

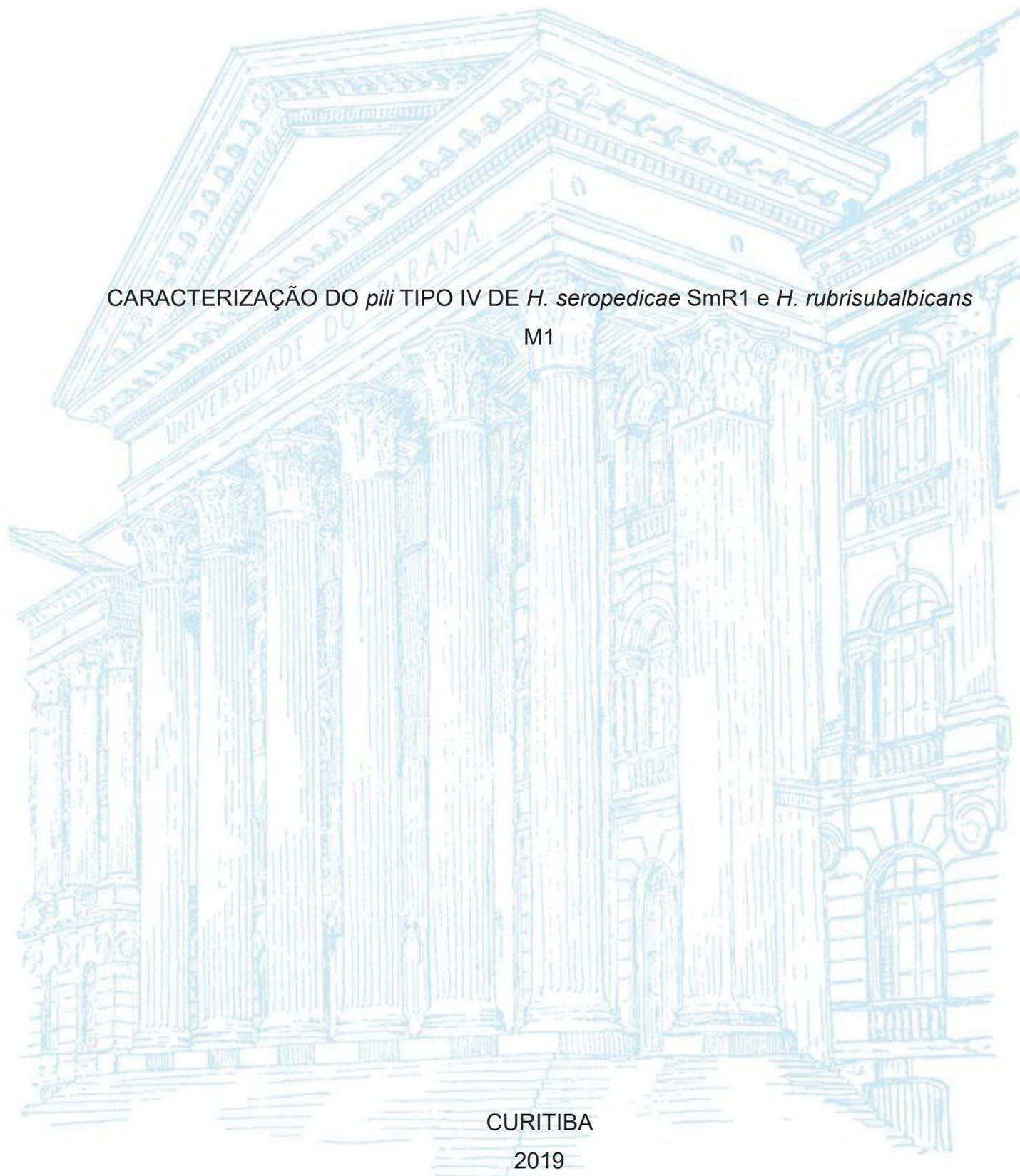
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA KESSLER CHICORA

CARACTERIZAÇÃO DO *pili* TIPO IV DE *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans*  
M1

CURITIBA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA KESSLER CHICORA

CARACTERIZAÇÃO DO *pili* TIPO IV DE *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans*  
M1

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz  
Coorientador: Dr. Eduardo Balsanelli

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Chicora, Vanessa Kessler

Caracterização do *pili* tipo IV de *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1. / Vanessa Kessler Chicora. – Curitiba, 2019.  
102 p.: il.

