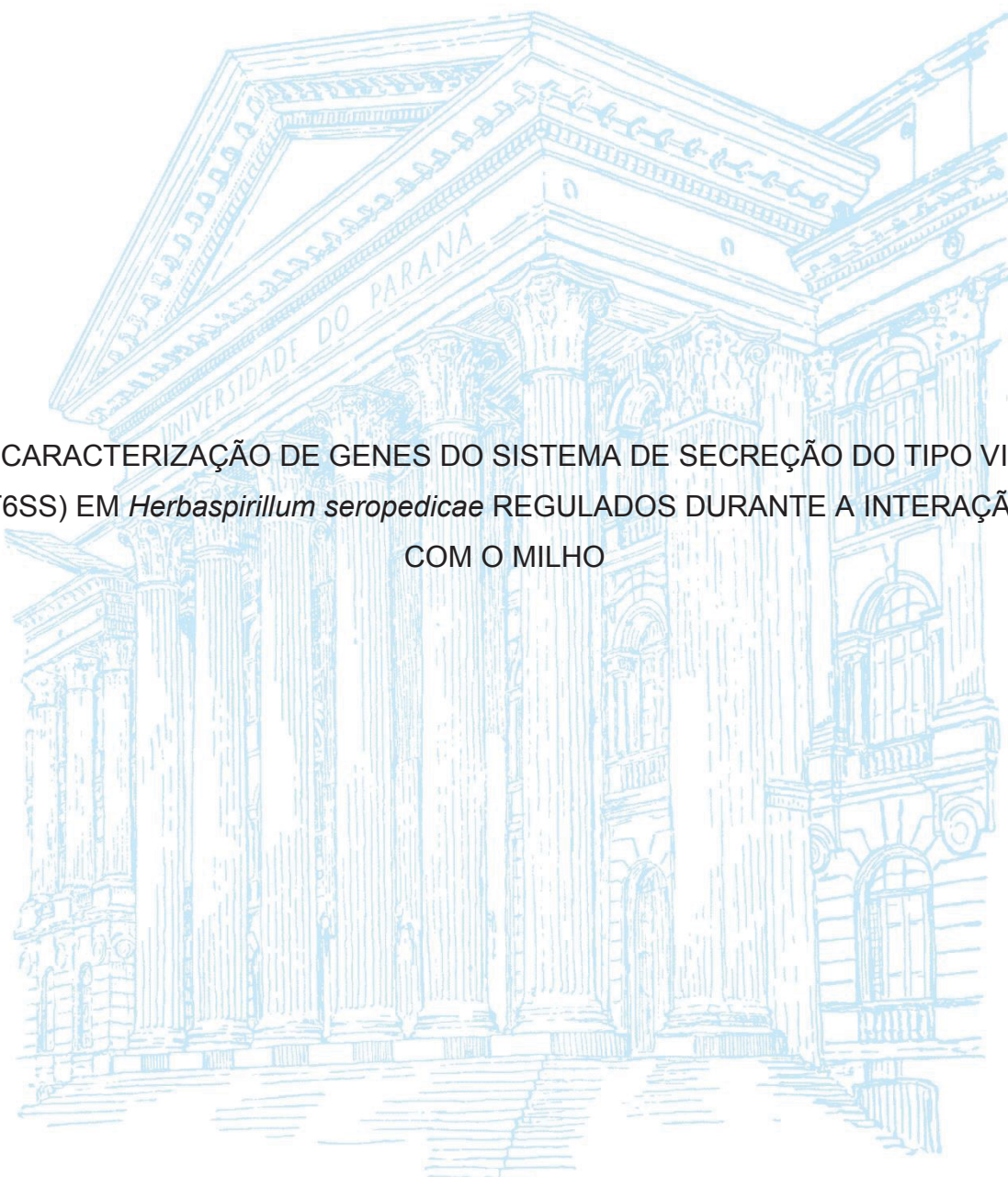


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCOS DAMRLEY GALVÃO DA LUZ



CARACTERIZAÇÃO DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI
(T6SS) EM *Herbaspirillum seropedicae* REGULADOS DURANTE A INTERAÇÃO
COM O MILHO

CURITIBA

2019

MARCOS DAMRLEY GALVÃO DA LUZ

CARACTERIZAÇÃO DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI (T6SS)
EM *Herbaspirillum seropedicae* REGULADOS DURANTE A INTERAÇÃO COM O
MILHO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rose Adele Monteiro

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

L979c

Luz, Marcos Damrley Galvão da
Caracterização de genes do sistema de secreção do tipo VI (T6SS) em
Herbaspirillum seropedicae regulados durante a interação com o milho [recurso
eletrônico] / Marcos Damrley Galvão da Luz. – Curitiba, 2019.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas,
Programa de Pós- Graduação em Ciências - Bioquímica, 2019.

Orientadora: Rose Adele Monteiro.

1. Milho. 2. Bactérias. 3. Plasmídeos. I. Universidade Federal do Paraná.
II. Monteiro, Rose Adele. III. Título.

CDD: 579.3135

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 400010160/3P2

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 **MARCOS DAMRLEY GALVÃO DA LUZ**, intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI (T6SS) EM HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE REGULADOS DURANTE A INTERAÇÃO COM O MILHO**, sob orientação da Profa. Dra. ROSE ADELE MONTEIRO, após terem inquirido o aluno 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, 22 de Agosto de 2019.

ROSE ADELE MONTEIRO

Presidente da Banca Examinadora

ANA CLAUDIA BONATTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ)

LEONARDO MAGALHÃES CRUZ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ)

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmã e sobrinha.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, a pessoa que eu mais amo no mundo.

Ao meu pai, o maior incentivador dos meus estudos.

À minha irmã por ter sido tão importante na primeira fase da minha vida. E por ter gerado a pessoa que me faz chorar de rir, de uma inteligência admirável, e uma doçura única.

À Roberta, que o tio tanto ama e senti muita saudade. A pessoa que me faz querer voltar a Belém todo mês de outubro.

Aos amigos da faculdade de Biologia da UFPA e do meu antigo estágio, vocês fazem uma falta enorme.

À professora Rose Adele, pela orientação e aceitação em contribuir nos meus objetivos acadêmicos.

Ao NFN por estar sendo meu local de iniciação científica, onde aprendi a maior parte do que eu sei sobre laboratório. Muito obrigado aos técnicos Roseli Prado, Valter e Bruna!!!

Aos colegas de laboratório, principalmente, a galera do Anexo. Nosso ambiente de trabalho é leve pela gracinha de vocês.

Agradeço especialmente à Kalinka, Júlia, Bruno e Estevan por terem ajudado diretamente no meu projeto de mestrado.

À Kalinka eu agradeço duas vezes porque ela foi a pessoa que mais me apoiou na fase pesada das plantas e companhia. Saiba que tu és um exemplo para mim.

Ao Adilson pela amizade sincera nos dois últimos anos.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O Sistema de Secreção do Tipo VI (T6SS) é um aparato nanomolecular usado por espécies do filo Proteobacteria para a injeção de proteínas efetoras em células procariotas ou eucariotas. Os efetores injetados no interior de células-alvo podem ter atividade antibacteriana ou função de modular o hospedeiro. A bactéria promotora do crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* contém dois agrupamentos gênicos homólogos ao T6SS que até o momento não foram caracterizados. Neste trabalho foi avaliado a função dos genes *tagF1* e *tssH2* durante a interação desta bactéria com milho. Para isso foram construídas as estirpes mutantes de *H. seropedicae* nesses genes. O primeiro gene é caracterizado em outras espécies como regulador pós-traducional do T6SS. O segundo gene codifica uma ATPase que tem papel central no funcionamento desse sistema de secreção. Uma vez que o T6SS pode estar relacionado a competição bacteriana, as estirpes mutantes construídas foram testadas em ensaios de competição contra a estirpe selvagem *in planta* e em sistema planctônico. Em *H. seropedicae*, a mutação em *tagF1* torna a estirpe mutante neste gene menos competitiva no processo de colonização do milho em relação a estirpe selvagem. A mutação em *tssH2* torna a estirpe mutante neste gene menos competitiva durante a etapa de adesão às raízes de milho em relação a estirpe selvagem. Em sistema planctônico também é verificada a redução de competitividade das estirpes mutantes em comparação a selvagem. Os resultados indicam que os T6SS em *H. seropedicae* podem estar associados a manutenção da colonização do milho por esta bactéria benéfica a planta.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*. Sistema de secreção do tipo VI.

Competição bacteriana em milho.

ABSTRACT

The Type VI Secretion System (T6SS) is a nanomolecular apparatus used by bacteria species of the Proteobacteria phylum for injecting effector proteins in prokaryote or eukaryote host cells. The injected effectors can modulate the cellular processes of the host or act as anti-microbe factors. The plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* contains two gene clusters homologous to the T6SS and has not been characterized until the present time. In this work we evaluated the function of the *tagF1* and *tssH2* genes in the plant-bacteria interaction with maize. For such, mutant strains of the mentioned genes were obtained in *H. seropedicae*. The *tagF1* gene is characterized in other species as post-translational regulator of the T6SS. The *tssH2* gene codes for an ATPase which has a central role in the T6SS operation. The mutant strains were tested in competition assays against the wild-type strain in planktonic and *in planta* systems due of the possible involvement of T6SS in bacteria competition. The *tagF1* mutation in *H. seropedicae* results in a less competitive strain when compared to the wild-type in the maize colonization process. The *tssH2* mutation results in less adhesion to the surface of maize roots when compared to the wild-type. The mutant strains also show reduced competitiveness when compared to the wild-type in planktonic systems. The results indicate that the T6SS in *H. seropedicae* might be associated to maintenance of maize roots colonization.

Keywords: *Herbaspirillum seropedicae*. Type VI secretion system. Bacterial competition in maize.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO T6SS..... | 20 |
| FIGURA 2 - T6SS BACTERIANO E O DISPOSITIVO DE PUNÇÃO DO FAGO T4 . | 21 |
| FIGURA 3 - REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DO T6SS EM <i>P. aeruginosa</i> | 23 |
| FIGURA 4 - MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE <i>H. seropedi- cae</i> | 25 |
| FIGURA 5 - COLONIZAÇÃO DE PLANTAS POR <i>H. seropedicae</i> | 27 |
| FIGURA 6 - ESQUEMA DO ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DE MILHO POR <i>H. seropedicae</i> | 42 |
| FIGURA 7 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO T6SS-1 E T6SS-2 EM <i>H. seropedi- cae</i> | 46 |
| FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>tagF1</i> EM <i>H. seropedicae</i> | 49 |
| FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>tssH2</i> EM <i>H. seropedicae</i> | 49 |
| FIGURA 10 - CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANA | 51 |
| FIGURA 11 - ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1 <i>tagF1</i> DE <i>H. seropedicae</i> EM MILHO | 52 |
| FIGURA 12 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1 <i>tagF1</i> DE <i>H. seropedicae</i> EM MILHO | 53 |
| FIGURA 13 - ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1 <i>tssH2</i> DE <i>H. seropedicae</i> EM MILHO | 54 |
| FIGURA 14 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1 <i>tssH2</i> DE <i>H. seropedicae</i> EM MILHO | 55 |
| FIGURA 15 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1 <i>tagF1</i> DE <i>H. seropedicae</i> EM SISTEMA PLANCTÔNICO | 57 |
| FIGURA 16 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 e SmR1 <i>tssH2</i> DE <i>H. seropedicae</i> EM SISTEMA PLANCTÔNICO | 58 |
| FIGURA 17 - ENSAIO DE BIOFILME. | 59 |
| FIGURA 18 - HALO DE MOTILIDADE DE COLÔNIAS DE <i>H. seropedicae</i> SmR1, SmR1 <i>tagF1</i> , SmR1 <i>tssH2</i> | 58 |
| FIGURA 19 - ENSAIO DE MOTILIDADE. | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS | 30 |
| TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS | 31 |
| TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFbHPN MALATO | 33 |
| TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LB | 33 |
| TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS USADOS NOS CULTIVOS | 34 |
| TABELA 6 - SEQUÊNCIAS DE PRIMERS..... | 36 |
| TABELA 7 - MUTAGÊNESE DO T6SS EM <i>H. seropedicae</i> | 48 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 | SISTEMAS DE SECREÇÃO BACTERIANOS | 15 |
| 2.2 | O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI | 17 |
| 2.2.1 | TssH é a fonte de energia primária para o T6SS..... | 19 |
| 2.2.2 | Componentes centrais: estrutura de membrana e dispositivo de injeção | 20 |
| 2.2.3 | A regulação positiva dependente de fosforilação e a regulação negativa dependente de <i>tagF</i> no T6SS | 22 |
| 2.3 | O T6SS EM BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS..... | 24 |
| 2.4 | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | 25 |
| 3 | OBJETIVOS | 28 |
| 4 | JUSTIFICATIVA | 29 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 5.1 | BACTÉRIAS..... | 30 |
| 5.2 | PLASMÍDEOS..... | 31 |
| 5.3 | CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO..... | 33 |
| 5.4 | ANTIBIÓTICOS..... | 34 |
| 5.5 | MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS | 34 |
| 5.6 | ESTUDO <i>in silico</i> DOS GENES DO T6SS EM <i>H. seropedicae</i> | 34 |
| 5.7 | TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA | 34 |
| 5.7.1 | Extração de DNA plasmidial | 34 |
| 5.7.2 | Eletroforese de DNA | 35 |
| 5.7.3 | Digestão de DNA por enzima de restrição..... | 35 |
| 5.7.4 | Ligação de fragmentos de DNA aos vetores | 35 |
| 5.7.5 | Amplificação de DNA | 36 |
| 5.7.6 | Sequenciamento de DNA..... | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.8 | TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i> POR ELETROPORAÇÃO..... | 38 |
| 5.8.1 | Preparação de células competentes | 38 |
| 5.8.2 | Transformação bacteriana..... | 39 |
| 5.9 | CONJUGAÇÃO BACTERIANA | 39 |
| 5.10 | OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> | 39 |
| 5.11 | CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANA..... | 40 |
| 5.12 | ENSAIOS <i>in planta</i> | 41 |
| 5.12.1 | Desinfecção da superfície de sementes de milho..... | 41 |
| 5.12.2 | Inoculação das estirpes de <i>H. seropedicae</i> em cultivo de milho em sistema hidropônico | 41 |
| 5.12.3 | Ensaio de adesão das estirpes de <i>H. seropedicae</i> às raízes de milho | 41 |
| 5.12.4 | Ensaio de colonização epifítica das raízes de milho pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i> | 42 |
| 5.12.5 | Ensaio de colonização endofítica das raízes de milho pelas estirpes de <i>H. seropedicae</i> | 43 |
| 5.13 | CO-CRESCIMENTO BACTERIANO EM MEIO LÍQUIDO..... | 43 |
| 5.14 | FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MICROPLACA | 44 |
| 5.15 | ENSAIO DE MOTILIDADE SWARMING | 44 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 6.1 | ANÁLISES <i>in silico</i> REVELAM QUE O GENOMA DE <i>H. seropedicae</i> POSSUI DOIS T6SS..... | 45 |
| 6.2 | CLONAGEM GÊNICA..... | 47 |
| 6.3 | OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DO T6SS EM <i>H. seropedicae</i> | 48 |
| 6.4 | CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANA..... | 50 |
| 6.5 | A MUTAÇÃO NO GENE <i>tagF1</i> (T6SS-1) EM <i>H. seropedicae</i> TORNA ESSA ESTIRPE MENOS COMPETITIVA NA COLONIZAÇÃO DE MILHO EM ENSAIO DE COMPETIÇÃO COM A ESTIRPE SELVAGEM | 51 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6.6 | A MUTAÇÃO NO GENE <i>tssH2</i> (T6SS-2) EM <i>H. seropedicae</i> TORNA ESSA ESTIRPE MENOS COMPETITIVA NA ADESÃO AO MILHO EM ENSAIO DE COMPETIÇÃO COM A ESTIRPE SELVAGEM..... | 53 |
| 6.7 | AS ESTIRPES MUTANTES SmR1 <i>tagF1</i> (T6SS-1) E SmR1 <i>tssH2</i> (T6SS-2) TAMBÉM SÃO MENOS COMPETITIVAS QUE A SELVAGEM EM SISTEMA PLANCTÔNICO DE CRESCIMENTO | 56 |
| 6.8 | AS MUTAÇÕES <i>tagF1</i> E <i>tssH2</i> EM <i>H. seropedicae</i> AUMENTAM A FORMAÇÃO DE BIOFILME | 58 |
| 6.9 | AS MUTAÇÕES NOS GENES <i>tagF1</i> E <i>tssH2</i> AUMENTAM A MOTILIDADE DE <i>H. seropedicae</i> | 60 |
| 7 | CONCLUSÃO | 62 |
| | REFERÊNCIAS | 63 |

1 INTRODUÇÃO

As bactérias desenvolveram estratégias de colonização de diversos microambientes e estruturas especializadas que permitem uma comunicação refinada entre si e outros organismos. Os sistemas de secreção bacterianos medeiam essa comunicação e possibilitam a aquisição de nutrientes, formação de biofilme, secreção de fatores de virulência, entre outros. O sistema de secreção do tipo VI (T6SS), do inglês *Type six secretion system*, é um dispositivo da parede celular de bactérias Gram-negativas que injeta efetores com ação antibacteriana ou que manipulam células eucariotas (HOOD et al., 2010). É estimado que 25% das bactérias do filo Proteobacteria apresentem no seu genoma genes homólogos ao T6SS (BOYER et al., 2009). Esses microrganismos incluem patógenos animais ou vegetais, mas na sua maioria são bactérias não patogênicas, seres comensais de animais ou simbiotes de plantas.

