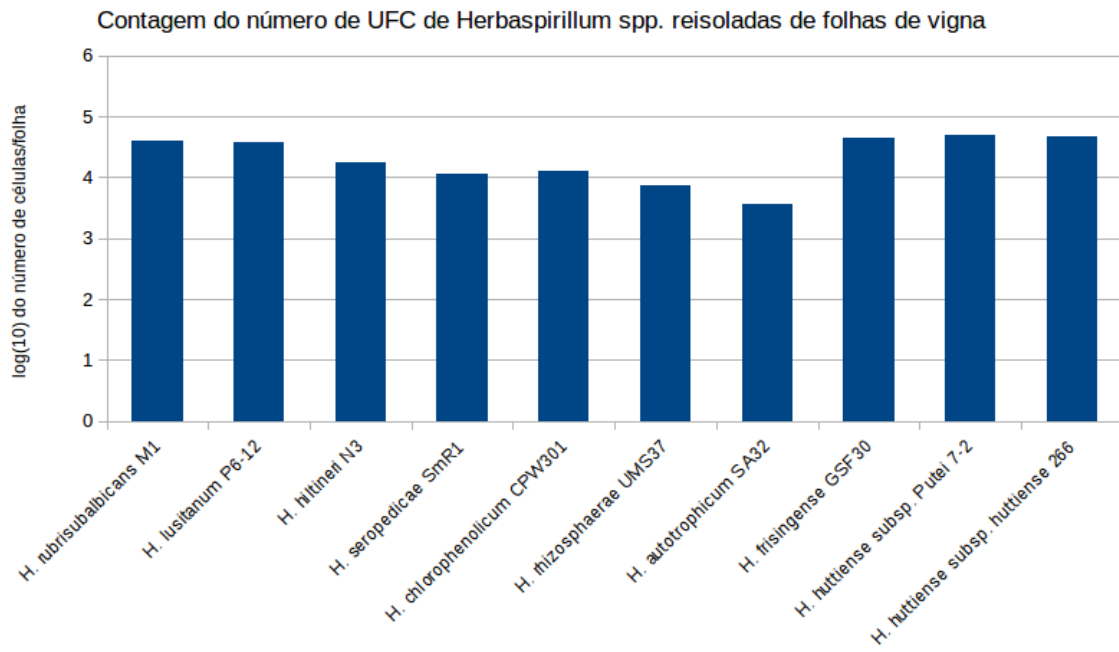


Illustration 2. Inoculação de folhas de *Vigna unguiculata* com *Herbaspirillum* spp.



*Illustration 3. Contagem de UFC de Herbaspirillum spp. Reisoladas de folhas de Vigna unguiculata inoculadas.*

## 5.2 COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DO MILHO

Plantas de milho foram inoculadas com bactérias e cultivadas em meio hidropônico até 7 dias. Após este período, as plantas foram coletadas, as raízes esterilizadas e as bactérias associadas endofiticamente re-isoladas para quantificação e identificação. A quantificação do número de bactérias foi realizada em dois experimentos independentes aos 3 e/ou 7 dias após a inoculação. A inoculação das plantas foi realizada com quatro estirpes de bactérias: i) *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, utilizada por ser uma bactéria comprovadamente capaz de colonizar raízes de milho e promover o crescimento da planta através de uma associação endofítica; ii) *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* 266, estirpe tipo da espécie, isolada como contaminante em água destilada na Nova Zelândia; e iii) *Escherichia coli* Top10 e DH10B, uma espécie não comumente encontrada em associação endofítica com plantas.

Foram realizados dois experimentos independentes; no primeiro experimento, a colonização por *H. seropedicae* SmR1 ocorreu até a diluição  $10^{-4}$  (contagem na ordem de grandeza de  $10^5$  UFC/raiz). Na colonização por *H. huttiense* subsp. *huttiense* 266 foi obtido contagem até a diluição de  $10^{-6}$  (contagem na ordem de grandeza de  $10^7$  UFC/raiz). Também foi observada colonização endofítica por *E. coli*, porém com contagem menor de colônias, até a diluição  $10^{-3}$  (contagem na ordem de grandeza de  $10^4$  UFC/raiz). A contagem do número de colônias para o 7º dia após a inoculação não foi realizado devido a contaminação por fungos, apesar das sementes terem sido tratadas com o fungicida Vitavax-Thiram (0,005% m/v) antes do cultivo.