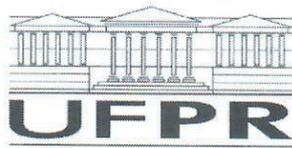
Orientador: Leonardo Magalhães Cruz

Coorientador: Eduardo Balsanelli

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Herbaspirillum 2. Genes bacterianos 3. Plantas hospedeiras I.  
Título II. Cruz, Leonardo Magalhães III. Balsanelli, Eduardo IV.  
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.9

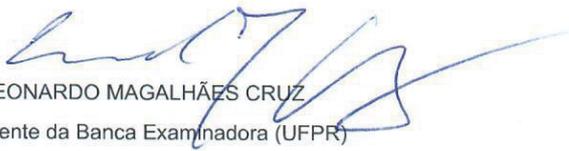


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016/03P2

## 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 tese de Doutorado de **VANESSA KESSLER CHICORA** intitulada: **Caracterização do pili tipo IV de *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisublaticans* M1**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutor 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, 24 de Maio de 2019.



LEONARDO MAGALHÃES CRUZ

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



LUCIANE MARIA PEREIRA PASSAGLIA

Avaliador Externo (UFRGS)



ROSE ADELE MONTEIRO

Avaliador Interno (UFPR)



FÁBIO LOPES OLIVARES

Avaliador Externo (UENF)

Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim, mesmo com minhas falhas e sempre me motivaram e me mostraram que eu poderia realizar este sonho. Estes incluem meus pais, Marinda I. K. Chicora e Lourenço Chicora, meus irmãos Edina K. da Silva, Viviane K. Chicora e Thiago K. Chicora, meu parceiro de vida João Guilherme L. Martins.

Também dedico ao meu orientador Leonardo M. Cruz, por toda atenção e confiança.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Leonardo Magalhães Cruz, pelo incentivo, motivação e entusiasmo com o trabalho. Pela disposição, paciência e compreensão ao me orientar, afinal já são quase 10 anos juntos nessa jornada. Sempre serei muito grata por tudo que me ensinou. Agradeço também ao Dr. Eduardo Balsanelli, por seu trabalho de co-orientação e por ser sempre solícito para as discussões e execução do trabalho.

Ao programa de pós-graduação e Ciências – Bioquímica, pela oportunidade de realizar esse Doutorado.

À CAPES, agência financiadora, pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN), e ao Professor Emanuel Maltempi de Souza, por quem tenho grande admiração e sempre esteve disponível para troca de ideias. Agradeço também, aos demais Professores do NFN pelo apoio.

À Professora Rose Adele Monteiro, por sua contribuição como banca interna e todas as sugestões e ensinamentos, agradeço muito por tudo e por acreditar em mim para a realização desse trabalho.

À Dr. Paloma Bonato que também participou como banca interna, muito obrigada por todas as sugestões e discussões. E como amiga, compartilhamos o mesmo espaço por muitos anos, agradeço por todas as conversas sobre a vida, sempre muito ricas e reflexivas e pelos momentos descontraídos. Todos os momentos foram muito importantes, sou muito grata por termos vivido a evolução dessa amizade e a nossa evolução pessoal ao longo de todos esses anos.

Agradeço especialmente aos técnicos, pela execução de seus trabalhos que movem o laboratório. Ao Valter A. Baura (futuro Doutor em Ciências – Bioquímica), que me chama carinhosamente de Patrícia desde que entrei no laboratório, tenho grande admiração pela pessoa que é e muito obrigada por esse humor contagiante. À D. Roseli Prado, sempre querida, atenciosa, esbanjando um humor leve e sempre pronta para ajudar como for preciso. E à Bruna Zanetti, pela amizade e dedicação despendida na realização de seu trabalho.