A descoberta e designação do termo T6SS não possui duas décadas completas (MOUGOUS et al., 2006). Nesse tempo um número considerável de estudos possibilitou elucidar o complexo estrutural, algumas das proteínas secretadas e suas funções, e o provável mecanismo de injeção do T6SS (HO; DONG; MEKALANOS, 2014; RUSSELL et al., 2012). Inicialmente o T6SS foi principalmente relacionado a fatores de virulência de bactérias patogênicas (MOUGOUS et al., 2006; PUKATZKI et al., 2006). Alguns trabalhos mostraram que o T6SS era importante para a virulência e causava morte celular de células eucariotas (BINGLE; BAILEY; PALLEN, 2008). Bactérias que possuem dois ou mais agrupamentos gênicos do T6SS foram investigadas e notou-se que esses agrupamentos podem ter funções diferentes, de virulência ou atividade antibacteriana (SCHWARZ et al., 2010). Alguns trabalhos sugerem que a função do T6SS é primariamente relacionada a atividade antibacteriana e confere um *fitness* competitivo a bactéria (COULTHURST, 2019). Essa afirmativa pode ser generalizada até certo ponto porque o T6SS é amplamente distribuído em bactérias não patogênicas que colonizam diferentes organismos e nichos. É possível que esse sistema de secreção esteja envolvido com a comunicação célula-célula, comunicação simbiote e hospedeiro (BOYER et al., 2009), interação planta-bactéria. Nesse contexto, é importante que seja ampliado o número de pesquisas que abordem o T6SS em bactérias patogênicas ou simbiotes associadas a plantas.

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica que mantém uma associação estável e benéfica com plantas através da colonização epifítica e endofítica de gramíneas, como milho, arroz, sorgo, trigo e outras. *H. seropedicae* é uma bactéria promotora do crescimento vegetal. Os sinais moleculares das plantas são reconhecidos pela bactéria que modula fatores da promoção do crescimento. Os fatores da promoção de crescimento são, a fixação biológica do nitrogênio, a síntese de fito-hormônios, a solubilização de fosfatos entre outros (MONTEIRO et al., 2012).

O genoma de *H. seropedicae* foi sequenciado e revelou que esta bactéria possui dois agrupamentos gênicos homólogos ao T6SS (PEDROSA et al., 2011). No entanto, não foi mostrado qual seria a função desses dois sistemas em *H. seropedicae*. Este trabalho tem como objetivo geral determinar se o sistema de secreção do tipo VI (T6SS) de *H. seropedicae* está envolvido na interação desta bactéria com raízes de plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMAS DE SECREÇÃO BACTERIANOS

A secreção de macromoléculas é uma propriedade indispensável para a sobrevivência das bactérias (FRONZES; CHRISTIE; WAKSMAN, 2009). Em linhas gerais, os sistemas de secreção são a base da comunicação desses microrganismos com seu nicho natural ou hospedeiro (MICHEL; VOULHOUX, 2009). Independente do seu estilo de vida, se patogênica ou não patogênica, as bactérias secretam macromoléculas do interior celular para o ambiente extracelular (HENDERSON et al., 2004). No caso das bactérias Gram-negativa que o envelope celular configura duas membranas, sendo uma membrana interna ou citosólica, e uma membrana externa, além da região intermediária chamada de periplasma, o fluxo de macromoléculas é um grande desafio (DESVAUX; PARHAM; HENDERSON, 2004; HENDERSON et al., 2004). Então, através de estruturas especializadas são exportados fatores de virulência, toxinas, adesinas, enzimas e outras (HENDERSON et al., 2004). Até o momento seis sistemas de secreção (T1SS-T6SS) são relativamente bem estudados nas bactérias Gram-negativa (ABBY; ROCHA, 2017).

O T1SS é formado no envelope celular por três diferentes componentes, uma proteína de membrana externa (da classe TolC), duas proteínas de membrana citosólica, o transportador ABC (do inglês, *ATPase-binding cassette*) e uma proteína de fusão de membrana. O transportador ABC reconhece seu substrato por meio de um sinal de secreção carboxi-terminal, e determina a especificidade do processo de secreção. A proteína de fusão faz a conexão entre os componentes de membrana interna e externa, devido sua configuração, domínio N-terminal curto na face citosólica, porção de ancoragem na membrana e domínio periplasmático grande. TolC forma um canal na membrana externa que se contrai próximo a região periplasmática e promove a secreção de macromoléculas, como proteases, fosfatases, lipases (DELEPELAIRE, 2004).

O T2SS é um complexo formado por 12-15 diferentes proteínas que compõem a principal rota terminal da via de secreção geral (Gsp, do inglês *General secretory pathway*). O aparato de secreção no envelope celular possui quatro componentes principais. A proteína GspE que apresenta motivos *Walker A* e *B* essenciais para atividade de ATPase e secreção. A plataforma de membrana interna (GspC, GspF, GspL, GspM) que possui domínios citosólico, transmembrana, e periplasmático que

se comunicam com os demais componentes. Os pseudopilus são estruturas fibrosas que contribuem para a translocação das proteínas no periplasma até a estrutura de membrana externa (GspD) que exporta proteínas enoveladas. Somente proteínas sintetizadas com um peptídeo sinal na região amino-terminal são direcionadas para a translocação pela membrana interna através das vias universais de secreção (Sec e Tat). No periplasma essa sinalização amino-terminal é removida, mas as proteínas ainda apresentam uma forma estável. Então essas proteínas são exportadas ao meio extracelular sob condições específicas de comunicação entre as membranas interna e externa. O T2SS de maneira geral exporta enzimas, como proteases, lipases, fosfatases, que possuem sítios de ação extracelular, às vezes, toxinas com ação no interior de células eucariotas (KOROTKOV; SANDKVIST; HOL, 2012).

O T3SS é também chamado de “injectiossoma”, por sua estrutura especializada em injetar proteínas no citoplasma de células eucariotas. A estrutura do T3SS no envelope celular bacteriano é formada por quatro partes (PORTALIOU et al., 2017). O aparato de exportação: composto pelas proteínas SctR, SctS, SctT, SctU, SctV que estão localizadas na membrana citosólica, formando a base da estrutura de injeção, além de estarem em contato com proteínas importantes do ambiente citosólico, como a ATPase SctN. O corpo base: composto por múltiplas cópias de secretina de membrana externa SctC, e proteínas de membrana interna SctD e SctJ, que juntas formam uma estrutura de anéis entre membranas. A estrutura de agulha: um filamento com inúmeras cópias de SctF conectado ao complexo SctRSTUV por estruturas de hastes (SctI). O “translocon”: a estrutura (SctB e SctE) na extremidade da agulha que injeta efetores nas células hospedeiras (SINGH; WAGNER, 2019).

Há três tipos de T4SS (a, b e c) que são relacionados evolutivamente e, de maneira geral, compartilham os mesmos componentes. T4SS (a) medeia a transferência de DNA plasmidial ou transposon por conjugação. O T4SS (b) promove troca genética, por captação e exportação de DNA no meio extracelular. T4SS (c) está envolvido com a translocação de efetores em células eucariotas. Os T4SS são formados por 12 proteínas (VirB1-VirB11 e VirD4) que são organizadas em um complexo central de translocação de macromoléculas, que está disposto no envelope celular, formando um poro na membrana externa. Três ATPases (VirB4, VirB11 e VirD) dedicadas ao fornecimento de energia para o funcionamento do T4SS, das quais duas (VirB4, VirB11) também participam da biogênese do pilus. Os pili, por sua vez, são

estruturas de superfície que permitem um contato específico e estável entre célula doadora e célula-alvo, por meio, da formação de um canal por onde passam os substratos (FRONZES; CHRISTIE; WAKSMAN, 2009).

O T5SS inclui a secreção de autotransportadores e um sistema de duas partes (*Two-partner system*). Em ambos os casos, as proteínas sintetizadas (de famílias de natureza porina) são constituídas por um peptídeo sinal amino-terminal, que é clivado através da via de secreção geral (Sec) durante sua translocação para o periplasma. Nesse novo ambiente mais hidrofóbico, a conformação da proteína muda espontaneamente para uma inserção na conformação barril- β na membrana externa, formando um poro. Então, a porção carboxi-terminal na conformação barril- β é clivada por meio de uma atividade autocatalítica que transporta para o ambiente extracelular uma exoproteína. A principal diferença entre a secreção de autotransportadores e o sistema de duas partes, é que nesse segundo caso, são duas proteínas distintas que formam a estrutura de poro e a exoproteína. O domínio exportado corresponde a um efector secretado, e no T5SS, essas moléculas são relacionadas a virulência, são proteases, peptidases, lipases, esterases (DESVAUX; PARHAM; HENDERSON, 2004; HENDERSON et al., 2004).

2.2 O SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO VI

Em 2006 o agrupamento gênico IAHP (do inglês, IcmF-associated homologous protein), que alguns anos antes havia sido identificado no genoma de várias Proteobacteria (DAS; CHAUDHURI, 2003), foi reconhecido como um novo sistema de secreção, o T6SS (PUKATZKI et al., 2006). Nesse primeiro momento dois trabalhos do grupo de pesquisa Mekalanos foram muito importantes. O primeiro mostrou que o T6SS do patógeno *Vibrio cholerae* está associado a morte de células eucariotas. Mutações em genes que codificam as proteínas estruturais TssM (IcmF), TssL (DotU), TssF e a proteína secretada TssD (Hcp) conferiam um fenótipo de virulência atenuada as bactérias mutantes (PUKATZKI et al., 2006). O segundo trabalho buscou caracterizar no patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* o aparato de secreção homólogo ao T6SS de *V. cholerae*. Os autores fizeram ensaios de secreção de TssD *in vitro* e *in vivo*, identificaram e propuseram que a proteína TssH (ClpV) está diretamente relacionada a secreção de TssD. Além de elucidarem a estrutura de TssD por cristalografia de raio-X (MOUGOUS et al., 2006).

O T6SS é uma nanomáquina bacteriana especializada na injeção de proteínas efetoras diretamente no interior de células procariotas ou eucariotas (ALCOFORADO DINIZ; LIU; COULTHURST, 2015). A ação desses efetores está envolvida na competição interbacteriana, na modulação e manipulação de células eucariotas hospedeiras (BERNAL; LLAMAS; FILLOUX, 2018). Os genes do T6SS fazem parte do genoma das bactérias Gram-negativa, principalmente no filo Proteobacteria (BOYER et al., 2009; DAS; CHAUDHURI, 2003).

Boyer et al. (2009) fizeram buscas de bioinformática, com base em dados experimentais de 16 genes conservados em agrupamentos gênicos relacionados ao T6SS (BLADERGROEN; BADELTE; SPAINK, 2003; MOUGOUS et al., 2006; PUKATZKI et al., 2006; SCHELL et al., 2007; SHALOM; SHAW; THOMAS, 2007; SUAREZ et al., 2008; ZHENG; LEUNG, 2007). Eles identificaram que 13 desses genes apresentavam frequência superior a 70% em *loci* de T6SS (BOYER et al., 2009), os quais foram classificados como genes centrais, denominados *tssA*, *tssB*, *tssC*, *tssD*, *tssE*, *tssF*, *tssG*, *tssH*, *tssI*, *tssJ*, *tssK*, *tssL*, *tssM* (SHALOM; SHAW; THOMAS, 2007). Múltiplas cópias completas desses loci estavam presentes em um terço dos genomas que possuem o T6SS. E ainda propuseram cinco subgrupos de T6SS (numerados de 1 a 5) com base no perfil filogenético traçado, recentemente revisado por Bernal et al. (2018), discutidos mais adiante no texto. Os genes centrais do T6SS geralmente estão organizados dentro de um ou dois óperons adjacentes putativos em agrupamentos gênicos que ainda podem conter componentes acessórios (BERNAL; LLAMAS; FILLOUX, 2018; BOYER et al., 2009), chamados de genes tag (do inglês, *Type six secretion associated genes*)(SHALOM; SHAW; THOMAS, 2007).

São conhecidas algumas classes de proteínas efetoras. Os alvos dos efetores podem ser o peptidoglicano da parede celular bacteriana receptora através de amidases do peptidoglicano (Tae1, Tae2, Tae3, Tae4, outras) ou hidrolases glicosídicas do peptidoglicano (Tag1, Tag2, Tag3, outras). A membrana interna da bactéria receptora é alvo de lipases ou fosfolipases (Tle1, Tle2, Tle3, Tle4, outras). São também conhecidas nucleases que agem no citoplasma da célula-alvo (DNase, RNase, outras)(COULTHURST, 2019).

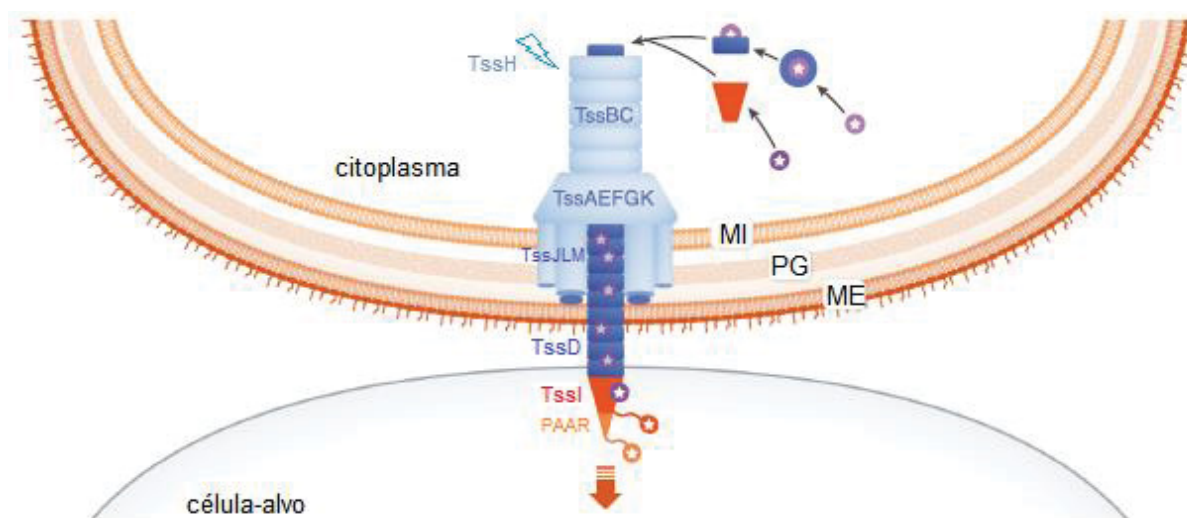
2.2.1 TssH é a fonte de energia primária para o T6SS

Análises *in silico* revelaram que *tssH* está sempre presente nos agrupamentos gênicos homólogos ao T6SS, sendo por isso considerado um componente central do T6SS (BOYER et al., 2009; CASCALES, 2008; DAS; CHAUDHURI, 2003). A proteína TssH, pertence à família de proteínas AAA+ (do inglês, *ATPases associated with various cellular activities*)(SCHLIEKER et al., 2005). Sua atividade de ATPase foi pensada ser a fonte de energia requerida para a translocação de TssD ao ambiente extracelular, tal hipótese foi confirmada através de dois experimentos (MOUGOUS et al., 2006). No primeiro experimento foi analisado o sobrenadante e interior celular das culturas de *P. aeruginosa*. As bactérias com deleção em *tssH*, não apresentaram mudança nos níveis de TssD no interior celular, mas sim, falharam na secreção de TssD. No segundo experimento foi feita a inativação da atividade hidrolítica de TssH por meio da troca de resíduos de aminoácidos análogos no motivo Walker B. A expressão da proteína mutante não foi capaz de complementar a secreção de TssD na bactéria mutante. Alternativamente, TssM pode ser uma fonte secundária de energia para a translocação de proteínas (MOUGOUS et al., 2006; ZHENG; LEUNG, 2007).

Posteriormente, foi esclarecido o mecanismo de secreção no qual TssH é uma fonte de energia primária para o funcionamento do T6SS (BÖNEMANN et al., 2009). Nesse trabalho foi mostrado que o domínio N-terminal de TssH é crucial para a secreção de TssD e TssI (VgrG) em *V. cholerae*. Proteínas com o domínio N-terminal truncado não foram capazes de complementar o fenótipo de secreção de TssD e TssI em mutantes $\Delta tssH$. Segundo os autores, não porque essas proteínas truncadas tivessem perdido sua atividade ATPase, mas sim porque sua porção N-terminal é fundamental para uma ligação proteína-proteína. Em seguida, eles identificaram que o complexo formado por TssB/TssC não somente é o substrato que se liga a porção N-terminal de TssH, mas também, é remodelado por essa proteína de maneira dependente da atividade de ATPase. TssB/TssC foi caracterizada como uma estrutura tubular regular com diâmetro de 300 Å e um canal central de 100 Å. Seu tamanho varia de 500 a 25 nm, e seu peso molecular de 2000 KDa a 80 KDa, respectivamente, quando esse complexo está montado ou desmontado. Isso está diretamente associado a função de TssH que, portanto, é responsável por promover os ciclos de propulsão de efetores.