Tabela 1- Colonização endofítica do milho *Zea mays* L. por *Herbaspirillum* spp e *E. coli*(experimento 1)

Diluição plaqueada	Contagem de UFC <sup>1</sup>			No. de UFC por raiz		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b><i>H. seropedicae</i> SmR1/ Experimento 1/ 3º dia</b>						
10 <sup>-1</sup>	58	-	67	5,8 x 10 <sup>3</sup>	-	6,7 x 10 <sup>3</sup>
	56		45	5,6 x 10 <sup>3</sup>		4,5 x 10 <sup>3</sup>

	66		35	6,6 x 10 <sup>3</sup>		3,5 x 10 <sup>3</sup> 30
10 <sup>-2</sup>		98	27	2,1 x 10 <sup>4</sup>	9,8 x 10 <sup>4</sup>	2,7 x 10 <sup>4</sup>
	21	102	41	2,4 x 10 <sup>4</sup>	1,02 x 10 <sup>5</sup>	4,1 x 10 <sup>4</sup>
	24	106	33	1,7 x 10 <sup>4</sup>	1,06 x 10 <sup>5</sup>	3,3 x 10 <sup>4</sup>
	17					
10 <sup>-3</sup>	10	33	20	1,0 x 10 <sup>5</sup>	3,3 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>
	6	40	23	6,0 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup>	2,3 x 10 <sup>5</sup>
	7	46	26	7,0 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>5</sup>	2,6 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>-4</sup>	-	7	1	-	7,0 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>
		12	2		1,2 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>
		13	0		1,3 x 10 <sup>6</sup>	0
10 <sup>-5</sup>	-	-		-	-	-
10 <sup>-6</sup>	-	-		-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-		-	-	-
<b><i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>huttiense</i> 266/Experimento 1/3<sup>o</sup> dia</b>						
10 <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-2</sup>	144	40	96	1,44 x 10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>4</sup>	9,6 x 10 <sup>4</sup>
	147	54	106	1,47 x 10 <sup>5</sup>	5,4 x 10 <sup>4</sup>	1,06 x 10 <sup>5</sup>
	133	28	108	1,33 x 10 <sup>5</sup>	2,8 x 10 <sup>4</sup>	1,08 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>-3</sup>	36	33	36	3,6 x 10 <sup>5</sup>	3,3 x 10 <sup>5</sup>	3,6 x 10 <sup>5</sup>
	44	30	40	4,4 x 10 <sup>5</sup>	3,0 x 10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup>
	23	15	30	2,3 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>4</sup>	3,0 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>-4</sup>	10	18	10	1,0 x 10 <sup>5</sup>	1,8 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>
	4	10	4	4,0 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>
	6	9	6	6,0 x 10 <sup>5</sup>	9 x 10 <sup>5</sup>	6,0 x 10 <sup>5</sup>
10 <sup>-5</sup>	1	-	1	1,0 x 10 <sup>6</sup>	-	-
	1		1	1,0 x 10 <sup>6</sup>		

	0	0	0			
10 <sup>-6</sup>	2	-	2	2,0 x 10 <sup>7</sup>	-	-
	1		1	1,0 x 10 <sup>7</sup>		
	0		0	0		
10 <sup>-7</sup>	-	-		-	-	-

1R1, R2 e R3 indicam as replicatas experimentais-

### ***Escherichia coli* TOP 10/Experimento 1/3º dia**

10 <sup>-1</sup>	53	40	25	5,3x10 <sup>3</sup>	4,0 x10 <sup>3</sup>	2,5 x10 <sup>3</sup>
	59	44	27	5,9 x10 <sup>3</sup>	4,4 x10 <sup>3</sup>	2,7 x10 <sup>3</sup>
	55	31	15	5,5 x10 <sup>3</sup>	3,1 x10 <sup>3</sup>	1,5 x10 <sup>3</sup>
10 <sup>-2</sup>	13	10	3	1,3 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>
	11	13	5	1,1 x 10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>4</sup>	5,0 x 10 <sup>3</sup>
	18	11	4	1,8 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>
10 <sup>-3</sup>	1	1	2	1,0x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	2,0 x10 <sup>4</sup>
	1	0	0	1,0 x10 <sup>4</sup>	0	0
	0	0	0	0	0	0

No segundo experimento observou-se um resultado para contagem de colônias semelhante ao observado para o primeiro experimento, onde houve uma colonização baixa pelas duas estirpes de *E.coli* testadas, porém a amplitude do controle positivo ( e maior para os tratamentos com as estirpes SmR1) e do tratamento (266, foi maior, atingindo colonização até 10<sup>-7</sup>, na sua maioria. Isso se deve, á prática de manipulação durante o experimento, ajudou a melhorar a qualidade dos resultados). Neste experimento obteve-se valores significativamente menores para contagem de colônias no 7º dia após a inoculação. Entretanto, houve grande contaminação das plantas por fungos, o que pode ter interferido nos resultados. Estes dados foram desconsiderados da análise. Não foi observado crescimento de colônias de micro-organismos para nenhuma diluição a partir do triturado de raízes de milho de plantas não inoculadas com bactéria.