Agradeço as alunas de iniciação científica, Sarah E. S. Cupertino e Isabelle Daru, que participaram da execução desse projeto. Agradeço por toda a colaboração na realização do trabalho e pelo aprendizado que obtive ao treiná-las.

Aos meus colegas de trabalho, especialmente aos amigos das salas 271 e 272, a 272 tão pequena e agora tão vazia. Paloma, Rocío, Rafaela, Leilane, Steve, Sarah e Fernanda, agradeço pelos momentos de descontração, pelo auxílio e pelas conversas. Edileusa (agora mãe da Mariana, e com quem compartilho praticamente o mesmo tempo de laboratório), Ana, Erick, Andrey, Thiago vocês todos são demais e guardo com carinho as memórias que construímos juntos. Obrigada Edi e Ana pelos vários almoços que compartilhamos juntas.

Obrigada Heloísa S. Sanchuki (agora também mãe do Eduardo) e Fernanda Gravina, minhas colegas de turma e agora amigas que vou levar no coração para o resto da vida. Vocês tornaram essa jornada muito melhor. Quantas vezes nos abraçamos, choramos e sorrimos, tanto pelos acontecimentos em nossas vidas acadêmicas quanto na vida pessoal. Muito obrigada por passarmos por isso juntas. Amo vocês!

Agradeço também a Marina S. Cotta pela amizade, e por mesmo não sermos tão próximas, podermos contar uma com a outra. Tenho muito carinho pela nossa história, pois compartilhamos muitas experiências em comum, desde a nossa turma da Graduação, a primeira do famoso currículo novo de Ciências Biológicas da UFPR e aqui estamos finalizando nossos Doutorados, com o mesmo orientador.

À minha família, minha fortaleza. Sem vocês nada disso seria possível, amo todos vocês incondicionalmente. Meus pais Marinda e Lourenço Chicora, que mesmo com a vida humilde que sempre tivemos, sempre fizeram de tudo para que os estudos na minha vida e na vida dos meus irmãos fossem primordiais. A caminhada até aqui não foi fácil, cheia de dificuldades, vencendo barreiras e minhas próprias limitações, fazendo com que muitas coisas passassem pela cabeça, mas hoje sou muito grata por concluir essa etapa. Vocês foram a minha principal motivação. Esse Doutorado é para vocês.

Meus irmãos Edina, Vi e Thi, nem tenho palavras também para agradecê-los. Cada um me ajudou e fortaleceu como pode e só tenho a agradecer por serem vocês, os meus irmãos. Thi, passamos na UFPR no mesmo ano, o que fez essa experiência ser muito mais inesquecível para mim, obrigada por ser meu irmão mais velho que sempre foi meu companheiro para tudo. Vi, você sabe o quanto você fez diferença

na minha vida, minha confidente, sempre me ajudou a ter confiança em mim mesma e me ajudou a acreditar que eu conseguiria e que isso tudo seria possível, eu não teria conseguido sem você. Edina, mesmo separadas por milhares de quilômetros, sempre esteve presente na minha vida e sempre me ajudou muito, obrigada por tudo.

João, a você só tenho a agradecer. Na metade do Doutorado, passamos a compartilhar o mesmo teto, então você viveu esses últimos dois anos desse Doutorado comigo. Obrigada mesmo por tudo, pela compreensão, paciência, por sempre me ajudar com o que fosse preciso, pela motivação diária e por acreditar em mim. A sua presença na minha vida nessa fase, foi a força que me faltava, e se em algum momento pensei em desistir, pensei antes na minha família. Por vocês não desisto de nada.

Tia Terezinha, Erika e Yuri, minha família também, obrigada pelo apoio sempre.