Outros trabalhos ajudaram a elucidar um modelo geral de secreção do T6SS (Figura 1). Resumidamente, a estrutura que atravessa o envelope celular da bactéria (TssJLM) possui na sua face citosólica uma placa base (TssAEFGK) ancorada na membrana interna, na qual se liga um túbulo contrátil. Ao se contrair, TssBC, dispara uma estrutura de punctura semelhante a uma agulha diretamente no interior da célula-alvo em uma maneira dependente de contato. Um novo ciclo de disparo só pode ser iniciado quando TssH desmonta TssB/TssC (que depois é polimerizada), então, a energia de ATPase de TssH novamente propulsiona a estrutura de agulha (TssD-TssI-Domínio PAAR). TssD é um tubo hexamérico com um canal que transporta proteínas efetoras. Na sua porção mais distal está localizado uma estrutura pontiaguda composta pelo trímero de TssI carregado por uma proteína de domínio PAAR (ALCOFORADO DINIZ; LIU; COULTHURST, 2015; CASCALES, 2008; PUKATZKI et al., 2007).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO T6SS



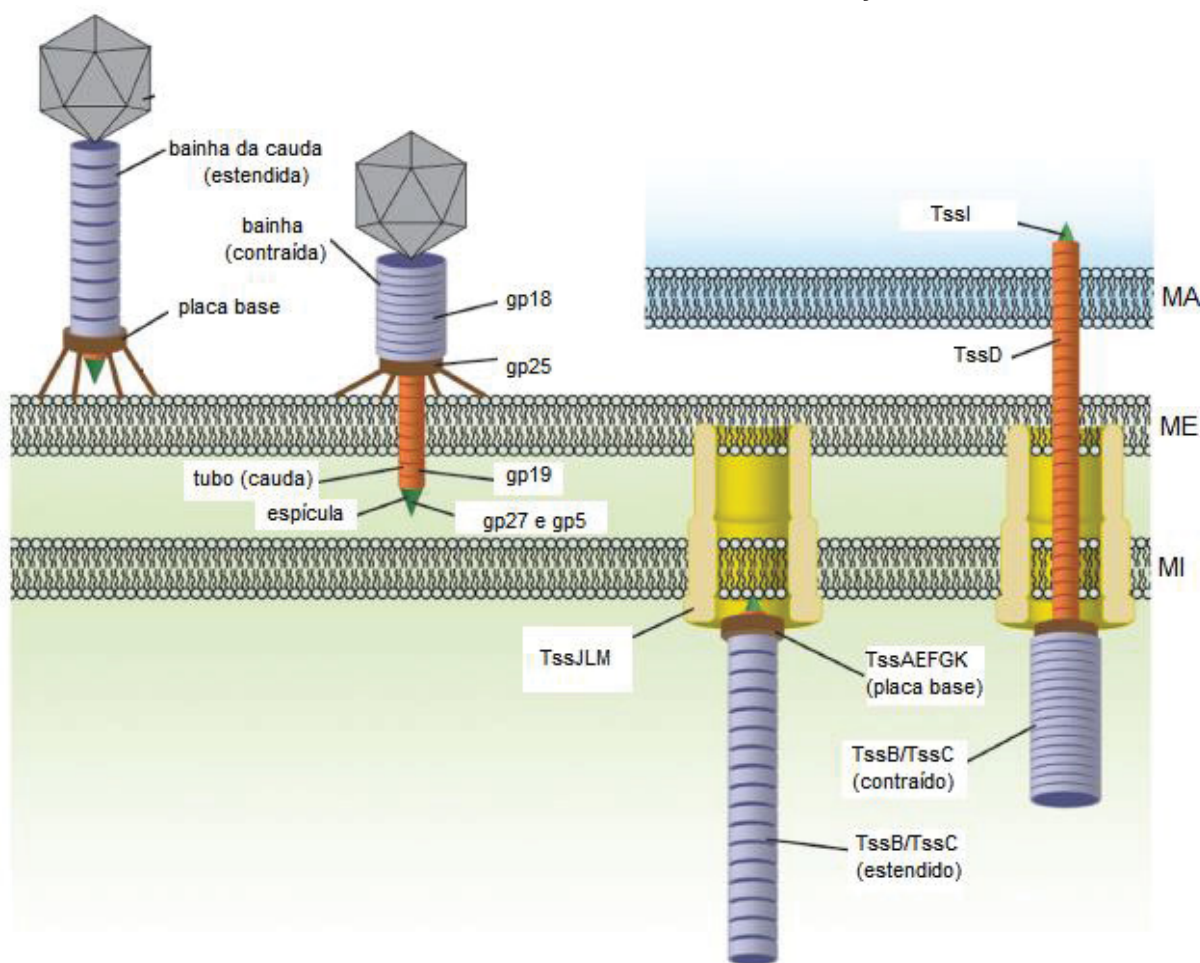
FONTE: Modificada de DINIZ (2015).

NOTA: Estruturas de membrana (TssJLM), placa base (TSSAEFGK), complexo contrátil TssBC (ação da ATPase TssH), proteínas secretadas TssD-TssI-PAAR. MI=membrana interna, ME=membrana externa, PG=peptidoglicano. Mecanismo dependente de contato. Injeção de efetores na célula-alvo.

2.2.2 Componentes centrais: estrutura de membrana e dispositivo de injeção

Os componentes centrais do T6SS podem ser agrupados de acordo com a estrutura e função das suas proteínas. O T6SS é constituído por componentes de membrana e componentes de injeção homólogos ao aparelho de punção dos bacteriófagos (Figura 2).

FIGURA 2 - T6SS BACTERIANO E O DISPOSITIVO DE PUNÇÃO DO FAGO T4



FONTE: Modificado de HO (2014).

NOTA: Estruturas homólogas são coloridas na mesma cor. MI=membrana interna, ME=membrana externa, MA=membrana-alvo.

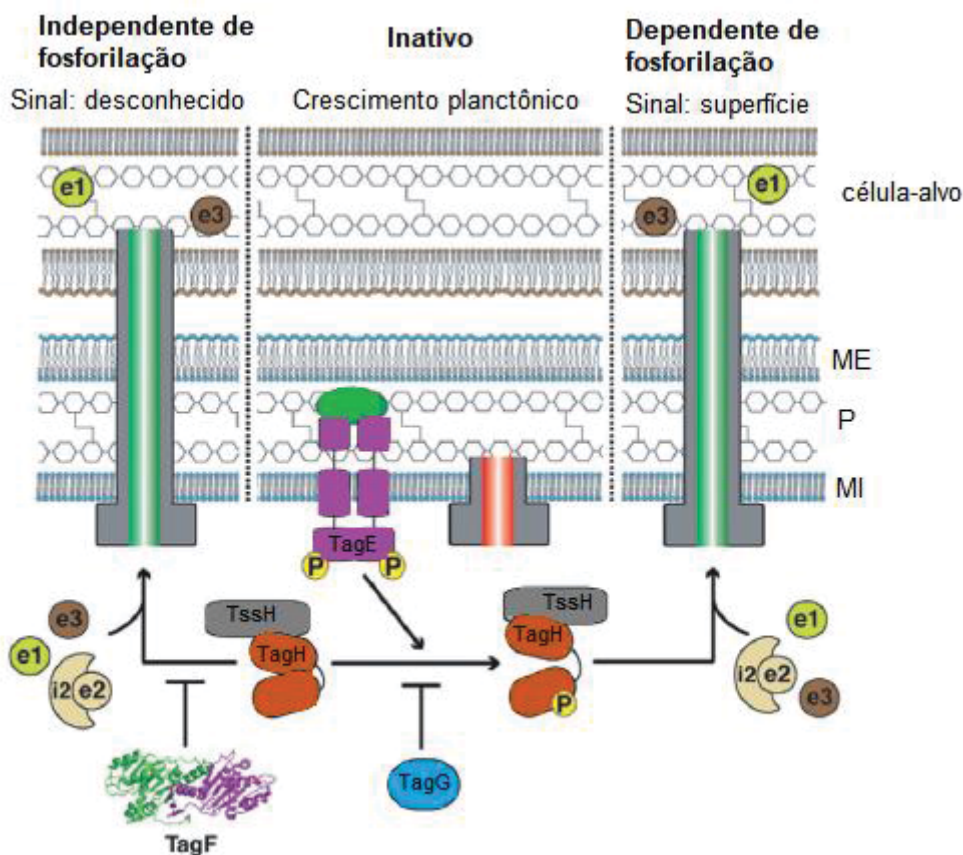
As proteínas TssL e TssM são complexadas em uma estrutura de membrana interna que interage com a lipoproteína de membrana externa TssJ (CHEN et al., 2015). As estruturas relacionadas ao mecanismo de injeção do T6SS apresentam uma origem evolutiva comum ao dispositivo de punção dos bacteriófagos (LEIMAN et al., 2009). É conhecido que TssE apresenta homologia ao componente gp25 da placa base dos fagos T4 (LEIMAN et al., 2009). TssE compõe a placa base TssAEFGK que está acoplada na membrana interna das bactérias, da qual se conhece muito pouco sobre as demais proteínas. Os anéis hexaméricos de TssD (MOUGOUS et al., 2006), e o trímero de TssI (PUKATZKI et al., 2007) como uma ponta de agulha, na região mais distal de TssD, formam uma estrutura injetada pelo T6SS em células-alvo. TssD e TssI são componentes de função dual, isto é, são proteínas estruturais e efetoras do T6SS. TssD apresenta homologia a gp19 que compõe a cauda de T4. Já o domínio

amino-terminal de TssI é similar a duas proteínas (gp5 e gp27) da espícula de T4 (LEIMAN et al., 2009). A secreção de efetores é mediada pelo túbulo regular de TssB/TssC que se contrai e estende a cada novo ciclo de injeção (BÖNEMANN et al., 2009), de maneira similar a bainha da cauda de T4 (LEIMAN et al., 2009), através da atividade hidrolítica de ATP do domínio AAA+ de TssH (BÖNEMANN et al., 2009; MOUGOUS et al., 2006).

2.2.3 A regulação positiva dependente de fosforilação e a regulação negativa dependente de *tagF* no T6SS

Até o momento são conhecidas duas vias de regulação pós-traducional do T6SS. A via dependente de fosforilação (ou TPP, do inglês, *Threonine Phosphorylation Pathway*) e a via independente de fosforilação. Experimentalmente ambas as vias foram confirmadas em *P. aeruginosa* (PUKATZKI et al., 2007; SILVERMAN et al., 2011), *Agrobacterium tumefaciens* (LIN et al., 2014, 2018), *Serratia marcescens* (OSTROWSKI et al., 2018).

Brevemente, na via TPP, as proteínas serina-treonina quinase, TagE, e serina-treonina fosfatase, TagG, atuam de forma antagônica. TagE autofosforilada é responsável por fosforilar a proteína de domínio *forkhead*, TagH (na Thr362) (MOUGOUS et al., 2007), ou a proteína de membrana interna TssL (na Thr14) (LIN et al., 2014). Consequentemente, o T6SS é ativado porque TagH inicia o processo de recrutamento de TssH em *P. aeruginosa*, ou se liga ao complexo de membrana interna TssL, etapa crucial para secreção de TssD em *A. tumefaciens*. A repressão do T6SS na via TPP se dá pela desfosforilação dos fosfopeptídeos por tagG. Em *P. aeruginosa* é conhecido que um dos sinais para a regulação de TPP é o crescimento bacteriano em sistema de superfície, mas não em crescimento planctônico (SILVERMAN et al., 2011) (Figura 3).

FIGURA 3 - REGULAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL DO T6SS EM *P. aeruginosa*

FONTE: Modificada de SILVERMAN (2011).

NOTA: As vias dependente e independente de fosforilação. Proteínas Tag envolvidas na ativação ou repressão do T6SS. Um sinal ambiental é conhecido como estímulo para a regulação dependente de fosforilação. ME=membrana externa, MI=membrana interna, P=periplasma.

Na via independente de fosforilação, a proteína TagF é o repressor do T6SS. Em *A. tumefaciens* esse repressor é uma proteína quimera TagF-TagG, que atua nas duas vias de regulação em questão (LIN et al., 2014, 2018). Nessa bactéria bem como em *P. aeruginosa*, TagF se liga a forma não fosforilada de TagH, e impossibilita que TagH possa ser o substrato para o recrutamento de várias peças elementares na montagem do T6SS (LIN et al., 2018; SILVERMAN et al., 2011). Ainda não são conhecidos os fatores que eventualmente desencadeiam a regulação negativa atribuída a TagF, como a ligação ou desprendimento a TagH. O fato é que TagH é uma proteína *scaffold*, um elemento central em ambas as vias, sendo fundamental para o funcionamento do T6SS.

A regulação do T6SS também ocorre a nível transcricional por mecanismos pouco conhecidos. Em *P. aeruginosa* (CHEN et al., 2015), os três agrupamentos homólogos ao T6SS (HSI-I, HSI-II e HSI-III) são regulados a nível transcricional pelo regulador de *quorum sensing* LasR. E HSI-I é negativamente regulado por MvfR e LasR, enquanto a expressão dos genes de HSI-II e HSI-III são positivamente reguladas por MvfR e LasR.

2.3 O T6SS EM BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS

Inicialmente o T6SS foi caracterizado no patógeno ambiental *Vibrio cholerae* através de ensaio de citotoxicidade com células eucariotas de *Dictyostelium* spp., no qual mutações em genes do T6SS aboliram o fenótipo citotóxico de *V. cholerae* (MOUGOUS et al., 2006). Em seguida, uma série de publicações vieram esclarecer o papel do T6SS em patógenos oportunista como *Pseudomonas aeruginosa* (PUKATZKI et al., 2006), *Burkholderia mallei* (SCHELL et al., 2007), *Burkholderia pseudomallei* (SHALOM; SHAW; THOMAS, 2007). Posteriormente, foi notado um aumento no número de trabalhos que demonstravam a relação de T6SS em competição bacteriana (HOOD et al., 2010; MACINTYRE et al., 2010; RUSSELL et al., 2014), ou uma ação de virulência a células eucariotas (DECOIN et al., 2014; SCHWARZ et al., 2010). Contudo, a atividade antibacteriana parece ser uma das principais armas moleculares atrelada ao T6SS.

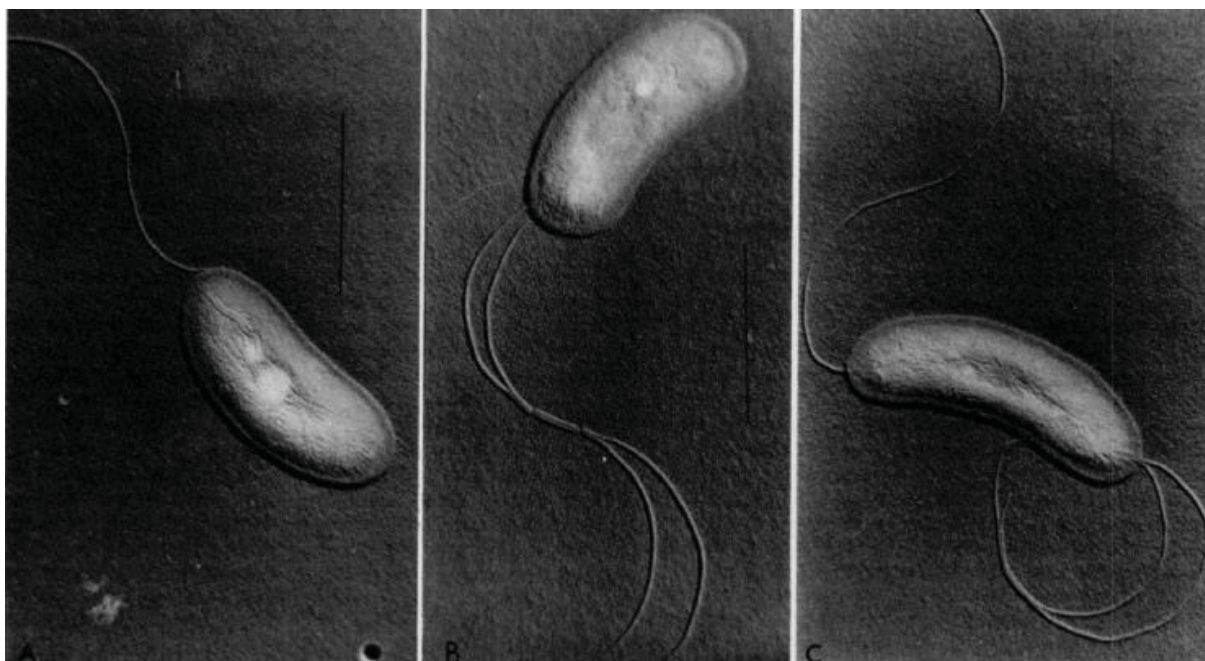
Paralelamente, análises de bioinformática revelavam que o T6SS não é particular de bactérias patogênicas, mas também está distribuído no genoma de bactérias do solo, fitopatógenos, simbiontes associados a plantas (BOYER et al., 2009). Recentemente, Bernal et al. (2018) fizeram análise *in silico* de 143 genomas, dos quais, 80 genomas de fitopatógenos, 63 genomas de bactérias benéficas a plantas. Eles encontraram um total de 170 agrupamentos gênicos de T6SS em 104 estirpes. Cerca de 90% dessas estirpes possuem dois T6SS, embora algumas tenham até cinco. Aproximadamente 87% das estirpes estão nos grupos 1, 3 ou 4 (BOYER et al., 2009). E normalmente as estirpes que possuem mais de um T6SS contêm agrupamentos de mais de um clado filogenético, sugerindo que a aquisição de T6SS ocorreu principalmente por transferência horizontal de genes. E ainda, a evolução do T6SS é independente de um nicho ou hospedeiro específico (BERNAL; LLAMAS; FILLoux, 2018).

Ainda é bem limitado o número de estudos sobre o T6SS em bactérias associadas a plantas, fitopatógenos ou simbiontes. Até o momento, um único trabalho de Shyntum et al. (2015), mostrou que o T6SS de fitopatógenos pode estar associado à virulência do hospedeiro vegetal, além de estar envolvido com atividade antibacteriana. A deleção do T6SS-1 de *Pantoea ananatis* reduziu a 10% o percentual de folhas mortas de cebolas infectadas 3 dias antes com a bactéria, enquanto o percentual de 90% foi observado para a estirpe selvagem. Além disso, o número de colônias sobreviventes foi reduzido em ensaio de competição interespecífico quando deletado o T6SS-3 de *P. ananatis* (SHYNTUM et al., 2015). Contudo, os demais estudos têm mostrado que o T6SS tem função primária de competição bacteriana também em patógenos (HAAPALAINEN et al., 2012; MA et al., 2014) e simbiontes (BERNAL et al., 2017) de plantas. Nesse último caso, o T6SS de *Pseudomonas putida* atua como uma arma de defesa na proteção da planta contra fitopatógenos.

2.4 *Herbaspirillum seropedicae*

H. seropedicae é uma beta-Proteobacteria caracterizada como uma célula gram-negativa, vibrióide, às vezes helicoidal, possui de um a três flagelos polares (Figura 4). O diâmetro celular varia de 0,6 μm a 0,7 μm , e o comprimento da célula varia com o meio de 1,5 a 5 μm (BALDANI et al., 1986).