No segundo experimento de colonização de raízes de milho, a estirpe SmR1 de *H. seropedicae*, uma bactéria conhecida capaz de colonizar raízes de milho endofiticamente, atingiu um número de UFC da ordem de 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> por raiz, de forma

confiável. A estirpe 266 de *H. huttiense* subsp. *huttiense*, uma bactéria isolada de água destilada, foi capaz de colonizar endofiticamente raízes de milho entre  $10^5$  a  $10^9$  células por raiz, de forma confiável. As estirpes de *E. coli* atingiram número de células por raiz somente da ordem de  $10^3$  a  $10^4$ , de forma confiável, aos três dias após a inoculação. Não foi observado UFC em placas cultivadas a partir dos triturados de raízes de plantas controle, onde não houve inoculação com bactéria (dado não mostrado). Boa parte da variação no número de UFC observada entre as replicatas ocorreu devido a variação no crescimento das plantas e das raízes, uma vez que os valores foram determinados para o volume total de raiz.

A colonização endofítica das raízes de milho foi também avaliada aos 7 dias após a inoculação. Para todas as estirpes testadas, houve decréscimo no número de UFC por raiz. Entretanto, foi observado contaminação das plantas por fungos, o que pode ter influenciado os resultados e tornando estes dados não confiáveis.

Diluição plaqueada	Contagem de UFC <sup>1</sup>			No. de UFC por raiz		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b><i>H. seropedicae</i> SmR1 3° dia</b>						
$10^{-1}$	97	180	76	$9,70 \times 10^3$	$1,80 \times 10^4$	$7,60 \times 10^3$
	75	179	38	$7,50 \times 10^3$	$1,79 \times 10^4$	$3,80 \times 10^3$
	17	162	35	$1,70 \times 10^3$	$1,62 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3$
$10^{-2}$	82	80	65	$8,2 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$
	23	76	30	$2,3 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
	17	62	28	$1,7 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
$10^{-3}$	89	15	54	$8,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$
	27	12	50	$2,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
	27	9	31	$2,7 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^5$
$10^{-4}$	34	15	12	$3,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
	18	14	10	$1,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$

	14	15	10	$1,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
$10^{-5}$	30	15	9	$3,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$
	24	14	8	$2,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
	20	10	6	$2,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$
$10^{-6}$	20	12	13	$2,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
	20	12	12	$2,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
	18	10	10	$1,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
$10^{-7}$	27	12	15	$2,7 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
	18	10	9	$1,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$
	12	6	8	$1,2 \times 10^9$	$6,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$
<b><i>Herbaspirillum huttiense</i> subsp. <i>huttiense</i> 266 3<sup>o</sup> dia</b>						
$10^{-1}$	32	-	-	-	-	-
	28					
	14					
$10^{-2}$	40	38	70	$3,20 \times 10^3$	$3,80 \times 10^4$	$7,00 \times 10^4$
	38	33	68	$2,80 \times 10^3$	$3,30 \times 10^4$	$6,80 \times 10^4$
	37	28	62	$1,40 \times 10^3$	$2,80 \times 10^4$	$6,20 \times 10^4$
$10^{-3}$	48	63	26	$4,8 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$
	26	19	16	$2,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
	12	8	14	$1,2 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$
$10^{-4}$	30	20	4	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$
	25	12	3	$2,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$
	20	10	3	$2,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$
$10^{-5}$	28	6	2	$2,8 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
	25	5	2	$2,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
	10	5	0	$1,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	0,0
$10^{-6}$	8	19	7	$8,0 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$
	6	10	2	$6,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$

	5	9	0	$5,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$	0,0
$10^{-7}$	12	15	4	$1,2 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$
	10	9	0	$1,0 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$	0
	9	9	0	$9,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^8$	0

1R1, R2 e R3 indicam as replicatas experimentais

Diluição plaqueada	Contagem de UFC <sup>1</sup>			No. de UFC por raiz		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<b>Escherichia coli top 10 3° dia</b>						
$10^{-1}$	12	38	25	$1,2 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$
	12	26	23	$1,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$
	11	23	20	$1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
$10^{-2}$	3	7	4	$3,0 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$
	0	5	3	0,0	$5,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$
	0	3	2	0,0	$3,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
$10^{-3}$	-	5	2	-	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$
		0	1		0	$1,0 \times 10^5$
		0	0		0	0
$10^{-4}$	34	15	12	$3,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
	18	14	10	$1,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
	14	15	10	$1,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
$10^{-5}$	30	15	9	$3,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$
	24	14	8	$2,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$
	20	10	6	$2,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$
$10^{-6}$	20	12	13	$2,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
	20	12	12	$2,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
	18	10	10	$1,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
$10^{-7}$	27	12	15	$2,7 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
	18	10	9	$1,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$
	12	6	8	$1,2 \times 10^9$	$6,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$