Agradeço aos meus amigos fora da vida acadêmica, essenciais para manter a cabeça no lugar. Thaís e Ricardo, Andressa, Talita e Isa, vocês sempre estiveram comigo. Obrigada por tudo, amo vocês demais.

Agradeço também aos meus amigos do time de futebol (Karina, Thiago, Will, Lu, Nani, Henrique, Monique, Cadu, Airton, Marcia, Kinder, Gabi, André, Carol, Miguel, Fernando) pelos ótimos momentos de descontração juntos. Com vocês pude compartilhar um pouco da importância na Ciência no mundo e principalmente no Brasil.

Por fim, agradeço a Deus, por permitir que todas as coisas sejam possíveis.

A mente que se abre a uma nova ideia, jamais volta ao seu tamanho original.

**Albert Einstein**

Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.

**Stephen Hawking**

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 são bactérias diazotróficas que se associam de maneira benéfica ou fitopatogênica à gramíneas de interesse comercial. Os mecanismos moleculares pelos quais a interação entre *Herbaspirillum*-planta é viabilizada, estão cada vez mais elucidados, no entanto, ainda há muito para ser respondido. Evidências em outros gêneros e espécies de bactérias capazes de interagir com plantas, tem mostrado que o *pili* do tipo IV (T4P), uma estrutura fina e alongada, composta de subunidades da proteína pilina, está envolvido na interação com a planta hospedeira. O T4P também exerce papel sobre tipos específicos de motilidade, denominados *twitching* e *swarming motility*, além de desempenharem participação sobre a formação de biofilme em superfícies abióticas e bióticas. Assim, este trabalho tem o intuito de caracterizar a estrutura e função do T4P em *Herbaspirillum* spp. Para isso, genes do T4P tiveram a expressão relativa avaliada através da RT- qPCR e estirpes mutantes foram obtidas para 5 dos 29 genes homólogos ao T4P em *H. seropedicae* SmR1 e para mais 4 genes em *H. rubrisubalbicans* M1. *Herbaspirillum* spp. expressa os genes *pilA*, *pilT1* e *pilT2* quando aderido ao milho e as estirpes mutantes para os mesmos genes e, para o gene *pilN*, indicam que há diferenças no momento da colonização. Também foram observadas diferenças na formação do biofilme e nas motilidades *swimming* e *swarming*. Uma análise de microscopia de transmissão revelou estruturas muito semelhantes ao T4P, tanto na estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1, quanto na estirpe mutante, SmR1 $\Delta$ pilT2. Observamos que esse mutante também produz a proteína flagelina em maior quantidade (unidade protéica do flagelo) e que provavelmente, por este motivo, consiga se mover mais que a estirpe selvagem. Assim, os genes do T4P aqui avaliados, quando transcritos e traduzidos, geram proteínas que executam papéis importantes no meio que estão, possibilitando ao *Herbaspirillum* spp. sucesso no estabelecimento com seus hospedeiros.

Palavras-chaves: *Herbaspirillum seropedicae*. *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Pili* tipo IV.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 are diazotrophic bacteria that associate in a beneficial or phytopathogenic manner to grasses of commercial interest. The molecular mechanisms through which the interaction between *Herbaspirillum*-plant is feasible, are increasingly elucidated, however, there is still much to be answered. Evidence in other genera and species of bacteria capable of interacting with plants has shown that type IV pili (T4P), a thin, elongated structure composed of pilin protein subunits, is involved in the interaction with the host plant. T4P also plays a role in specific motility types, called *twitching* and *swarming* motility, and plays a role in biofilm formation on abiotic and biotic surfaces. Thus, this work intends to characterize the structure and function of T4P in *Herbaspirillum* spp. For this, T4P genes had the relative expression evaluated through RT-qPCR and mutant strains were obtained for 5 of the 29 T4P homologous genes in *H. seropedicae* SmR1 and for another 4 genes in *H. rubrisubalbicans* M1. *Herbaspirillum* spp. expresses the *pilA*, *pilT1* and *pilT2* genes when adhered to maize and the mutant strains for the same genes and, for the *pilN* gene, indicate that there are differences at the time of colonization. Differences in biofilm formation and *swimming* and *swarming* motility were also observed. Transmission electron microscopy analysis revealed structures very similar to T4P, both in the wild-type *H. seropedicae* SmR1 strain, and in the mutant strain, SmR1 $\Delta$ pilT2. We observed that this mutant also produces the flagellin protein in greater quantity (protein unit of the flagellum) and that probably, for this reason, can move more than the wild strain. Thus, the T4P genes evaluated here, when transcribed and translated, generate proteins that perform important roles in the medium they are, enabling *Herbaspirillum* spp. success with their hosts.