FIGURA 4 - MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE *H. seropedicae*



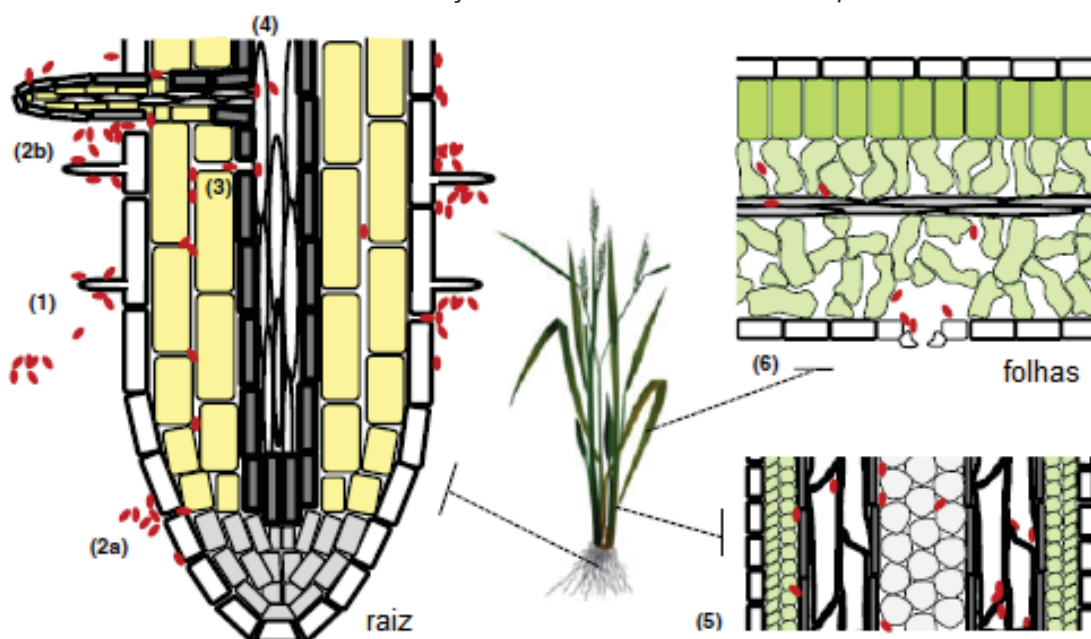
FONTE: BALDANI (1986).

NOTA: (A) um, (B) dois, e (C) três flagelos polares.

Esta bactéria foi isolada de raízes de várias gramíneas, mas não de solo não cultivado (BALDANI et al., 1992). *H. seropedicae* é uma espécie diazotrófica que coloniza endofiticamente os tecidos de várias culturas de interesse econômico da família Poaceae, como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), *Miscanthus* (MONTEIRO et al., 2012; OLIVARES et al., 1996).

A associação de *H. seropedicae* com plantas provavelmente se inicia pela atração da bactéria em direção a fonte de carbono exsudada pelas raízes das plantas, seguida da ligação desta bactéria à superfície das raízes e a subsequente colonização dos tecidos internos das células vegetais através de pontos de emergência das raízes laterais. Então ocorre uma rápida colonização de espaços intercelulares da raiz, bem como, de aerênquima, xilema e, finalmente, partes aéreas (JAMES et al., 1997; MONTEIRO et al., 2012; RONCATO-MACCARI et al., 2003). A ligação das células de *H. seropedicae* a raízes de milho (Figura 5) foi observada 30 minutos após inoculação das bactérias. Após 24 horas de colonização as células foram visíveis nos tecidos internos, e três dias após inoculação, no cilindro central e xilema das raízes de milho (MONTEIRO et al., 2008).

Pedrosa et al. (2011) sequenciaram o genoma de *H. seropedicae* SmR1. A estirpe *H. seropedicae* SmR1 é um mutante espontâneo da estirpe selvagem *H. seropedicae* Z78 que apresenta resistência a estreptomicina. No genoma desta bactéria foi identificado ao menos dois agrupamentos gênicos homólogos ao T6SS, que estão sob análise neste trabalho.

FIGURA 5 - COLONIZAÇÃO DE PLANTAS POR *H. seropedicae*

FONTE: Modificada de MONTEIRO (2012).

NOTA: 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 pelo radicular (1). A maioria das bactérias permanece nas superfícies radiculares, mas algumas bactérias 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.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral determinar se o sistema de secreção do tipo VI (T6SS) de *Herbaspirillum seropedicae* está envolvido na interação desta bactéria com raízes de plantas. Para alcançar esse objetivo e outros fins de caracterização fenotípica foram construídas estirpes mutantes de *H. seropedicae* em genes que codificam para os dois T6SS.

Objetivos específicos:

1. Obtenção de estirpes mutantes nos genes Hsero_0736, Hsero_0737, Hsero_0738, Hsero_0743, Hsero_0747, Hsero_0748, Hsero_0757, Hsero_4028, Hsero_4031, Hsero_4035, Hsero_4040, Hsero_4041 que estão regulados durante a interação de *H. seropedicae* com raízes de milho (BALSANELLI et al., 2016).
2. Determinação do padrão de colonização epifítica e endofítica de raízes de milho das estirpes selvagem SmR1 e mutantes construídas de *H. seropedicae*.
3. Determinação de atividade antibacteriana das estirpes SmR1 e mutantes construídas de *H. seropedicae*.
4. Determinação da capacidade de formação de biofilme das estirpes mutantes construídas de *H. seropedicae*.
5. Determinação de motilidade das estirpes mutantes construídas de *H. seropedicae*.

4 JUSTIFICATIVA

H. seropedicae é uma bactéria diazotrófica, promotora do crescimento vegetal, que coloniza cultivos agrícolas de importância econômica, como milho, arroz, trigo entre outros. Sua utilização como biofertilizante é uma alternativa para aumentar a produtividade vegetal e diminuir o impacto que os fertilizantes nitrogenados causam no meio ambiente. Este trabalho busca ampliar nossa visão sobre o uso dessas bactérias no solo, levando em consideração que a rizosfera é um ambiente onde diferentes espécies bacterianas competem entre si para colonizar as raízes dos vegetais. Publicações recentes indicam que bactérias associadas de maneira benéficas com plantas, secretam proteínas efetoras através do T6SS, mas não se conhece ainda o papel dessas proteínas na interação planta-bactéria. Além de estar envolvido no processo de colonização, o T6SS pode ainda ser usado como arma de defesa de populações estabelecidas contra possíveis invasores no vegetal. É necessário, portanto, que as relações ecológicas de competição sejam estudadas como uma etapa importante para utilização de bactérias em cultivos agrícolas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 BACTÉRIAS

As estirpes bacterianas usadas estão listadas na Tabela 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS ESTIRPES BACTERIANAS

| Estirpe | Características ¹ | Referência |
|--|---|--------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> Top10 | F ⁻ mcrA Δ(mcrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara,leu) 7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG λ ⁻ | INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA) |
| <i>E. coli</i> S17.1 | recA, hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 | (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983) |
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 | Variante espontâneo da estirpe tipo Z78 Sm ^r , Nif ⁺ , isolada de raízes de sorgo | (KLASSEN et al., 1997) |
| <i>H. seropedicae</i> SmR1tagF1 | <i>H. seropedicae</i> SmR1 tagF1 Sm ^r , Km ^r | Este trabalho |
| <i>H. seropedicae</i> SmR1tssH2 | <i>H. seropedicae</i> SmR1 tssH2 Sm ^r , Km ^r | Este trabalho |

NOTA: Características¹. Sm= estreptomicina; Km= canamicina; sobrescrito r= resistente.

5.2 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos usados estão listados na Tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS

(continua)

| Plasmídeos | Características ¹ | Referência |
|-----------------------|--|-----------------------------------|
| pGEM-T | Ap ^r | PROMEGA (Madison, WI, EUA) |
| pSUP202 | Ap ^r ; Tc ^r ; Cm ^r ; mob site | (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983) |
| pGEM-T- Hsero_0736 | Contém o gene <i>tssI1</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM-T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pGEM-T- Hsero_0737 | Contém o gene <i>tssL1</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM-T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pGEM-T- Hsero_0743 | Contém o gene <i>tssD1</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM-T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pGEM-T- Hsero_0757 | Contém o gene <i>tagF1</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM- T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pGEM-T- Hsero_4028 | Contém o gene <i>tagF2</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM-T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pGEM-T- Hsero_4031 | Contém o gene <i>tssH2</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM-T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS

(conclusão)

| Plasmídeos | Características ¹ | Referência |
|--------------------|--|---------------|
| pGEM-T-Hsero_4035 | Contém o gene <i>tssD2</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM-T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pGEM-T-Hsero_4040 | Contém o gene <i>tssK2</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM-T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pGEM-T-Hsero_4041 | Contém o gene <i>tssL2</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pGEM-T, Ap ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pSUP202-Hsero_0757 | Contém o gene <i>tagF1</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pSUP202, Cm ^r , Km ^r | Este trabalho |
| pSUP202-Hsero_4031 | Contém o gene <i>tssH2</i> de <i>H. seropedicae</i> interrompido pelo cassete Ez-Tn5 em pSUP202, Cm ^r , Km ^r | Este trabalho |

NOTA: Características¹. Ap= ampicilina; Cm= cloranfenicol; Tc= tetraciclina; sobrescrito r= resistente

5.3 CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram crescidas em meio líquido NFbHPN Malato (Tabela 3), a 30°C, sob agitação constante de 120 rpm, por 12 a 24 horas. O preparo do meio sólido foi feito com a adição de 15 g/L de ágar. O preparo do meio semi-sólido foi feito com 3 g/L ou 1,75 g/L de ágar.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFbHPN Malato

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

As estirpes de *E. coli* foram crescidas em meio líquido Luria-Bertani (LB) (Tabela 4), a 37°C, sob agitação constante de 160 rpm. Ou em meio sólido contendo 15 g/L de ágar.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LB

| | |
|---------------------|--------|
| Triptona | 10 g/L |
| Extrato de levedura | 5 g/L |
| NaCl | 10 g/L |

5.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram usados nos cultivos de acordo com a Tabela 5.

TABELA 5 - ANTIBIÓTICOS USADOS NOS CULTIVOS

| Antibiótico | Concentração final para culturas de <i>H. seropedicae</i> | Concentração final para culturas de <i>E. coli</i> |
|----------------|---|--|
| Ampicilina | - | 250 µg/L |
| Estreptomicina | 80 µg/L | 80 µg/L |
| Canamicina | 500 µg/L | 100 µg/L |
| Tetraciclina | 10 µg/L | 10 µg/L |
| Cloranfenicol | 60 µg/L | 30 µg/L |

5.5 MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

As estirpes de *H. seropedicae* foram estocadas em frascos de vidro com meio semi-sólido NFbHPN Malato a temperatura ambiente e repicadas a cada 3 meses. As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% mantidas a -20°C e repicadas uma vez ao ano.

5.6 ESTUDO *in silico* DOS GENES DO T6SS EM *H. seropedicae*

Foram feitas buscas no programa PSI-Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para análise do genoma de *H. seropedicae* SmR1 (CP002039-1). Essas buscas encontraram ORFs com alta similaridade aos genes possivelmente relacionados ao T6SS de outras bactérias, assim como, identificou a região genômica e organização dos genes em *H. seropedicae*. Eventualmente foram feitas buscas complementares de ortologia e paralogia de genes no KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (<https://www.genome.jp/kegg/>).

5.7 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

5.7.1 Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* Top10 foi realizada de acordo com o método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), com algumas alterações. Brevemente, foi coletado 1 mL de cultura de *E. coli* Top10 contendo o plasmídeo de interesse em tubo Eppendorf. Foi feita uma centrifugação por 60 s a 12.000 x g. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* de células foi ressuspendido em 150 µl de tampão GET (glucose 50 mM, EDTA 1 mM, Tris 25 mM pH 8), 1 µl de RNase, em agitação em vórtex por cerca de 1 min. Depois, foi adicionado 150 µl de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,2 M) e misturado por inversão

cuidadosamente. Então, a lise foi interrompida pela adição de 150 µL de solução de acetato de sódio 3 M (pH 4,8 ajustado com ácido acético) e misturado por inversão cuidadosamente. Em seguida, essa mistura foi incubada em gelo por 5 min. Foi adicionado 150 µl de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para precipitação de resíduos de proteínas. Após centrifugação por 5 min a 12.000 x g, o DNA plasmidial do sobrenadante (cerca de 200 µl) foi transferido para novos tubos Eppendorf, onde foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto, feita a homogeneização por inversão e refrigeração a -20°C por 20 min para precipitação do DNA plasmidial. Após centrifugação por 5 min a 12.000 x g, o sobrenadante foi descartado, o pélete foi ressuscitado por agitação em vórtex com 1 mL de etanol 70%. Após nova centrifugação por 5 min a 12.000 x g, o sobrenadante foi descartado, e o DNA foi seco à vácuo e ressuscitado em 30 µL de água Milli-Q estéril.

5.7.2 Eletroforese de DNA

As amostras de DNA foram diluídas em tampão Fsuds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, Ficoll ® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,025) para serem depois aplicadas em gel de agarose 1% submerso em tampão TAE (Tris base 40 mmol/L, ácido acético 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,0) em sistema horizontal da HOEFFER. A eletroforese foi feita com voltagem e tempo de corrida variando de acordo com a amostra (frequentemente entre 60V e 75V por 1h a 1h e 30 min). Após a eletroforese, o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 µg/mL) por cerca de 15 minutos. Para a análise do DNA, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta 320 nm em transluminador por meio do sistema UVP.

5.7.3 Digestão de DNA por enzima de restrição

A digestão de DNA por enzimas de restrição foi feita de acordo com a recomendação dos fabricantes (FERMENTAS ou INVITROGEN). Sistemas de 20 µL ou 10 µL foram feitos para a confirmação de tamanho dos fragmentos de DNA. Então, a clivagem foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1X).

5.7.4 Ligação de fragmentos de DNA aos vetores

Para ligação de inserto de DNA de interesse em vetor foi obedecida uma razão molar de aproximadamente 1:7 mol (vetor:inserto) em um sistema de 10 µL, mais adição de T4 DNA ligase (Thermo Scientific) e tampão de ligação (10x). A reação de

ligação foi incubada a 16°C durante a noite. O produto da reação de ligação foi transformado em *E. coli* Top 10.

5.7.5 Amplificação de DNA

Através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita a amplificação do gene 16S rRNA para confirmar espécie bacteriana. Para o volume final de 20 µL foram usados 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 10 pmol dos *primers* Y1 e Y3 (Tabela 6), uma unidade de GoTaq DNA polimerase (Promega), cerca de 20 ng de DNA gênomico das estirpes de interesse. Os parâmetros da PCR: ciclo inicial de 95°C por 5 min; 30 ciclos com três etapas - 95°C por 30 s, 60°C por 45 s, 72°C por 1 min e 30 s; e ciclo final de 72°C por 3 min.

TABELA 6 - SEQUÊNCIAS DE PRIMERS

(continua)

| <i>Primer</i> | Sequência |
|----------------|----------------------------------|
| Y1 | 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3' |
| Y3 | 5'-CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3' |
| Hsero_0736 (F) | 5'-CGACCTCGACCTGAAACAG-3' |
| Hsero_0736 (R) | 5'-TACCCACTGGTTGAATCCGC-3' |
| Hsero_0737 (F) | 5'-CTTCCCGTCCTCCTCTCCAT-3' |
| Hsero_0737 (R) | 5'-AAGCCCAGGTAGGCAAACAG-3' |
| Hsero_0738 (F) | 5'-CCTGCATCCCTATTGCTGGG-3' |
| Hsero_0738 (R) | 5'-TATGACGGCTTGGTCTCGTT-3' |
| Hsero_0743 (F) | 5'-GACGGTATCAAGGGCGAATC-3' |
| Hsero_0743 (R) | 5'-GTACTTCAGGCCGACGGTT-3' |
| Hsero_0747 (F) | 5'-TCTGGAACACGAGATCAGCC-3' |
| Hsero_0747 (R) | 5'-TGATGCTCCTTCAACTGGGC-3' |

TABELA 6 - SEQUÊNCIAS DE *PRIMERS*

(conclusão)

| <i>Primer</i> | Sequência |
|----------------|-----------------------------|
| Hsero_0748 (F) | 5'-CCAGATTGGCCCGAGATGTT-3' |
| Hsero_0748 (R) | 5'-TGTTGACCATCGAACCCCTGG-3' |
| Hsero_0757 (F) | 5'-GCTACTTCGGCAAGATCCCC-3' |
| Hsero_0757 (R) | 5'-AGGCGTGATCAGGTTTCATCC-3' |
| Hsero_4028 (F) | 5'-CAGCTCGGGGAGACTTCATC-3' |
| Hsero_4028 (R) | 5'-AGAAGCCGAGGAACATGCAA-3' |
| Hsero_4031 (F) | 5'-CACTACGCAGCTAACGCAAC-3' |
| Hsero_4031 (R) | 5'-CCAGATTGGCCCGAGATGTT-3' |
| Hsero_4035 (F) | 5'-GGATCGAATGCAAGACCGTTG-3' |
| Hsero_4035 (R) | 5'-CAAGTCCCAACCACCCGAAG-3' |
| Hsero_4040 (F) | 5'-ACACGCTACGCATCTTGAA-3' |
| Hsero_4040 (R) | 5'-AGCGCAATGGAACAACATCG-3' |
| Hsero_4041 (F) | 5'-CGACTCCTCTTCAGATGCCG-3' |
| Hsero_4041 (R) | 5'-CAGCGAGATCACCACCCAAA-3' |

NOTA: *temperature melting* (T_m) é de 60°C para todos os *primers* exceto Y1 e Y3 (62°C). Os *primers* foram desenhados por meio do programa Primer-Blast (NCBI).

A amplificação dos genes do T6SS de *H. seropedicae* foi feita com 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 10 pmol dos *primers* direto (F) e reverso (R) (Tabela 6), uma unidade de GoTaq DNA polimerase (Promega), cerca de 20 ng de DNA gênomico da estirpe selvagem ou colônia de bactéria, em um volume final de reação de PCR de 20 µL. Os parâmetros da PCR: ciclo inicial de 95°C por 5 min; 30 ciclos com três etapas - 95°C por 30 s, 60°C por 45 s, 72°C (1 min/kb); e ciclo final de 72°C por 3 min.

5.7.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de fragmentos de DNA de interesse foi feito pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1997), usando os *primers* dos genes do T6SS ou Y1 e Y3 (16S rRNA) (Tabela 6). As reações de sequenciamento (10 μ L) continham 200-400 ng de DNA, 2 μ L de pré-mix (ET terminator), 5 pmol de *primer* e água Milli-Q estéril. Os parâmetros da reação de sequenciamento: primeiro ciclo de 96°C por 1 min; 30 ciclos com três etapas - 96°C por 1 min, 60°C por 15 s, 60°C por 4 min.

Os amplicons foram purificados por precipitação com acetato de amônio 200 mM e dois volumes de etanol absoluto, deixados em banho de gelo por 30 min. Depois de uma centrifugação de 30 min a 12.000 x g, foi feita uma lavagem com 100 μ L de etanol 70%, por fim as amostras foram secas a vácuo. O sequenciamento de bases foi realizado no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 (Amersham Bioscience).