<b><i>Escherichia coli</i> DH10B 3ºdia</b>						
10 <sup>-1</sup>	11	-	-	1,1x 10 <sup>3</sup>	-	-
	10			1,0 x 10 <sup>3</sup>		
	6			6,0 x 10 <sup>3</sup>		
10 <sup>-2</sup>	4	38	28	4,0 x 10 <sup>3</sup>	3,8x10 <sup>4</sup>	2,8 x10 <sup>4</sup>
	1	32	24	1,0 x 10 <sup>3</sup>	3,2 x 10 <sup>4</sup>	2,4 x10 <sup>4</sup>
	0	21	22	0,0	2,1 x 10 <sup>4</sup>	2,2 x10 <sup>4</sup>
10 <sup>-3</sup>	4	5	4	4,0 x10 <sup>4</sup>	5,0 x10 <sup>4</sup>	4,0 x10 <sup>4</sup>
	5	5	6	5,0 x10 <sup>4</sup>	5,0 x10 <sup>4</sup>	6,0 x10 <sup>4</sup>
	0	5	5	0,0	5,0 x10 <sup>4</sup>	5,0 x10 <sup>4</sup>
10 <sup>-4</sup>	5	1	-	5,0x10 <sup>5</sup>	1,0 x10 <sup>5</sup>	-
	0	2		0	2,0 x10 <sup>5</sup>	
	0	0		0	0	
10 <sup>-5</sup>	2	-	-	2,0x10 <sup>6</sup>	-	-
	1			1,0 x10 <sup>6</sup>		
	0			0		

<sup>1</sup>R1, R2 e R3 indicam as replicatas experimentais/(-) não houve crescimento

Tabela 1- Colonização endofítica do milho *Zea mays* L. por *Herbaspirillum* spp e *E. coli* (Experimento 2).

### 5.2.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

As bactérias re-isoladas endofiticamente dos experimentos de inoculação em milho foram caracterizadas por espectrometria de massa MALDI-TOF, com o objetivo de comprovar a identidade taxonômica das espécies/estirpes inoculadas inicialmente nas plantas. Os espectros de massa, obtidos para as bactérias reisoladas das plantas, foram comparados com espectros de massa obtidos para as estirpes referência a partir de estoque de culturas e seu cultivo em meios comumente utilizados.

A figura 3 mostra espectros de massa MALDI-TOF de *Herbaspirillum* spp. a partir de estirpes referência, derivadas de estoques de culturas, comparadas com os espectros de massa MALDI-TOF de *Herbaspirillum* spp., estirpes SmR1 e 266, após seu re-isolamento de raízes do milho. As bactérias referência utilizadas foram : *Herbaspirillum*

*seropedicae* (SmR1), *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* (266), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (M1). A comparação foi realizada por uma análise de agrupamento dos espectros de massa e os resultados mostram que as bactérias re-isoladas das raízes do milho formaram grupos independentes em relação às demais estirpes referência. As figuras 4 e 5 mostram uma comparação direta entre os espectros das estirpes referência e destas mesmas estirpes após seu reisolamento de raízes de milho. O baixo número de picos m/z compartilhados confirma o resultado obtido na análise de agrupamento, tanto para a estirpe *H. seropedicae* SmR1, quanto para a estirpe *H. huttiense* subsp. *huttiense* 266.