**Key words:** *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, Type IV pili.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral da estrutura do <i>pili</i> tipo IVa. ....	27
Figura 2 - Tipos de motilidade utilizadas pelas bactérias. ....	33
Figura 3 - Quantificação relativa da expressão gênica em <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 e <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1. ....	62
Figura 4 - Construção dos mutantes com genes do T4P truncados de <i>H. seropedicae</i> SmR1 .....	6265
Figura 5 - Construção dos mutantes com genes do T4P truncados de e <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 .....	65
Figura 6 - Confirmação da construção dos mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1 e <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 genes <i>pili</i> tipo IV. ....	65
Figura 7 - Seleção de colônias com perfil do gene deletado para o gene <i>pilT1</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1. ....	66
Figura 8 - Curva de crescimento de estirpes selvagens e mutantes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1. ....	67
Figura 9 - Curva de crescimento de estirpes selvagens e mutantes de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1. ....	68
Figura 10 - Formação de biofilme em fibra de vidro pelas estirpes selvagem <i>H. seropedicae</i> SmR1 e <i>H. rubrisubalbicans</i> M1, e, seus respectivos mutantes, SmR1 $\Delta$ <i>pilT2</i> E M1 $\Delta$ <i>pilA</i> . ....	69
Figura 11 - Crescimento em ágar 1% para avaliar a motilidade do tipo <i>twitching</i> . ....	70
Figura 12 - Ensaio de <i>swarming</i> em diferentes concentrações de ágar com as estirpes selvagens e mutantes de <i>Herbaspirillum</i> spp. ....	71
Figura 13 - Ensaio de <i>swarming</i> e <i>swimming motility</i> das estirpes mutantes e selvagem de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1. ....	72
Figura 14 - Ensaio de <i>swarming</i> e <i>swimming motility</i> das estirpes mutantes e selvagem de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1. ....	73
Figura 15 - Diâmetro dos halos em centímetros em ágar 0,3%. ....	73
Figura 16 - Micrografias obtidas da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) ..	75
Figura 17 - Micrografias obtidas da microscopia eletrônica de transmissão (TEM). ..	76
Figura 18 - Eletforese das frações adquiridas das proteínas de superfície. ....	77
Figura 19 - análise no <i>software</i> MASCOT (MATRIX SCIENCE) para identificação de proteínas. ....	78

Figura 20 - Ensaio de colonização epifítica em raízes de milho indica a importância de genes T4P para o estabelecimento de *H. seropedicae* durante a colonização.....80