5.8 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* POR ELETROPORAÇÃO

5.8.1 Preparação de células competentes

O preparo das células competentes de *E. coli* se iniciou com o cultivo em meio LB com agitação constante de 120 rpm por cerca de 16 horas durante a noite. Após, foi feito ré-inóculo de 1 mL da cultura em 100 mL de meio LB. A bactéria foi cultivada até densidade óptica (DO_{620nm}) entre 0,3 e 0,4, quando o cultivo foi dividido em dois tubos de 50 mL para centrifugação por 10 min a 4.000 rpm a 4°C em uma centrífuga Eppendorf (modelo 5810R). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pélete de bactérias ressuspendido em 10 mL de solução $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1 M gelada e estéril com volume completado para 20 mL de H_2O Milli-Q estéril. Então, as células foram incubadas em banho de gelo por 1 h. As bactérias foram novamente centrifugadas (10 min, 4.000 rpm a 4°C) e o sobrenadante descartado. De novo, as bactérias foram ressuspendidas, em 2 mL de solução 100 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ com 20% (v/v) de glicerol gelado e estéril. As bactérias competentes foram transferidas em alíquotas de 100 μ L para tubos Eppendorf onde foram estocadas a -80°C.

5.8.2 Transformação bacteriana

A transformação bacteriana do DNA plasmidial foi feita a partir da adição de 10 μL (reação de ligação) ou 2 μL (DNA plasmidial extraído) em 100 μL de células competentes, mantida em banho de gelo por 10 min. Depois submetida ao choque térmico por 45 segundos a 42°C em banho de água aquecida seguido imediatamente de banho de gelo por 5 minutos. Para a recuperação das células foi adicionado 900 μL de meio SOC ou LB e incubação por 37°C durante 1 hora. Posteriormente, 200 μL da suspensão celular foram semeados em placas de LB ágar contendo os antibióticos apropriados.

5.9 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* S17.1 tra+ (doadora; contendo plasmídeos recombinantes de interesse) foram cultivadas durante a noite nos meios NFbHPN Malato e LB, respectivamente, contendo os antibióticos adequados para a seleção. Depois, foi feito re-inóculo das estirpes, em meio de cultivo sem antibiótico. Um volume de 75 μL da cultura de *H. seropedicae* SmR1 foi inoculada em 2,5mL de NFbHPN Malato e mantido por 6 horas a 30°C e agitação constante de 120 rpm. Um volume de 25 μL de cultura de *E. coli* S17. foi inoculado em 2 mL de meio LB por 3 horas, a 37°C sob agitação constante de 120 rpm. Posteriormente foram feitas misturas das estirpes receptora e doadora em duas proporções diferentes: em um tubo foram misturados 50 μL da cultura de *H. seropedicae* com 5 μL da cultura de *E. coli*, e em outro 100 μL da cultura de *H. seropedicae* com 2 μL da cultura de *E. coli*. Uma gota (~15 μL) da suspensão das duas misturas foram colocadas em regiões opostas em placa (3:1, NFbHPN Malato:LB) e incubadas a 30°C durante a noite. Então, a gota crescida de células foi raspada, ressuspensa em 1 mL de NFbHPN Malato líquido. Após, 250 μL foram plaqueados em meio NFbHPN Malato sólido contendo os antibióticos adequados.

5.10 OBTENÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*

Os genes *tagF1* e *tssH2* de *H. seropedicae* foram amplificados a partir do DNA genômico da estirpe selvagem SmR1 e clonados no vetor pGEM-T. O cassete de resistência à canamicina EzTn5 (Lucigen) de 1221 pb foi inserido aleatoriamente nos genes clonados de acordo com o protocolo do fabricante. Depois da confirmação dos clones positivos por sequenciamento do DNA e digestão por enzimas de restrição, os genes nocauteados foram transferidos para o vetor pSUP202. Então, as construções

foram transformadas em *E. coli* S17.1, e os transformantes conjugados com a estirpe selvagem *H. seropedicae* SmR1. Os mutantes que sofreram recombinação homóloga dupla foram obtidos por seleção a canamicina, e nomeados SmR1*tagF1* (*tagF1*) e SmR1*tssH2* (*tssH2*). Foi feito o sequenciamento do gene 16S rRNA para confirmar a espécie bacteriana. A inserção do cassete no genoma foi confirmada por PCR.

5.11 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANA

A curva de crescimento bacteriana das estirpes SmR1, SmR1*tagF1*, SmR1*tssH2* foi determinada pela leitura de absorbância (DO_{600nm}). Primeiramente, as bactérias foram crescidas a partir de inóculo de colônias em meio NFbHPN Malato líquido com antibióticos adequados a 30°C, e 120 rpm, durante a noite. Depois, as células foram re-inoculadas em meio líquido na concentração 1:10 com antibióticos adequados mantidas a 30°C, 120 rpm, por cerca de 6 horas, até a saturação do meio. Em seguida, essas culturas foram diluídas 1:100 em placa de 96 poços, nos poços mais centrais da placa, com a borda preenchida com água para evitar a evaporação das culturas. Essa placa foi utilizada para leitura de absorbância no leitor de microplacas Tecan (LifeSciences) por cerca de 23 horas. As configurações usadas no equipamento: temperatura (29,5°C-30,5°C); cinética – duração do *shaking* orbital (10s), amplitude do *shaking* orbital (3 mm); absorbância - duração do *shaking* orbital (600 s), amplitude do *shaking* orbital (1 mm); absorbância (comprimento de onda 600_{nm}); tempo total de cinética (23 horas); tempo de intervalo da cinética (10 min). Os resultados foram plotados em gráfico de densidade óptica (DO_{600nm}) em função do tempo. Aos pontos correspondentes da fase exponencial de crescimento foram aplicados a função Ln para a linearização da curva de crescimento e para se obter a equação da reta:

$$y = a x + b$$

onde:

$y = \text{Ln}(DO_{600nm})$ em função do tempo

$a =$ coeficiente angular, corresponde a taxa de crescimento bacteriana (μ)

$x =$ tempo (horas)

$b = \text{Ln}(DO_{600nm})$, no tempo 0

A determinação do tempo de duplicação (t_d) foi calculada pela equação:

$$t_d = \ln(2) / \mu$$

5.12 ENSAIOS *in planta*

5.12.1 Desinfecção da superfície de sementes de milho

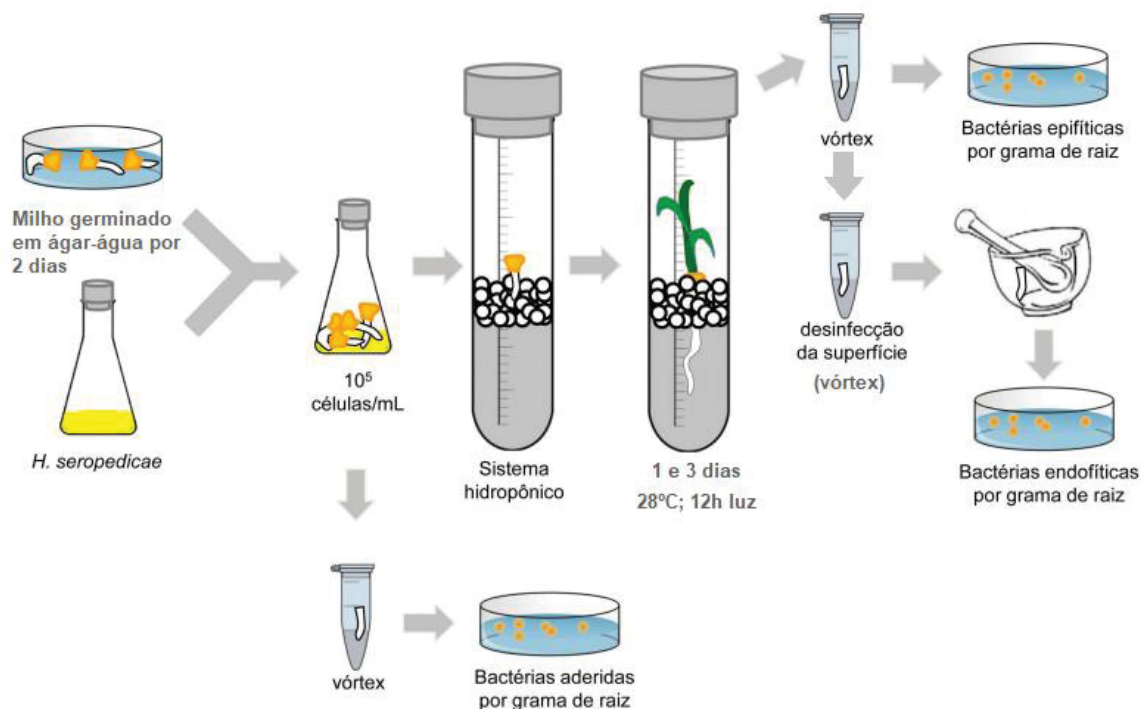
Primeiramente as sementes de *Zea mays* “30A37” foram lavadas com etanol 70% (v/v) com eventuais agitações por 5 minutos para remoção de microrganismos e antifúngico. As sementes foram lavadas uma vez com H₂O Milli-Q estéril. Em seguida, a esterilização se deu pela lavagem com solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) e Tween20 0,04% (v/v) por 20 minutos com eventuais agitações. Posteriormente, as sementes foram lavadas quatro vezes com água Milli-Q estéril.

5.12.2 Inoculação das estirpes de *H. seropedicae* em cultivo de milho em sistema hidropônico

Após a etapa de desinfecção, as sementes foram pré-germinadas em placas contendo ágar-água (0,8%) que foram cobertas em papel-alumínio e mantidas a 30°C por dois dias para germinação. As plântulas foram inoculadas por imersão em suspensão de bactérias na concentração de 10⁵ células das estirpes selvagem SmR1, mutantes SmR1tagF1 e SmR1tssH2 de *H. seropedicae*, por 30 min a 30°C. Em seguida, plântulas foram lavadas duas vezes em solução salina estéril (NaCl 0,9%) por 3 minutos. Então, as sementes de milho foram transferidas para tubos de ensaio contendo 30 mL de meio para gramíneas, sem fonte de carbono (*Plant Medium*), aproximadamente 10 g de esferas de polipropileno para sustentação das plantas em crescimento, e proteção da área das raízes de incidência de luz com papel kraft. As plantas foram crescidas a 28°C com período de luz de 12h e 1250 lux (Figura 6).

5.12.3 Ensaios de adesão das estirpes de *H. seropedicae* às raízes de milho

Imediatamente após a inoculação foram cortadas cerca de 0,05 g de peso fresco de raiz em tubos Eppendorf, pesados previamente, e pós-corte para a obtenção do peso úmido das raízes. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) para agitação vigorosa em vórtex por 40 segundos (Figura 6). O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas por grama fresca de raiz de milho através de diluição seriada e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em meio NFbHPN Malato sólido.

FIGURA 6 - ESQUEMA DO ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DE MILHO POR *H. seropedicae*

FONTE: Modificada de BALSANELLI (2013).

Ensaio de competição das estirpes selvagem e mutantes, na proporção de 1:1 com um total de 10^5 bactérias por plântula, para adesão às raízes de milho foram realizados. O tratamento das raízes, diluição seriada e contagem de UFC foram realizados como descrito acima (Figura 6), sendo que UFC das estirpes mutantes foram identificadas por resistência a canamicina.

5.12.4 Ensaio de colonização epifítica das raízes de milho pelas estirpes de *H. seropedicae*

A determinação do número de bactérias epifíticas de raiz foi feita 1 e 3 dias após inoculação. As raízes foram lavadas duas vezes por imersão em solução salina estéril (NaCl 0,9%), cortadas em tubos Eppendorf previamente pesados, para pesagem e determinação do peso úmido de raiz. Foi adicionado 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e feita agitação vigorosa em vortex por 40 segundos. O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias epifíticas por grama fresca de raiz de milho através de diluição seriada e contagem de UFC em meio NFbHPN Malato sólido (Figura 6).

Ensaio de competição das estirpes selvagem e mutantes na proporção de 1:1 com um total de 10^5 bactérias por plântula, para determinação do número de

bactérias epifíticas de raiz foram realizados 1 e 3 dias após inoculação. O tratamento das raízes, diluição seriada e contagem de UFC foram realizados como descrito acima (Figura 6). sendo que UFC das estirpes mutantes foram identificadas por resistência a canamicina.

5.12.5 Ensaio de colonização endofítica das raízes de milho pelas estirpes de *H. seropedicae*

A determinação do número de bactérias endofíticas foi feita 1 e 3 dias após inoculação. As raízes usadas no ensaio epifítico tiveram sua superfície desinfectada por uma lavagem de 40 segundos em etanol 70% (v/v), seguida de três lavagens com água Milli-Q estéril. Então, foi adicionado 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) às raízes, que foram maceradas em graau estéril. Os extratos foram utilizados para determinar o número de bactérias endofíticas colonizando os tecidos radiculares internos de milho através de diluição seriada e contagem de UFC em meio NFbMalato sólido (Figura 6).

Ensaio de competição das estirpes selvagem e mutantes na proporção de 1:1 com um total de 10^5 bactérias por plântula, para determinação do número de bactérias endofíticas de raiz foram realizados 1 e 3 dias após inoculação. O tratamento das raízes, desinfecção, diluição seriada e contagem de UFC foram realizados como descrito acima (Figura 6), sendo que UFC das estirpes mutantes foram identificadas por resistência a canamicina.

5.13 CO-CRESCIMENTO BACTERIANO EM MEIO LÍQUIDO

A cultura crescida da estirpe selvagem SmR1 foi misturada (1:1) a cultura crescida das estirpes mutantes SmR1*tagF1* ou SmR1*tssH2* para a concentração de 10^5 células. A mistura dessas bactérias foi colocada em 2×10^{-1} mL em placas de 96 poços, sem agitação, a temperatura de 30°C para avaliação de atividade antibacteriana nos tempos 1h, 3h, 6h e 24h. Em cada período, foi feita diluição seriada e aplicação de microgotas em meio NFbHPN Malato sólido para contagem de UFC, sendo as estirpes mutantes selecionadas em placas contendo canamicina.

5.14 FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MICROPLACA

As culturas crescidas das estirpes selvagem SmR1, mutantes SmR1*tagF1* e SmR1*tssH2* foram diluídas em meio líquido NFbHPN Malato a uma concentração de 10^6 células. Separadamente, 2×10^{-1} mL dessas bactérias foram colocadas em microplacas (placas de 96 poços) para avaliação da formação de biofilme nos tempos de 12h, 24h, 36h e 48h a 30°C, sem agitação. Após cada período, o volume de cultura bacteriana foi retirado dos poços cuidadosamente e transferido para microplaca nova para leitura de absorbância (DO_{595nm}) das células planctônicas, como controle experimental. Então, os poços foram lavados suavemente duas vezes com água Milli-Q estéril para remoção das células planctônicas. Em seguida, as células aderidas na parede dos poços foram coradas com violeta de genciana 0,1% por 15 min no escuro. Após, os poços foram lavados cuidadosamente três vezes com água Milli-Q para remover o excesso do corante. O conteúdo remanescente na placa foi ressuspendido em etanol absoluto. Esta solução foi usada para determinar a absorbância (DO_{540nm}) das células que aderiram na superfície dos poços como indicativo de formação de biofilme. Os dados das amostras foram expressos em DO_{540nm} subtraindo-se o valor de DO_{540nm} do controle negativo feito somente com NFbHPN Malato líquido.

5.15 ENSAIO DE MOTILIDADE SWARMING

As culturas crescidas das estirpes selvagem SmR1, mutantes SmR1*tagF1* e SmR1*tssH2* foram inoculadas (10 μ L) em uma concentração de 10^8 células em meio NFbHPN Malato adicionado de 15 g/L de ágar para avaliar a motilidade do tipo *swarming*. Após o período de 72 horas de incubação a 30°C, os halos de crescimento de colônias foram registrados por foto no sistema UVP. E a média de raios dos halos das colônias foram calculadas através do programa ImageJ para avaliar a motilidade das estirpes mutantes em relação a selvagem.

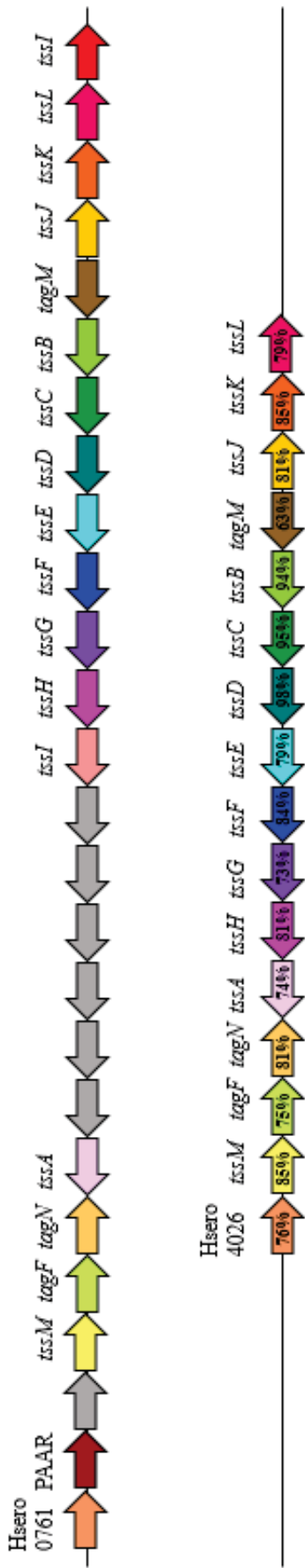
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISES *in silico* REVELAM QUE O GENOMA DE *H. seropedicae* POSSUI DOIS T6SS

Os T6SSs apresentam 13 genes conservados, *tssA-tssM* (ALCOFORADO DINIZ; LIU; COULTHURST, 2015), que são elementos centrais desse aparato de secreção. Esses genes são classificados de acordo com a função e localização de suas proteínas, que podem estar no ambiente citosólico, de membrana, ou podem ser secretadas pela célula. Há ainda os chamados genes associados *tag* que são quinases, fosfatases, domínios *forkhead*, que participam dos processos de regulação, ou lipoproteínas que ancoram nas membranas, e que variam entre os T6SSs (SHALOM; SHAW; THOMAS, 2007).