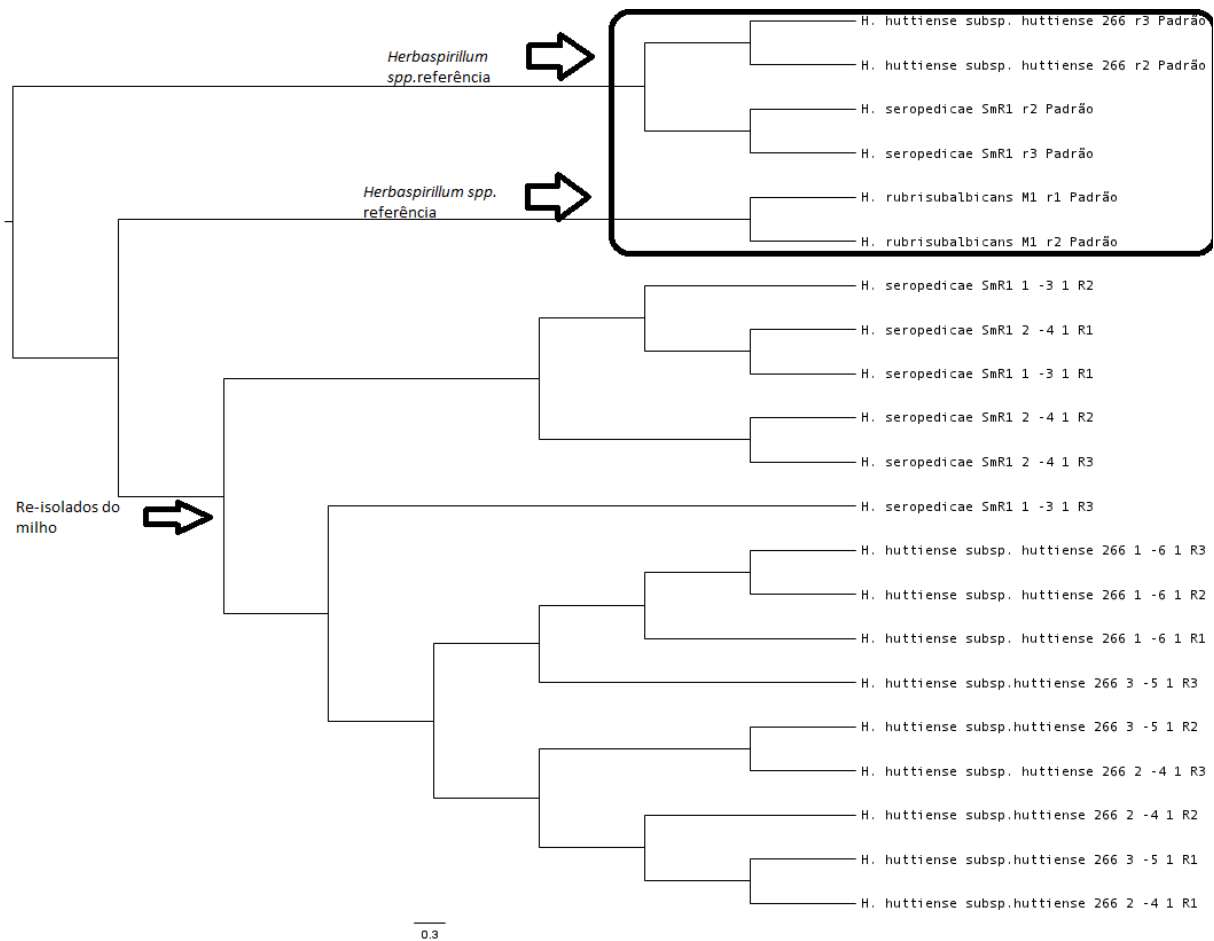


Figura 3 – Cladograma de comparação entre os *Herbaspirillum* spp. referência, identificados pela palavra padrão após o nome da espécie e sua replicata técnica; e os re-isolados do milho, identificados pelo nome da espécie seguida da sua replicata biológica e replicata técnica: Ex: *H. huttiense* subsp. *Huttiense* 266 1 (replicata biológica) -6 (  $10^{-6}$  diluição da replicata) 1 (primeiro experimento) R1 (replicata técnica)