Figura 21 - Ensaio de colonização endofítica em raízes de milho indica a importância de genes T4P para o estabelecimento de *H. seropedicae* durante a colonização...81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estirpes de bactérias utilizadas e suas características. ....	39
Tabela 2 - Características dos plasmídeos utilizados. ....	40
Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para análise de expressão gênica por RT-qPCR. ....	42
Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho. ....	46
Tabela 5 - Estratégias usadas para mutagênese de cada gene. ....	52
Tabela 6 - Genes do T4P de <i>Herbaspirillum</i> spp. mutados e estratégia utilizada para mutação .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	<i>threshold cycle</i>
Cm	Cloranfenicol
DEPC	Dicarbonato de dietila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO <sub>595nm</sub>	Densidade óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPEC	<i>Enteropathogenic E. coli</i>
EPS	Exopolissacarídeos
H.	<i>Herbaspirillum</i>
Km	Canamicina
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted laser desorption</i>
mL	Mililitro
MW	<i>Molecular weight</i>
P.	<i>Pseudomonas</i>
pb	Pares de base
PBB	<i>Pilus Bundling Buffer</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDB	<i>Pilus Disaggregation Buffer</i>
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
RT – qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Sm	Estreptomicina
SST3	Sistema de secreção do tipo III
T4P	<i>Type four pili</i> (pili tipo IV)
TAE	Tris, ácido acético, EDTA
Tris	(Hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
2.1 INTERAÇÃO PLANTA BACTÉRIA.....	22
2.2 O GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> .....	22
2.3 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	23
2.4 <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> .....	23
2.5 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ASSOCIAÇÃO E O PROCESSO DE COLONIZAÇÃO EM <i>Herbaspirillum</i> spp. ....	24
2.6 <i>PILI</i> DO TIPO IV (T4P) .....	25
2.7 ESTRUTURA E DINÂMICA DO T4P .....	26
2.7.1 O <i>pili</i> e as pilinas .....	26
2.7.2 A secretina .....	28
2.7.3 O subcomplexo de alinhamento .....	29
2.7.4 O subcomplexo motor .....	29
2.8 O T4P E <i>Herbaspirillum</i> spp. ....	30
2.9 MOTILIDADES E O <i>TWITCHING MOTILITY</i> .....	32
2.10 O T4P E AS BACTÉRIAS ASSOCIADAS À PLANTAS.....	34
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
5.1 BACTÉRIAS .....	39
5.2 PLASMÍDEOS .....	40

5.3 CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO .....	41
5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DO <i>PILI</i> TIPO IV.....	41
5.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores para RT-qPCR.....	41
5.4.2 Preparação de amostras e condições experimentais.....	42
5.4.3 Extração de RNA total.....	43
5.4.4 Tratamento com DNase .....	44
5.4.5 Reação da transcriptase reversa (RT) para formação de cDNA e qPCR.....	44
5.4.6 Quantificação Relativa.....	45
5.5 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA.....	46
5.5.1 Amplificação de DNA por PCR.....	46
5.5.2 Extração de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão .....	47
5.5.3 Digestão de DNA por endonuclease de restrição.....	48
5.5.4 Ligação de fragmentos de DNA .....	48
5.5.5 MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	49
5.5.6 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES .....	49
5.5.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO.....	50
5.5.8 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEO PARA ESTIRPES DE <i>Herbaspirillum</i> POR CONJUGAÇÃO.....	50
5.6 ESTRATÉGIA PARA MUTAGÊNESE DOS GENES <i>pilA</i> , <i>pilN</i> , <i>pilT1</i> E <i>pilT2</i> DE <i>H. seropedicae</i> E SmR1 E <i>H. rubrisubalbicans</i> M1.....	51
5.6.1 Construções plasmidiais para mutagênese usando a estratégia 1 .....	51
5.6.2 Construções plasmidiais para mutagênese usando a estratégia 2 .....	53
5.6.3 Construção do mutante <i>pilT1</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1 .....	53
5.7 CURVA DE CRESCIMENTO ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPE MUTANTE....	54
5.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO .....	54
5.9 ENSAIO DE <i>TWITCHING</i> , <i>SWARMING</i> E <i>SWIMING</i> MOTILITY.....	55
5.10 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE.....	55