Durante a análise do genoma de *H. seropedicae* (4.804 genes) foram encontrados dois agrupamentos gênicos que codificam proteínas relacionadas ao T6SS, aqui chamados de T6SS-1 e T6SS-2. O T6SS-1 é constituído por 26 genes Hsero_0736 a Hsero_0761 (Figura 7). O T6SS-2 é formado por 16 genes Hsero_4026 a Hsero_4041 (Figura 7). Em *H. seropedicae*, o T6SS-1 é composto por 14 genes centrais, incluindo duas cópias de *tssI*. Curiosamente, o T6SS-2 não possui um *tssI*, isso sugere que a bactéria pode ter uma via comum de uso de TssI para os dois T6SS, ou pode utilizar a proteína TssI codificada pelo gene Hsero_4321 que se encontra fora desses agrupamentos. Nos dois T6SS, o gene *tagF* pode estar envolvido na regulação do T6SS. Assim como, 11 genes a montante do início do T6SS-1 de *H. seropedicae*, o gene Hsero_0724 que codifica para um ortólogo do regulador transcricional *lysR*, pode também estar envolvido na regulação do T6SS. Em *Xanthomonas citri* (BAYER-SANTOS et al., 2019) foi predito que *lysR* é co-transcrito com *tssA*. O T6SS-1 possui ainda 7 genes que codificam proteínas hipotéticas, um gene que codifica proteína com domínio PAAR. Enquanto o T6SS-2 é basicamente constituído por genes centrais e *tag*, além de Hsero_4026, homólogo ao Hsero_0761 (Figura 7), os quais codificam proteínas com domínios peptidase M15, cuja função ainda não é conhecida.

FIGURA 7 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO T6SS-1 E T6SS-2 EM *H. seropedicae*



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Organização genômica do T6SS-1 (em cima) e T6SS-2 (embaixo) em *H. seropedicae*. T6SS-1 é mostrado de Hsero_0761 a Hsero_0736. T6SS-2 é mostrado de Hsero_4026 a Hsero_4041. A similaridade de T6SS-2 é mostrada em relação ao T6SS-1 por meio da identidade proteica. Setas cinzas representam genes hipotéticos.

Neste trabalho construímos duas estirpes mutantes nos genes *tagF1* (TSS6-1) e *tssH2* (T6SS-2). O gene *tagF1*, codifica uma proteína de 328 aa e possui um domínio N-terminal TagF e, como mencionado anteriormente, pode estar associado ao processo de regulação pós-traducional do T6SS. TagF1 e TagF2 compartilham 75% de identidade. O gene *tssH2* codifica uma proteína de 889 aa com domínios conservados AAA+ e domínios homólogos a família de proteínas ClpV, com função de ATPase e desmontagem do complexo TssB/TssC contraído, respectivamente. TssH1 e TssH2 compartilham 81% de identidade.

6.2 CLONAGEM GÊNICA

Genes relacionados ao T6SS foram isolados do genoma de *H. seropedicae* e amplificados por PCR com *primers* desenhados para anelar em duas regiões da sequência nucleotídica de maneira que nem o começo, nem o fim dos genes fossem amplificados, apenas uma região intermediária. Os fragmentos gênicos obtidos foram clonados no plasmídeo pGEM-T, em seguida, confirmados por PCR e sequenciamento do DNA. A estratégia de mutagenese empregada foi a inserção do transposon EZ-Tn5™ nos fragmentos gênicos. Esse DNA de inserção além de nocautear os genes, confere resistência a canamicina. Depois, os insertos gênicos foram transferidos ao pSUP202, que é um plasmídeo conjugável em *H. seropedicae*.

A partir do transcriptoma de *H. seropedicae* SmR1 obtido durante a interação desta bactéria com o milho (BALSANELLI et al., 2016), foram selecionados genes relacionados aos dois T6SS: HSERO_RS03675, HSERO_RS03680, HSERO_RS03685, HSERO_RS03710, HSERO_RS03730, HSERO_RS03735, HSERO_RS03780, HSERO_RS20135, HSERO_RS20150, HSERO_RS20170, HSERO_RS20195, HSERO_RS20200. Do total de 12 genes selecionados neste trabalho, foram construídos nove plasmídeos contendo os genes de interesse mutagenizados com inserção de transposon EZ-Tn5™ (1221 nt) (Tabela 7). Todos os plasmídeos foram confirmados por PCR e sequenciamento das suas cadeias de nucleotídeos. Somente três construções plasmidiais não foram finalizadas.

TABELA 7 - MUTAGÊNESE DO T6SS EM *H. seropedicae*

| T6SS | Nomenclatura dos genes (nt) | Proteínas (aa) | Fragmento gênico + EZ-Tn5™ | Clonagem gênica |
|--------|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-----------------|
| T6SS-1 | HSERO_RS03675 / Hsero_0736 (2865) | TssI / VgrG (954) | 2734 nt | Confirmada |
| T6SS-1 | HSERO_RS03680 / Hsero_0737 (792) | TssL / DotU (263) | 1869 nt | Confirmada |
| T6SS-1 | HSERO_RS03685 / Hsero_0738 (1347) | TssK (448) | 2109 nt | Não confirmada |
| T6SS-1 | HSERO_RS03710 / Hsero_0743 (492) | TssD / Hcp (163) | 1587 nt | Confirmada |
| T6SS-1 | HSERO_RS03730 / Hsero_0747 (2682) | TssH / ClpV (893) | 2655 nt | Não confirmada |
| T6SS-1 | HSERO_RS03735 / Hsero_0748 (2835) | TssI / VgrG (944) | 2919 nt | Não confirmada |
| T6SS-1 | HSERO_RS03780 / Hsero_0757 (987) | TagF (328) | 1892 nt | Confirmada |
| T6SS-2 | HSERO_RS20135 / Hsero_4028 (993) | TagF (330) | 1959 nt | Confirmada |
| T6SS-2 | HSERO_RS20150 / Hsero_4031(2670) | TssH / ClpV (889) | 2477 nt | Confirmada |
| T6SS-2 | HSERO_RS20170 / Hsero_4035 (492) | TssD / Hcp (163) | 1622 nt | Confirmada |
| T6SS-2 | HSERO_RS20195 / Hsero_4040 (1347) | TssK (448) | 2157 nt | Confirmada |
| T6SS-2 | HSERO_HS20200 / Hsero_4041 (774) | TssL / DotU (257) | 1829 nt | Confirmada |

FONTE: O autor (2019).

NOTA: São apresentadas duas nomenclaturas para os genes de *H. seropedicae*. A nomenclatura antiga, gerada da primeira anotação, Hsero_[gene]. A nomenclatura HSERO_RS[gene], gerada automaticamente pelo NCBI. São apresentadas duas nomenclaturas para as proteínas codificadas por estes genes. O padrão Tss e os nomes originalmente propostos por diferentes trabalhos.

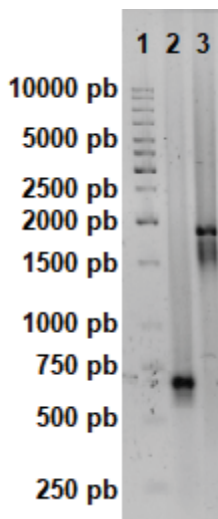
6.3 OBTENÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES DO T6SS EM *H. seropedicae*

Os plasmídeos pSUP202-Hsero_0757 e pSUP202-Hsero_4031 foram transferidos por conjugação para *H. seropedicae*. Após a recombinação homóloga, as estirpes mutantes foram selecionadas por resistência a canamicina e cloranfenicol, e os duplos recombinantes foram selecionados devido somente a resistência a canamicina. As estirpes mutantes nos genes *tagF1* (Hsero_0757) e *tssH2* (Hsero_4031) foram nomeadas SmR1*tagF1* e SmR1*tssH2*, respectivamente. As demais estirpes mutantes do T6SS em *H. seropedicae* ainda não foram obtidas.

A cópia selvagem dos genes *tagF1* e *tssH2* têm 987 pb e 2670 pb, respectivamente. De acordo com a estratégia de mutagênese, é esperado que os produtos de amplificação nos genes selvagens sejam menores. E os produtos de amplificação nos genes mutagenizados sejam maiores, nesse caso, pela inserção de um transposon aos genes. Então, o gene *tagF1* tem 671 pb referente a cópia selvagem

e 1892 pb na versão mutagenizada. O gene *tssH2* tem 1256 pb referente a cópia selvagem e 2477 pb na versão mutagenizada. As estirpes mutantes SmR1*tagF1* e SmR1*tssH2* foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA, obtidos a partir de PCR de colônias (Figuras 8 e 9, respectivamente).

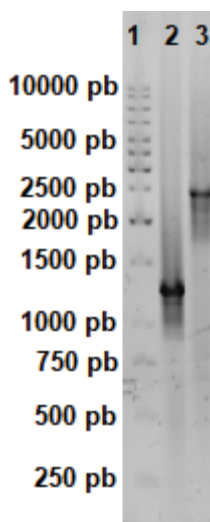
FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE *tagF1* EM *H. seropedicae*



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Perfil eletroforético de *H. seropedicae* SmR1 e SmR1*tagF1*. Cópia selvagem (671 pb) do gene *tagF1* em (2). Cópia mutagenizada (1892 pb) do gene *tagF1* em (3). Padrão de massa molecular em (1).

FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE *tssH2* EM *H. seropedicae*



FONTE: O autor (2019).

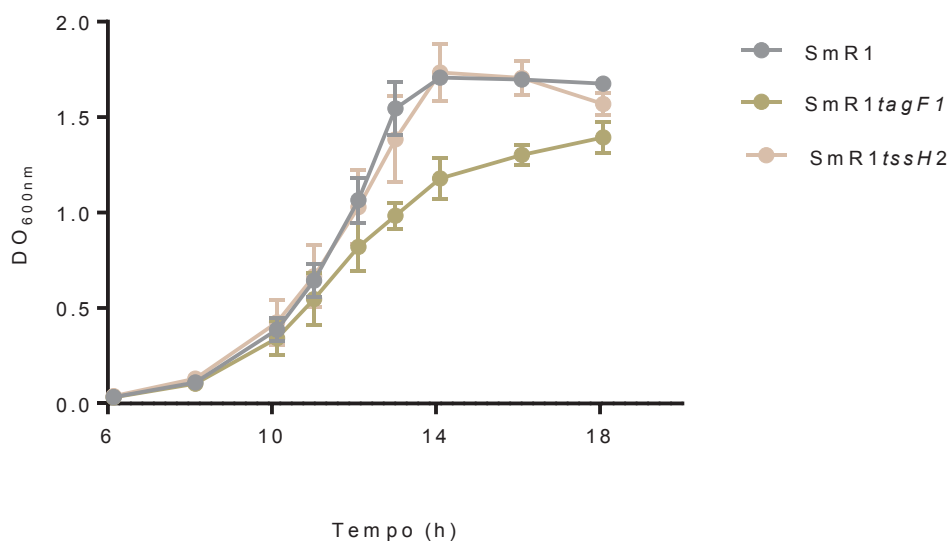
NOTA: Perfil eletroforético de *H. seropedicae* SmR1 e SmR1*tssH2*. Cópia selvagem (1256 pb) do gene *tssH2* em (2). Cópia mutagenizada (2477 pb) do gene *tssH2* em (3). Padrão de massa molecular em (1).

6.4 CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANA

O perfil de crescimento das estirpes SmR1, SmR1*tagF1*, SmR1*tssH2* foi avaliado através da curva de crescimento das bactérias. Inicialmente foi feito o inóculo de colônias em meio NFbHPN Malato líquido. Depois foi feito o re-inóculo das células para saturação das culturas bacterianas. Em seguida, as culturas foram diluídas (1:100) em placas de 96 poços para leitura de absorbância (DO_{600nm}). Para isso, foi utilizado o leitor de microplacas automatizado Tecan, que analisou o crescimento bacteriano por 23 horas. Após 6 horas de crescimento, todas as estirpes estavam crescidas aproximadamente em DO₆₀₀ 0,04 (considerado como ponto inicial). E após 18 horas de crescimento já haviam atingido a fase estacionária de crescimento (Figura 10).

A taxa de crescimento e o tempo de duplicação das estirpes mutantes em relação a estirpe selvagem durante a fase exponencial de crescimento das bactérias foram comparadas e não houve diferença estatística significativa. SmR1 tem taxa de crescimento ($\mu=0,5938$) e tempo de duplicação (1,16 horas). SmR1*tagF1* tem taxa de crescimento ($\mu= 0,5764$) e tempo de duplicação (1,20 horas). E SmR1*tssH2* apresenta taxa de crescimento ($\mu= 0,5715$) e tempo de duplicação (1,21 horas). Logo, as mutações nos genes *tagF1* e *tssH2* não conferem mudança no padrão de crescimento das estirpes mutantes nesses genes.

FIGURA 10 - CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANA



FONTE: O autor (2019).

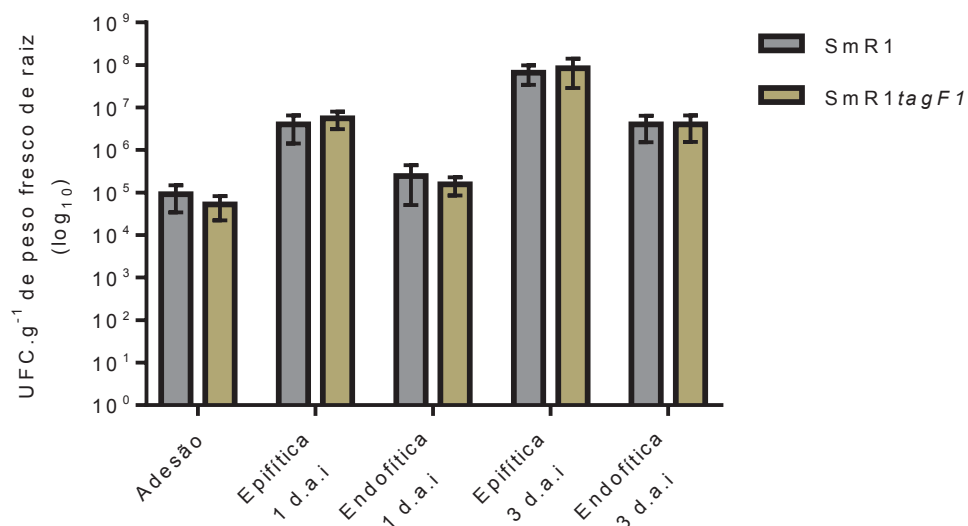
NOTA: O perfil de crescimento das estirpes SmR1, SmR1tagF1, SmR1tssH2 de *H. seropedicae* foi determinado por leitura de absorbância (DO_{600nm}). Foi realizado teste t e os valores p foram ajustados através do programa GraphPad Prism 7. Experimento feito em triplicata biológica, ± desvio padrão.

6.5 A MUTAÇÃO NO GENE *tagF1* (T6SS-1) EM *H. seropedicae* TORNA ESSA ESTIRPE MENOS COMPETITIVA NA COLONIZAÇÃO DE MILHO EM ENSAIO DE COMPETIÇÃO COM A ESTIRPE SELVAGEM

Para investigar se o gene *tagF1* (T6SS-1) está envolvido no processo de colonização de *H. seropedicae* às raízes de milho, foi feita a imersão de sementes de milho em cultura bacteriana na concentração de 10^5 UFC/mL por semente durante 30 minutos nos ensaios de adesão, também foi feita a avaliação de colonização epifítica e endofítica, um dia após inoculação (1 d.a.i) e, três dias após inoculação (3 d.a.i) das estirpes selvagem SmR1 e mutante SmR1tagF1 (Figura 11). Na etapa de adesão, embora SmR1 apresente maior número de bactérias aderidas por peso fresco de raiz em relação a SmR1tagF1, essa diferença observada não chega a ser significativa estatisticamente. Na colonização epifítica e endofítica de 1 d.a.i e 3 d.a.i a quantidade de células recuperadas das raízes de milho para ambas as estirpes analisadas foi praticamente a mesma. Portanto, o padrão de colonização da estirpe SmR1tagF1 não

é estatisticamente diferente do padrão de colonização da estirpe do tipo selvagem SmR1.

FIGURA 11 - ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1*tagF1* DE *H. seropedicae* EM MILHO



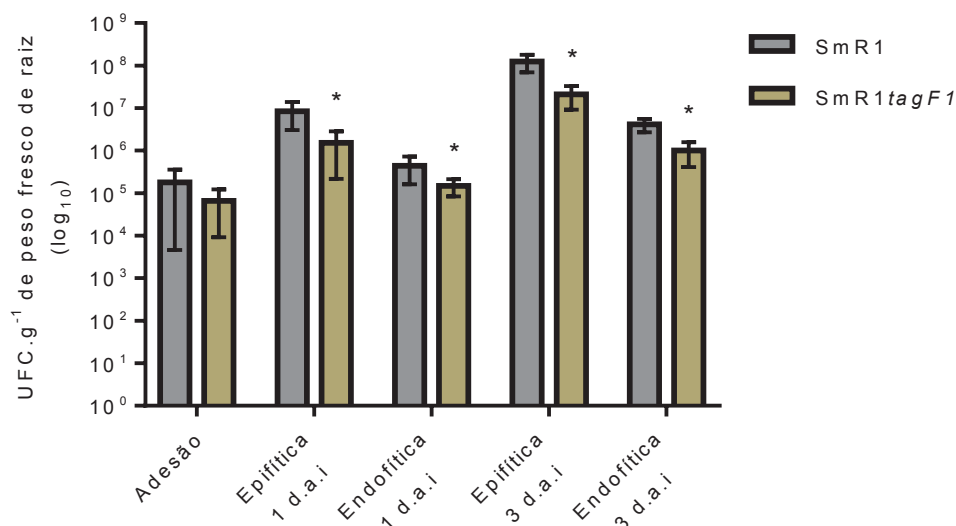
FONTE: O autor (2019).