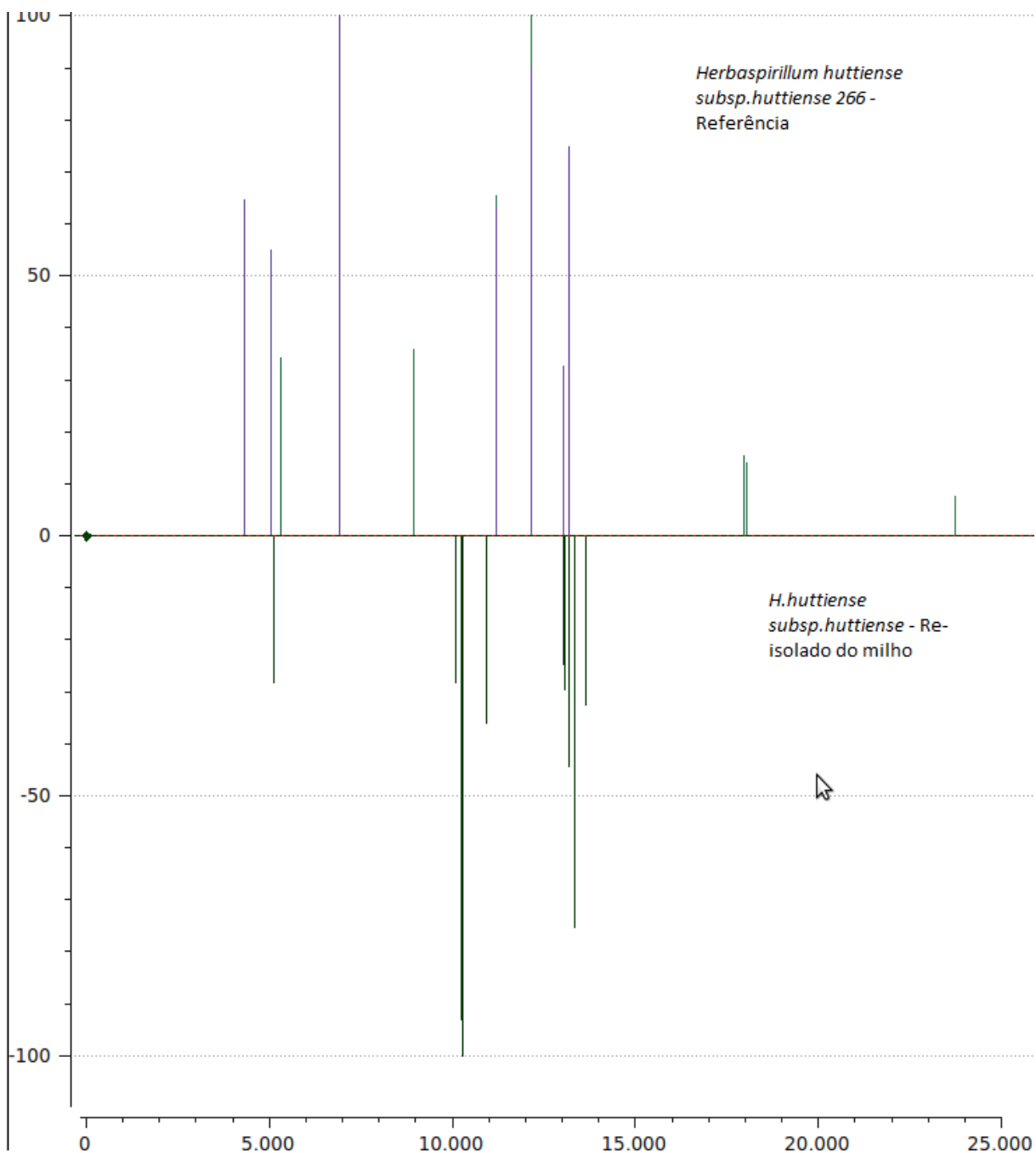


Figura 4 – Comparação em reflexo dos espectros do inoculado *H. huttiense* subsp. *huttiense* e o re-isolado do milho *H. huttiense* subsp. *huttiense* obtidos por MALDI-TOF.

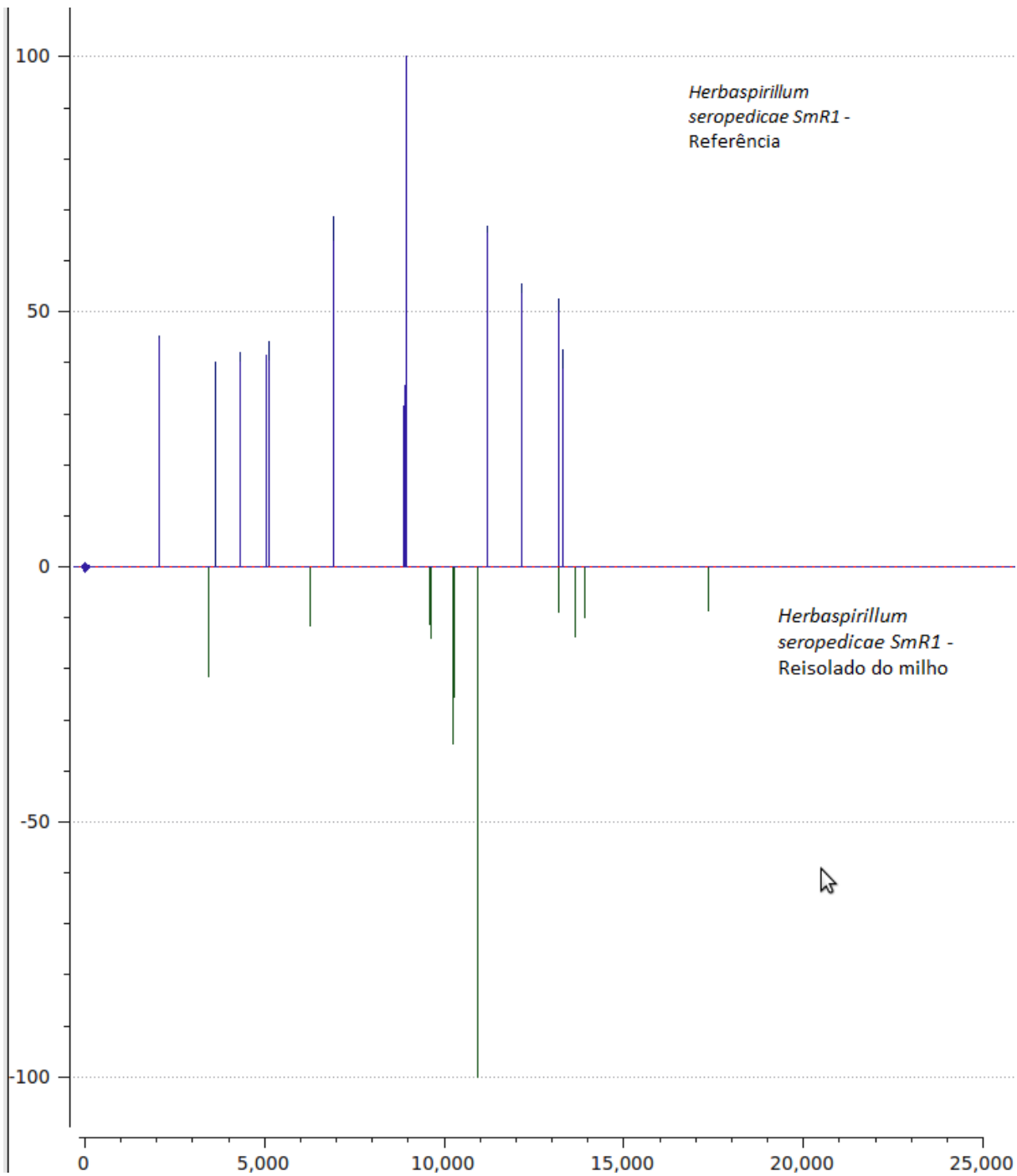


Figura 5 – Comparação em reflexo dos espectros do inoculado *H. seropedicae* e do re-isolado do milho *H. seropedicae*, obtido por MALDI-TOF.

### 5.2.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

Os resultados observados para as comparações de espectros MALDI-TOF das estirpes referência e aquelas reisoladas das plantas, poderiam indicar que as bactérias reisoladas das raízes de milho seriam contaminantes de outras espécies/estirpes diferentes daquelas que foram inicialmente inoculadas nas plantas. Para confirmar a identidade taxonômica das bactérias reisoladas das plantas, o gene que codifica para o 16S rRNA foi amplificado e sequenciado.

As tabelas 2 e 3 mostram os resultados para o sequenciamento das estirpes reisoladas *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Herbaspirillum huttiense* subsp. *Huttiense* 266. Três amostras geraram sequências com qualidade suficiente para identificação taxonômica de um total de treze amostras analisadas. As sequências obtidas foram usadas para uma busca por similaridade contra o banco de dados "16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), em maio de 2016", usando o programa BLASTn (Zhang et al., 2000). Apesar da sequência do gene 16S rRNA não permitir uma classificação confiável abaixo do nível de gênero, os primeiros resultados para a análise do programa BLAST foram exatamente as estirpes inoculadas em cada tratamento dos experimentos de inoculação, permitindo confirmar a identidade taxonômica das estirpes reisoladas das plantas.

Tabela 2 – Identificação dos re-isolados que foram sequenciados.

Isolado <sup>1</sup>	Exp (inoculada) <sup>2</sup>	Comp (bases) <sup>3</sup>	BLASTn <sup>4</sup>	Cobertura <sup>4</sup>	Identidade <sup>4</sup>
Reisolado 7 r1/10 <sup>-6</sup> 43773	1 (266)	862 681	<i>H. huttiense</i> NBRC 102521 (NR_114139)	95% 100%	95% 98%
Reisolado 9 r2/10 <sup>-4</sup> 43774	2 (SmR1)	795	<i>H. seropedicae</i> NBRC 102524 (NR_114142)	99%	98%
Reisolado 10 r3/10 <sup>-3</sup> 43775	2 (SmR1)	932 731	<i>H. seropedicae</i> NBRC 102524 (NR_114142)	100% 100%	97% 99%

<sup>1</sup>Colônia reisolada das plantas de milho inoculadas; replicata biológica/ diluição plaqueada; identificação da sequência no NFN (Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR).

<sup>2</sup>Número do experimento de inoculação e estirpe inoculada (entre parênteses).

<sup>3</sup>Comprimento da sequência usada na pesquisa com o programa BLASTn; valores diferentes indicam que a comparação foi feita considerando a sequência total ou parcial devido a remoção de extremidades de baixa qualidade identificadas a partir dos cromatogramas.

<sup>4</sup>Primeiro resultado para a busca com o programa BLASTn contra o banco de dados "16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)" em maio de 2016; cobertura em relação à sequência problema; Identidade de bases para o alinhamento.

## 6 DISCUSSÃO

Em várias plantas a virulência das bactérias patogênicas é em parte dependente de um grupo de proteínas que são injetadas nas células do hospedeiro por um Sistema de Secreção do Tipo III (SST3). Esta é uma maquinaria altamente conservada capaz de secretar proteínas bacterianas em células eucarióticas. Recentemente, genes *hrp/hrc* que codificam as proteínas do SST3, foram identificados no genoma de *H. rubrisubalbicans*.

Em estudos recentes, constatou-se que as estirpes mutantes nos genes *hrpE* e *hrcN* de *H. rubrisubalbicans* não provocam sintomas de doença diferente do que ocorre com a estirpe selvagem M1 em folhas de *Vigna*. Neste trabalho os ensaios de inoculação na leguminosa foram feitos com nove espécies de *Herbaspirillum*, utilizando *H. rubrisubalbicans* como controle positivo e *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 como controle negativo, confirmar a fitopatogenicidade de utilizando *H. Rubrisubalbicans* e verificar se as demais espécies teriam a mesma resposta.