NOTA: Ensaio de colonização em milho. *H. seropedicae* estirpes selvagem SmR1 e mutante SmR1*tagF1* foram inoculadas separadamente em plântulas de milho em uma concentração de 10⁵ UFC/mL/semente. Foi feita a contagem de UFC.g⁻¹ de peso fresco de raiz, em ensaio de adesão após 30 minutos de inoculação, nos ensaios de colonização epifítica e endofítica 1 d.a.i e 3 d.a.i. Foi realizado teste t e os valores p foram ajustados através do programa GraphPad Prism 7. Dados de três experimentos independentes, n=9, ± desvio padrão.

Quando as estirpes de *H. seropedicae* do tipo selvagem SmR1 e mutante SmR1*tagF1* foram co-inoculadas para avaliação de competição nas raízes de milho, observou-se mudança no padrão de colonização das plantas (Figura 12). A adesão da estirpe mutante foi menor que a adesão da selvagem, porém sem diferença estatística. No primeiro dia, o número de bactérias da estirpe mutante que colonizou o milho epifiticamente foi sete vezes menor em relação a selvagem. Já endofiticamente a colonização da estirpe mutante foi cerca de três vezes menor que a selvagem. No terceiro dia, a estirpe mutante colonizou o milho epifiticamente cerca de seis vezes menos em relação a selvagem. E na colonização endofítica

aproximadamente quatro vezes menos. Esses resultados sugerem que a estirpe mutante no gene *tagF1* é menos competitiva na colonização do milho.

FIGURA 12 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1*tagF1* DE *H. seropedicae* EM MILHO



FONTE: O autor (2019).

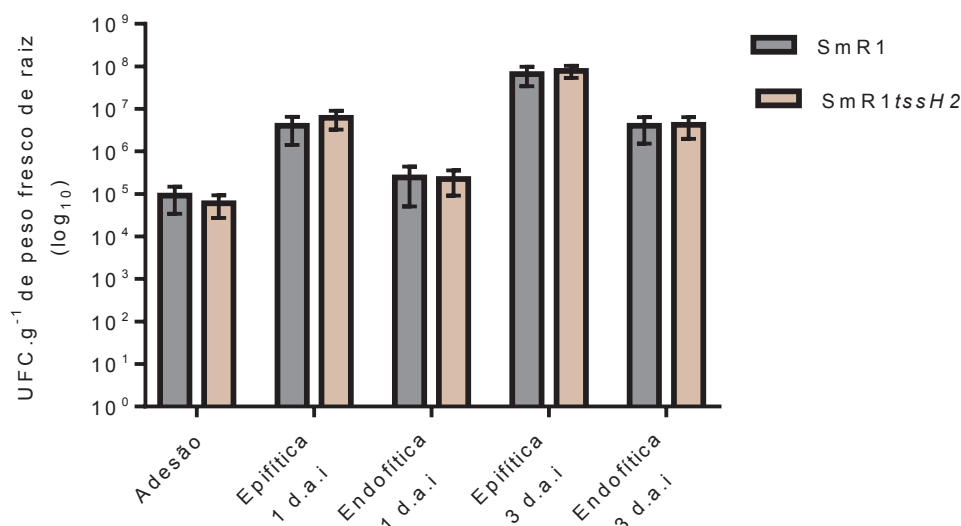
NOTA: Ensaio de competição em milho. *H. seropedicae* estirpes selvagem SmR1 e mutante SmR1*tagF1* foram co-inoculadas em plântulas de milho em uma concentração de 10⁵ UFC/mL/semente. Foi feita a contagem de UFC.g⁻¹ de peso fresco de raiz, em ensaio de adesão após 30 minutos de inoculação, nos ensaios de colonização epifítica e endofítica 1 d.a.i e 3 d.a.i. Foi realizado teste t e os valores p foram ajustados através do programa GraphPad Prism 7. Diferenças estatísticas significativas são representadas por * (p < 0,05). Dados de três experimentos independentes, n=9, ± desvio padrão.

6.6 A MUTAÇÃO NO GENE *tssH2* (T6SS-2) EM *H. seropedicae* TORNA ESSA ESTIRPE MENOS COMPETITIVA NA ADESÃO AO MILHO EM ENSAIO DE COMPETIÇÃO COM A ESTIRPE SELVAGEM

Também foi avaliado se o gene *tssH2* está envolvido no processo de colonização de *H. seropedicae* no milho. Para tanto foram feitos os ensaios de adesão, colonização epifítica e endofítica, 1 d.a.i e 3 d.a.i em raízes de milho das estirpes selvagem SmR1 e mutante SmR1*tssH2* separadamente (Figura 13). De modo geral a contagem de bactérias do tipo selvagem e mutante no gene *tssH2* por peso fresco de raiz foi praticamente a mesma no processo de adesão das células às raízes de milho, assim como, durante todo o processo epifítico e endofítico de colonização 1

d.a.i e 3 d.a.i. Logo, o padrão de colonização de *H. seropedicae* ao milho é o mesmo para as estirpes SmR1 e SmR1*tssH2*.

FIGURA 13 - ENSAIO DE COLONIZAÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1*tssH2* DE *H. seropedicae* EM MILHO

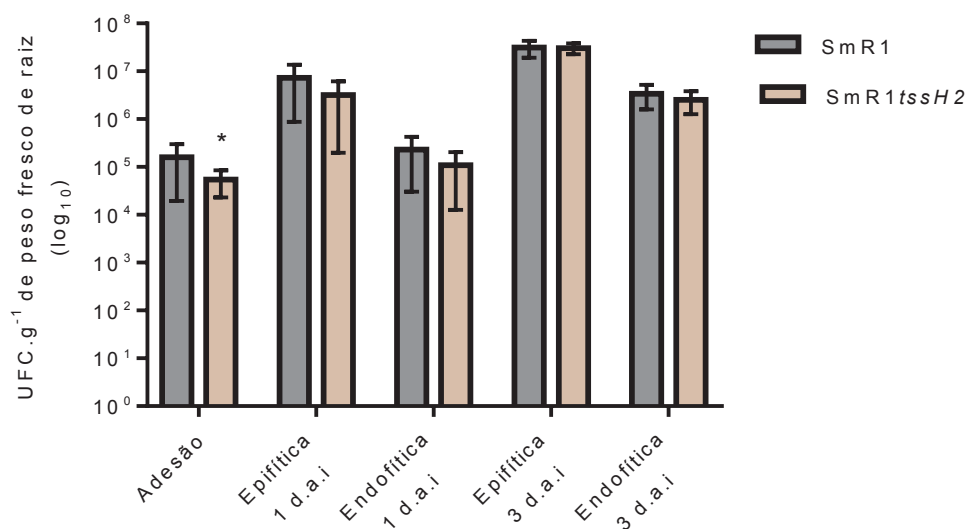


FONTE: O autor (2019).

NOTA: Ensaio de colonização em milho. *H. seropedicae* estirpes selvagem SmR1 e mutante SmR1*tssH2* foram inoculadas separadamente em plântulas de milho em uma concentração de 10⁵ UFC/mL/semente. Foi feita a contagem de UFC.g⁻¹ de peso fresco de raiz, em ensaio de adesão após 30 minutos de inoculação, nos ensaios de colonização epifítica e endofítica 1 d.a.i e 3 d.a.i. Foi realizado teste t e os valores p foram ajustados através do programa GraphPad Prism 7. Dados de três experimentos independentes, n=9, ± desvio padrão.

Quando a estirpe selvagem SmR1 e a estirpe mutante SmR1*tssH2* de *H. seropedicae* foram co-inoculadas no milho o padrão de adesão das células nas raízes do milho foi alterado (Figura 14). No processo de adesão das células às raízes de milho, a estirpe mutante aderiu quase três vezes menos do que a selvagem, sendo esse resultado estatisticamente significativo. No primeiro dia de colonização a estirpe mutante colonizou menos do que SmR1, tanto epifiticamente como endofiticamente, porém nesse caso não houve diferença estatística. E no terceiro dia de colonização epifítica e endofítica as duas estirpes colonizaram o milho de maneira muito similar. Portanto, quando em competição o padrão de colonização das estirpes SmR1 e SmR1*tssH2* no processo de adesão às raízes de milho é levemente alterado em uma escala logarítmica. A estirpe mutante no gene *tssH2* é menos eficiente na adesão. Porém essa diferença relativamente pequena não é observada na colonização 1 d.a.i e 3 d.a.i do milho.

FIGURA 14 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1*tssH2* DE *H. seropedicae* EM MILHO



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Ensaio de competição em milho. *H. seropedicae* estirpes selvagem SmR1 e mutante SmR1*tssH2* foram co-inoculadas em plântulas de milho em uma concentração de 10⁵ UFC/mL/semente. Foi feita a contagem de UFC.g⁻¹ de peso fresco de raiz, em ensaio de adesão após 30 minutos de inoculação, nos ensaios de colonização epifítica e endofítica 1 d.a.i e 3 d.a.i. Foi realizado teste t e os valores p foram ajustados através do programa GraphPad Prism 7. Diferenças estatísticas significativas são representadas por * (p < 0,05). Dados de três experimentos independentes, n=9, ± desvio padrão.

Os dados dos experimentos em planta em conjunto sugerem que os genes *tagF1* e *tssH2* não estão envolvidos com os mecanismos de colonização de *H. seropedicae* ao milho. Todavia esses genes parecem ser importantes para a competição desta bactéria em milho. O papel de *tagF1* pode estar associado a manutenção da colonização epifítica e endofítica na superfície externa e dentro dos tecidos radiculares em um microambiente competitivo. O gene *tssH2* pode estar associado ao *fitness* de competitividade durante a adesão de *H. seropedicae* às raízes do milho. Tudo isso é muito relevante para os estudos de interação planta-bactéria, uma vez, que a rizosfera é um ambiente polimicrobiano composto por diversas espécies patogênicas ou não patogênicas. E ainda, mais importante no caso de microrganismos que promovem o crescimento vegetal, como *H. seropedicae*.

O T6SS-1 e T6SS-2 de *H. seropedicae* podem ser aparatos moleculares usados por essa bactéria para combater bactérias competidoras nas raízes do milho. Talvez o nocaute dos genes *tagF1* e *tssH2* comprometa o funcionamento de T6SS-1 e T6SS-2, com isso, as estirpes mutantes SmR1*tagF1* e SmR1*tssH2* de *H.*

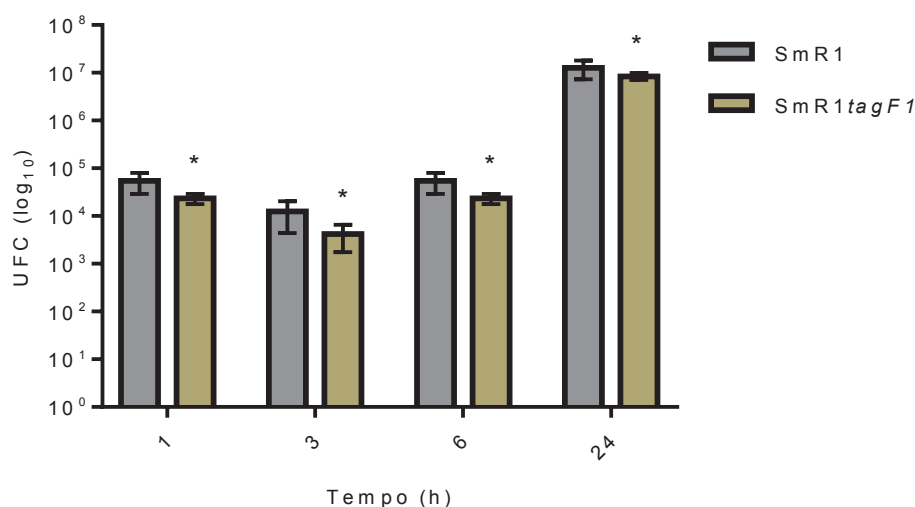
seropedicae se tornam menos competitivas que a estirpe selvagem, que provavelmente possui um T6SS funcional. De fato, um T6SS funcional age como uma arma de proteção às plantas contra fitopatógenos. Bernal et al. (2017) mostraram que *P. putida* atua como um agente protetor da planta do tabaco ao combater *Xanthomonas campestris*, através da secreção de proteínas efetoras de um dos seus três clusters do T6SS. Futuramente ensaios de competição intersilverbacteriana em planta devem ser realizados entre *H. seropedicae* e outras espécies para entendermos melhor o fenótipo competitivo ligado ao T6SS na colonização de plantas.

6.7 AS ESTIRPES MUTANTES *SmR1tagF1* (T6SS-1) E *SmR1tssH2* (T6SS-2) TAMBÉM SÃO MENOS COMPETITIVAS QUE A SELVAGEM EM SISTEMA PLANCTÔNICO DE CRESCIMENTO

Ensaio de co-crescimento em sistema planctônico foram realizados para avaliar a possível atividade antibacteriana do T6SS em *H. seropedicae*. As estirpes mutantes *SmR1tagF1* e *SmR1tssH2* separadamente foram co-inoculadas com a estirpe selvagem *SmR1*. Para isso, foi feita uma mistura 1:1 da estirpe selvagem e mutante na concentração inicial de 10^5 células em 2×10^{-1} mL de meio de cultura. Então, as bactérias foram co-cultivadas em meio NFbHPN Malato líquido em microplacas sem agitação. Os ensaios de competição foram realizados 1h, 3h, 6h e 24h após a mistura das bactérias.

Em todos os tempos aferidos o número de colônias sobreviventes de *SmR1* foi maior em relação a *SmR1tagF1* (Figura 15). Na primeira hora de co-cultivo, o número de colônias de *SmR1* foi 2,1 vezes maior do que o número de colônias de *SmR1tagF1*, na terceira hora a diferença foi de quase três vezes (2,9), após seis horas a diferença foi de 2,3 e após 24 horas foi de 1,5 vezes.

FIGURA 15 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 E SmR1*tagF1* DE *H. seropedicae* EM SISTEMA PLANCTÔNICO



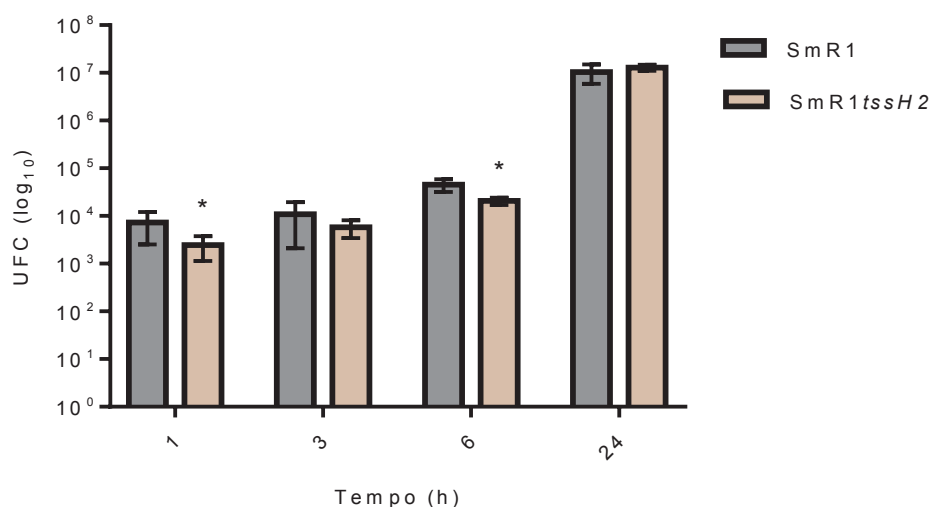
FONTE: O autor (2019).

NOTA: Ensaio de competição em sistema planctônico de crescimento. As estirpes selvagem SmR1 e mutante SmR1*tagF1* de *H. seropedicae* foram misturadas 1:1 na concentração de 10⁵ UFC em 2 x 10⁻¹ mL em meio NFbHPN Malato líquido. Foi feita a análise de sobrevivência das bactérias e determinação de atividade antibacteriana através da contagem de UFC após 1h, 3h, 6h e 24h de co-cultivo. Foi realizado teste t e os valores p foram ajustados através do programa GraphPad Prism 7. Diferenças estatísticas significativas são representadas por * (p < 0,05). Dados de três experimentos independentes, n=9, ± desvio padrão.

Apesar da leve redução no número de colônias de SmR1*tagF1*. O gene *tagF1* codifica para uma proteína repressora do T6SS (SILVERMAN et al., 2011). Os resultados com a estirpe mutante $\Delta tagF$ de *P. aeruginosa* mostraram um aumento na secreção de efetores, TssD e Tse-1, no sobrenadante da cultura de $\Delta tagF$, em relação a estirpe selvagem. Nos ensaios de competição em sistema planctônico de crescimento, $\Delta tagF$ não mostrou nenhuma vantagem competitiva em relação a estirpe competidora testada. Na verdade, o crescimento de ambas estirpes foi muito similar. Somente quando o ensaio de competição foi feito em superfície ágar que $\Delta tagF$ apresentou uma taxa de sobrevivência levemente maior em relação a estirpe competidora e mesmo assim, o resultado não foi estatisticamente significativo. Outro grupo de pesquisa mostrou que a taxa de sobrevivência de *E. coli* foi aumentada cerca de dez vezes quando a estirpe competidora *A. tumefaciens* possuía um plasmídeo que superexpressava TagF-TagG, e nesse caso, de novo o sistema de crescimento das bactérias era de superfície (LIN et al., 2018).

Ensaio de competição em sistema planctônico de crescimento também foram feitos para avaliar o efeito da mutação no gene *tssH2*. Após a primeira hora de co-cultivo foram recuperadas 3x mais colônias da estirpe SmR1. Na terceira hora a diferença entre colônias da estirpe SmR1 e da estirpe mutante foi de 1,8x (Smr1), após 6 horas essa diferença foi de 2,2x e depois de 24 horas 1,2x (Figura 16).

FIGURA 16 - ENSAIO DE COMPETIÇÃO DAS ESTIRPES SmR1 e SmR1*tssH2* DE *H. seropedicae* EM SISTEMA PLANCTÔNICO



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Ensaio de competição em sistema planctônico de crescimento. As estirpes selvagem SmR1 e mutante SmR1*tssH2* de *H. seropedicae* foram misturadas 1:1 na concentração de 10⁵ UFC em 2 x 10⁻¹ mL em meio NFbHPN Malato líquido. Foi feita a análise de sobrevivência das bactérias e determinação de atividade antibacteriana através da contagem de UFC após 1h, 3h, 6h e 24h de co-cultivo. Foi realizado teste t e os valores p foram ajustados através do programa GraphPad Prism 7. Diferenças estatísticas significativas são representadas por * (p < 0,05). Dados de três experimentos independentes, n=9, ± desvio padrão.