Em outros estudos, os ensaios *in planta* despertaram grande curiosidade com os resultados obtidos. O *Herbaspirillum huttiense*, estirpe IAM14941, foi encontrado nos testes que verificam a colonização epifítica e a endofítica em milho, embora a quantidade de *H. huttiense* encontrada na colonização endofítica fosse menor que a colonização observada para *H. Seropedicae*. O resultado mostrou um nível de colonização epifítica e endofítica semelhantes para *H. seropedicae* e *H. huttiense*. Desta forma, o milho mostrou-se um modelo melhor para estudar a capacidade de colonização de *H. huttiense*. Por esse motivo neste trabalho, o *H. huttiense* subsp. *huttiense* 266 foi utilizado como tratamento para inoculação em milho e confirmação de sua capacidade endofítica de colonização.

## 7 CONCLUSÃO

Estirpes de *Herbaspirillum* spp. não foram capazes de produzir sintomas de doença semelhantes ao causado pela inoculação com *H. rubrisubalbicans* em *Vigna unguiculata*.

As análises de espectrometria de massa MALDI-TOF usando espectros de referência não permitiram a identificação das bactérias reisoladas das raízes de milho. Os espectros de massa das bactérias reisoladas não agruparam da forma esperada com os espectros de referência das mesmas estirpes. Entretanto, a identificação foi possível através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, indicando que não houve contaminação nos experimentos de inoculação. Como a aplicação da espectrometria de massa MALDI-TOF se trata de uma análise do conteúdo de proteínas que ocorrem em maior abundância, conseqüentemente trata-se de uma análise do estado fisiológico que pode conter variações caso haja diferenças experimentais. Estes resultados também indicam que a padronização da metodologia para obtenção dos espectros é de grande importância na técnica, minimizando variações que podem prejudicar sua aplicação na identificação de bactérias. Desta forma, é possível que a “passagem” das estirpes de *Herbaspirillum* spp. pela planta possa alterar o perfil de espectro de massa gerado, mesmo após seu reisolamento em meio de cultura padrão, o mesmo utilizado para gerar os espectros referência.

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ALM, R.; JOHANSSON, P.; HJERNO, K.; EMANUELSSON, C.; RINGNER, M.; HAKKINEN, J. Detection and identification of protein isoforms using cluster analysis of MALDI-MS mass spectra. *Journal of proteome research*, v. 5, p. 785-792, 2006.

ALVES, G. C. Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Área de Ciência do Solo. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2007.

BALDANI, J. I., BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. 2003. Genu *Herbaspirillum*. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 2003.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* Bethesda, v. 29, n. 5/ 6, p. 911-922, 1997.

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

CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology* v. 14, p. 1584-1586, 1996.

CHICORA, V.K. Análise molecular do gênero *Herbaspirillum* e isolados diazotróficos endofíticos de abacaxizeiro e bananeira. Monografia - Área de bioquímica e biologia molecular. Universidade Federal do Paraná, 2013.

DEMIREV, P. A.; FENSELAU, C. Mass Spectrometry for rapid characterization of microorganisms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v.1, p.71–93, 2008.

DUARTE, J. O. Economia da produção. In: CRUZ, J.C. (Ed.). *Cultivo do milho*. 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007.

EMBRAPA. Sistema de produção. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80707/1/sistemaproducao-2.PDF>> Acesso em: 28 fev.2015

HOLLAND, R. D.; WILKES, J. G.; RAFII, F.; SUTHERLAND, J. B.; PERSONS, C. C.; VOORHEES, K. J.; et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionisation with time of flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* v. 10, p. 1227-1232, 1996.

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

LPSN-List of prokaryotic names with standngin nomenclature. Disponível em <<http://www.bacterio.net/herbaspirillum.html>> Acesso em 10. junho.2016

SANTOS, R. S. MS-Analyser: programa de computador para identificações de microrganismos por análise de MALDI-TOF. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 61 p., 2013.

SCHIMIDT, M. A. Envolvimento do sistema de secreção tipo III de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* na interação fitopatogênica, Dissertação(Mestrado em Bioquímica)Setor Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.Curitiba, 2009.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds.). *Biological nitrogen fixation*. New York: Chapman & Hall, p.43-86, 1992.

WILLIAMS, T. L.; ANDRZEJEWSKI, D.; LAY JR., J. O.; MUSSER, S. M. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bactéria cells. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* v. 14, p. 342-351, 2003.

WUNSCHHEL, S. C.; JARMAN, K. H.; PETERSEN, C. E.; VALENTINE, N. B.; WAHL, K. L.; SCHAUKI, D.;JACKMAN, J.; NELSON, C. P.; EDWARD WHITE, V. Bacterial Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Inter-Laboratory Comparison. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* v. 16, p. 456-462, 2005.

ZHENG ZHANG, SCOTT SCHWARTZ, LUKAS WAGNER, AND WEBB MILLER (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.