A estirpe mutante *tssH* em *P. aeruginosa* possuem um T6SS não funcional na exportação de efetores. Com isso, essas bactérias apresentam uma taxa de sobrevivência reduzida drasticamente em ensaios de competição (HOOD et al., 2010). O que não é o caso neste trabalho, já que foi observado apenas uma leve redução de colônias SmR1*tssH2* em relação a SmR1.

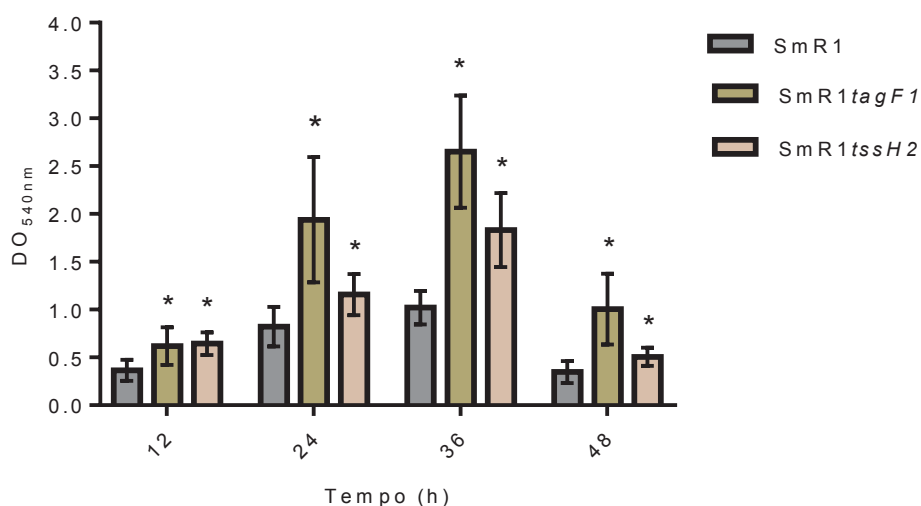
6.8 AS MUTAÇÕES *tagF1* E *tssH2* EM *H. seropedicae* AUMENTAM A FORMAÇÃO DE BIOFILME

Estudos prévios reportaram uma associação do T6SS com a formação de biofilme. A proteína TssD foi identificada como constituinte do estágio de maturação e estágio final do desenvolvimento de biofilme em *P. aeruginosa* (SOUTHEY-PILLIG;

DAVIES; SAUER, 2005) e *Vibrio parahaemolyticus* (ENOS-BERLAGE et al., 2005). Em *E. coli* a mutação de *sciN* que codifica uma lipoproteína de membrana externa do T6SS, aboliu a secreção de TssD (*sciD*) e reduziu a capacidade formação de biofilme nesta bactéria (ASCHTGEN et al., 2008).

Neste trabalho, as estirpes SmR1, SmR1*tagF1*, SmR1*tssH2* foram testadas quanto a sua capacidade de formar biofilme. A formação de biofilme foi avaliada quantitativamente por coloração das bactérias aderidas a superfície de microplaca através de leitura de DO_{540nm} nos tempos 12h, 24h, 36h e 48h (Figura 17).

FIGURA 17 - FORMAÇÃO DE BIOFILME



FONTE: O autor (2019).

NOTA: *H. seropedicae* selvagem SmR1, mutante SmR1*tagF1*, mutante SmR1*tssH2* foram separadamente inoculadas na concentração de 10^6 células em superfície de microplaca para avaliação da formação de biofilme nos tempos 12h, 24h, 36h, 48h. Por meio da coloração de biofilme por violeta de genciana 0,1%. E posterior descoloração com etanol absoluto para quantificação de bactérias aderidas à superfície de microplaca através de valores expressos em DO_{540nm}. Foi realizado teste t através do programa GraphPad Prism 7. Diferenças estatísticas significativas são representadas por * ($p < 0,05$). Dados de dois experimentos independentes, $n=16$, \pm desvio padrão.

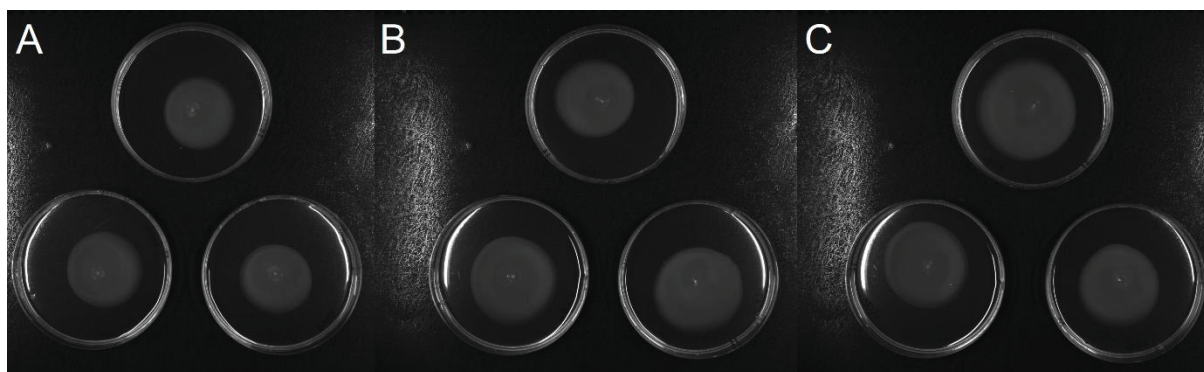
A estirpe selvagem e as estirpes mutantes SmR1*tagF1* e SmR1*tssH2* formaram mais biofilme até o período de 36 horas. A partir de 48 horas a quantidade de biofilme formado diminuiu para todas as estirpes testadas, provavelmente porque nesse tempo, as células estão desfazendo o biofilme. No entanto, ao longo do tempo experimental a estirpe mutante SmR1*tagF1* apresentou um aumento na formação de biofilme em relação a estirpe selvagem sempre crescente de 69%, 136%, 160% e 189%, respectivamente. A estirpe mutante SmR1*tssH2* também apresentou um aumento na formação de biofilme em relação a estirpe selvagem de 76%, 41%, 79%

e 45%, nos respectivos tempos experimentais. Esses resultados indicam que em *H. seropedicae*, pelo menos, os genes *tagF1* e *tssH2* desempenham um papel na formação de biofilme de maneira ainda não esclarecida. Similarmente, a mutação de *tssM* (*icmF3*) em *P. aeruginosa* aumentou a formação de biofilme quando comparada a estirpe selvagem (LIN et al., 2015). Já em *Burkholderia thailandensis* não houve diferença na formação de biofilme quando comparada a estirpe $\Delta T6SS-1$ em relação a selvagem em um período de 4 dias (SCHWARZ et al., 2010).

6.9 AS MUTAÇÕES NOS GENES *tagF1* E *tssH2* AUMENTAM A MOTILIDADE DE *H. seropedicae*

As mutações *tagF1* e *tssH2* aumentaram a motilidade do tipo *swarming* de *H. seropedicae* (Figura 18). O halo das colônias que é indicativo de motilidade, foi mensurado através da média do raio das colônias após 72 horas de inoculação em meio NFbHPN Malato ágar 0,3% e incubação a 30°C. As estirpes mutantes SmR1*tagF1* e SmR1*tssH2* apresentaram um halo de motilidade, respectivamente, 20% e 19% maior que o halo de motilidade da estirpe selvagem (Figura 19).

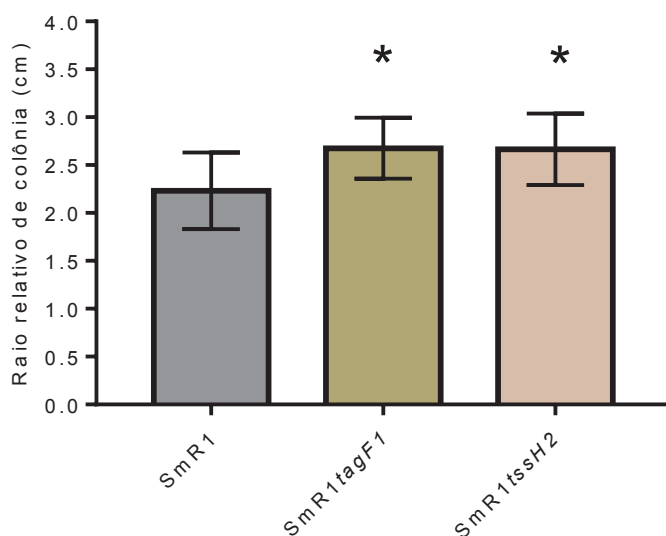
FIGURA 18 - HALO DE MOTILIDADE DE COLÔNIAS DE *H. seropedicae* SmR1, SmR1*tagF1*, SmR1*tssH2*



FONTE: O autor (2019).

NOTA: (A) SmR1, (B) SmR1*tagF1*, (C) SmR1*tssH2*.

FIGURA 19 - ENSAIO DE MOTILIDADE



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Avaliação de motilidade *swarming* de *H. seropedicae* selvagem SmR1, mutante SmR1tagF1, mutante SmR1tssH2 em meio NFbHPN Malato ágar 0,3%. O raio médio do halo de crescimento das colônias mutantes foi mensurado após 72 horas de incubação a 30°C, e comparado ao raio médio do halo de crescimento da colônia selvagem. Foi realizado teste t através do programa GraphPad Prism 7. Diferenças estatísticas significativas são representadas por * ($p < 0,05$). Dados de três experimentos independentes, $n=9$, \pm desvio padrão.

Ainda não está claro como o T6SS e a motilidade das bactérias se relacionam. Porém um trabalho de Jiang et al. (2019) jogou uma luz sobre essa questão. A análise de proteínas presentes no sobrenadante do cultivo de *Azoarcus olearius* estirpe mutante BH Δ tssM1tssK2 nos dois T6SS dessa espécie, apresentou um aumento na quantidade de proteínas associadas a flagelos, ao sistema de secreção do tipo IV, e a quimiotaxia. O que segundo os autores sugere um mecanismo de regulação da atividade do T6SS e a exportação de proteínas relacionadas a motilidade. Ainda segundo os autores, esse resultado foi surpreendente porque trabalhos prévios mostraram que estirpes mutantes no gene tssM possuem motilidade nula (DE PACE et al., 2011) ou reduzida (LIN et al., 2015), que foi novamente demonstrada em *A. olearius* (JIANG et al., 2019). Em *H. seropedicae* as mutações em tagF1 e tssH2 aumentaram a motilidade da bactéria.

7 CONCLUSÃO

A mutação no gene *tagF1* no T6SS-1 em *H. seropedicae* torna a estirpe mutante Smr1*tagF1* menos competitiva que a estirpe selvagem SmR1 no processo de colonização das raízes de milho. Isso sugere que o T6SS nesta bactéria pode estar relacionado a proteção da planta contra bactérias competidoras durante a colonização.

A mutação no gene *tssH2* no T6SS-2 em *H. seropedicae* torna a estirpe mutante Smr1*tssH2* menos competitiva que a estirpe selvagem SmR1 na etapa de adesão às raízes de milho.

As estirpes mutantes Smr1*tagF1* e Smr1*tssH2* produzem mais biofilme que a estirpe selvagem SmR1.

As estirpes mutantes Smr1*tagF1* e Smr1*tssH2* apresentam maior motilidade do tipo *swarming* em relação a estirpe selvagem.

REFERÊNCIAS

- ABBY, S. S.; ROCHA, E. P. C. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes using MacSyFinder. **Methods in Molecular Biology**, v. 1615, n. October 2015, p. 1–21, 2017.
- ALCOFORADO DINIZ, J.; LIU, Y. C.; COULTHURST, S. J. Molecular weaponry: Diverse effectors delivered by the Type VI secretion system. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 1742–1751, 2015.
- ASCHTGEN, M. S. et al. SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 22, p. 7523–7531, 2008.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, V. L. D. et al. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65–73, 1992.
- BALSANELLI, E. et al. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016.
- BAYER-SANTOS, E. et al. Distribution, Function and Regulation of Type 6 Secretion Systems of Xanthomonadales. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. July, p. 1–10, 2019.
- BERNAL, P. et al. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. **ISME Journal**, v. 11, n. 4, p. 972–987, 2017.
- BERNAL, P.; LLAMAS, M. A.; FILLOUX, A. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–15, 2018.
- BINGLE, L. E.; BAILEY, C. M.; PALLEN, M. J. Type VI secretion: a beginner's guide. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 3–8, 2008.

BLADERGROEN, M. R.; BADEL, K.; SPAINK, H. P. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 1, p. 53–64, 2003.

BÖNEMANN, G. et al. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. **EMBO Journal**, v. 28, n. 4, p. 315–325, 2009.

BOYER, F. et al. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: What can be learned from available microbial genomic resources? **BMC Genomics**, v. 10, 2009.

CASCALES, E. The type VI secretion toolkit. **EMBO Reports**, v. 9, n. 8, p. 735–741, 2008.

CHEN, L. et al. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological Research**, v. 172, p. 19–25, 2015.

COULTHURST, S. The Type VI secretion system: A versatile bacterial weapon. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 165, n. 5, p. 503–515, 2019.

DAS, S.; CHAUDHURI, K. Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through In Silico analysis. **In Silico Biology**, v. 3, n. 3, p. 287–300, 2003.

DE PACE, F. et al. Characterization of icmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. **Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 2954–2962, 2011.

DECOIN, V. et al. A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

DELEPELAIRE, P. Type I secretion in gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1694, n. 1- 3 SPEC.ISS., p. 149–161, 2004.

DESVAUX, M.; PARHAM, N. J.; HENDERSON, I. R. The autotransporter secretion system. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 53–60, 2004.

ENOS-BERLAGE, J. L. et al. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1160–1182, 2005.

FRONZES, R.; CHRISTIE, P. J.; WAKSMAN, G. The structural biology of type IV secretion systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 703–714, 2009.

HAAPALAINEN, M. et al. Hcp2, a secreted protein of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, is required for fitness for competition against bacteria and yeasts. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 4810–4822, 2012.

HENDERSON, I. R. et al. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 692–744, 1 dez. 2004.

HO, B. T.; DONG, T. G.; MEKALANOS, J. J. A view to a kill: The bacterial type VI secretion system. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 1, p. 9–21, 2014.

HOOD, R. D. et al. A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. **Cell Host and Microbe**, v. 7, n. 1, p. 25–37, 2010.

JAMES, E. K. et al. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue 3*Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 3, p. 785–797, 1997.

JIANG, X. et al. Two functionally deviating type 6 secretion systems occur in the nitrogen-fixing endophyte *azoarcus olearius* BH72. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, p. 1–13, 2019.

KLASSEN, G. et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMRI. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 887–891, 1997.

KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. J. The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 336–351, 2012.

LEIMAN, P. G. et al. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 11, p. 4154–4159, 2009.

LIN, J. et al. The *icmF3* locus is involved in multiple adaptation- and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. OCT, p. 1–15, 2015.

LIN, J. S. et al. Fha Interaction with Phosphothreonine of TssL Activates Type VI Secretion in *Agrobacterium tumefaciens*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, 2014.

LIN, J. S. et al. TagF-mediated repression of bacterial type VI secretion systems involves a direct interaction with the cytoplasmic protein Fha. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 23, p. 8829–8842, 2018.

MA, L. S. et al. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. **Cell Host and Microbe**, v. 16, n. 1, p. 94–104, 2014.

MACINTYRE, D. L. et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 45, p. 19520–19524, 2010.

MICHEL, G.; VOULHOUX, R. The Type II Secretory System (T2SS) in Gram-negative Bacteria: A Molecular Nanomachine for Secretion of Sec and Tat-Dependent Extracellular Proteins. In: WOOLDRIDGE, K. (Ed.). **Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009.

MONTEIRO, R. A. et al. 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.

MONTEIRO, R. A. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 175–196, 2012.

MOUGOUS, J. D. et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. **Science**, v. 312, n. 5779, p. 1526–1530, 2006.

MOUGOUS, J. D. et al. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 797–803, 2007.

OLIVARES, F. L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197–200, 1996.

OSTROWSKI, A. et al. Killing with proficiency: Integrated post-translational regulation of an offensive Type VI secretion system. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 7, p. 1–25, 2018.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of *herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, 2011.

PORTALIOU, A. G. et al. Hierarchical protein targeting and secretion is controlled by an affinity switch in the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 23, p. 3517–3531, 2017.

PUKATZKI, S. et al. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1528–1533, 2006.

PUKATZKI, S. et al. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 39, p. 15508–15513, 2007.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39–47, 2003.

RUSSELL, A. B. et al. A widespread bacterial type VI secretion effector superfamily identified using a heuristic approach. **Cell Host and Microbe**, v. 11, n. 5, p. 538–549, 2012.

RUSSELL, A. B. et al. A type VI secretion-related pathway in bacteroidetes mediates interbacterial antagonism. **Cell Host and Microbe**, v. 16, n. 2, p. 227–236, 2014.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1997.

SHELL, M. A. et al. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1466–1485, 2007.

SCHLIEKER, C. et al. ClpV, a unique Hsp100/Clp member of pathogenic proteobacteria. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 11, p. 1115–1127, 2005.

SCHWARZ, S. et al. *Burkholderia* type vi secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. 77–78, 2010.

SHALOM, G.; SHAW, J. G.; THOMAS, M. S. In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2689–2699, 2007.

SHYNTUM, D. Y. et al. *Pantoea ananatis* utilizes a type VI secretion system for pathogenesis and bacterial competition. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 4, p. 420–431, 2015.

SILVERMAN, J. M. et al. Separate inputs modulate phosphorylation-dependent and -independent type VI secretion activation. **Molecular Microbiology**, v. 82, n. 5, p. 1277–1290, 2011.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

SINGH, N.; WAGNER, S. Investigating the assembly of the bacterial type III secretion system injectisome by in vivo photocrosslinking. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 6, p. 151331, 2019.

SOUTHEY-PILLIG, C. J.; DAVIES, D. G.; SAUER, K. Characterization of Temporal Protein Production in. **Society**, v. 187, n. 23, p. 8114–8126, 2005.

SUAREZ, G. et al. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 4, p. 344–361, 2008.

ZHENG, J.; LEUNG, K. Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1192–1206, 2007.