5.10.1	Preparo das amostras .....	55
5.10.2	Purificação das proteínas .....	56
5.10.3	Separação das proteínas de superfície por SDS-PAGE .....	56
5.10.4	Identificação das proteínas de superfície de <i>H. seropedicae</i> por MALDI-TOF/MS.....	56
5.11	ENSAIOS <i>IN PLANTA</i> .....	57
5.11.1	Preparação de sementes de milho .....	57
5.11.2	Ensaio de colonização superficial às raízes de milho pelas estirpes de <i>Herbaspirillum</i> sp. selvagens e mutantes .....	58
5.11.3	Ensaio de colonização interna às raízes de milho das estirpes de <i>Herbaspirillum</i> sp. selvagens e mutantes .....	58
5.12	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	58
5.12.1	Preparo de amostras para microscopia.....	58
5.12.2	Método e coloração negativa para contrastação das amostras .....	59
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
6.1	A EXPRESSÃO DE GENES DO T4P E FLAGELO É ALTERADA NA INTERAÇÃO COM A PLANTA.....	60
6.2	CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES PARA GENES NO T4P EM <i>Herbaspirillum</i> spp. ....	63
6.2.1	Obtenção de estirpes mutantes para genes do T4P em <i>Herbaspirillum</i> spp....	64
6.2.2	Construção do mutante <i>pilT1</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1 .....	66
6.3	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS MUTANTES PARA GENES DO T4P EM <i>Herbaspirillum</i> spp.....	67
6.3.1	Perfil de crescimento entre estirpes selvagens e mutantes para genes do T4P .....	67
6.3.2	Os genes do T4P de <i>Herbaspirillum</i> spp. têm influência na capacidade formadora de biofilme .....	68

6.3.3. Genes do T4P atuam na motilidade por <i>twitching</i> e <i>swarming</i> em <i>H. seropedicae</i> SmR1 e <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 .....	69
6.3.4 Identificação e caracterização da estrutura do T4P em <i>Herbaspirillum</i> spp. ....	74
6.3.5 Extração de proteínas de superfície .....	77
6.3.6 Caracterização funcional de genes do T4P .....	78
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Herbaspirillum frisingense* são os representantes diazotróficos do gênero *Herbaspirillum*, encontrados associados com gramíneas de grande interesse comercial, como milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar e forrageiras (BALDANI et al., 1986; HALE & WILK, 1972; BALDANI et al., 1996; KIRCHHOF et al., 2001).

Um grande interesse em entender e descobrir os mecanismos moleculares envolvidos durante a interação planta-bactéria tem crescido ao longo dos anos, a fim de desvendar todo o processo de colonização (MONTEIRO et al. 2012a). Com o sequenciamento do genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 por Pedrosa e colaboradores (2011), foram identificados genes descritos no envolvimento da interação de espécies de bactérias com a planta, como genes homólogos aos genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeos (LPS), exopolissacarídeos (EPS), Sistema de Secreção do Tipo III (SST3), *pili* Tipo IV (T4P) e adesinas/hemaglutininas. Alguns destes mecanismos foram elucidados em *Herbaspirillum* spp. (MONTEIRO et al., 2012a).

Os genes do *pili* Tipo IV (T4P) aparecem bem distribuídos entre bactérias gram-negativas e gram-positivas e a estrutura desempenha um papel importante na colonização de hospedeiros, de superfícies abióticas, na virulência a alvos suscetíveis, formação de biofilme, e tipos particulares de motilidade, como o *twitching* e *swarming motility* (MATTICK, 2002). Possui formato filamentar e é estruturado por um sistema complexo de proteínas, responsáveis por polimerizar e despolimerizar (via retração) as pilinas (unidade proteica básica, que forma o filamento), e estabilizar a base do *pili* e o poro (por onde ocorre a extrusão do *pili* para o meio externo). Assim, além dos genes *pil* identificados no genoma de *H. seropedicae* SmR1 relacionados ao T4P (PEDROSA et al., 2011) análises transcriptômicas do diazotrofo associado a raízes de milho, trigo e arroz, foram conduzidas, identificando genes do T4P diferencialmente expressos durante essas interações. Nos estudos de Brusamarello-Santos e colaboradores (2018), o gene *pilZ*, durante a associação de *H. seropedicae* com raiz de arroz, apresentou expressão 2x maior, em relação à estirpe selvagem. Balsanelli e colaboradores (2015), verificaram os genes diferencialmente expressos no primeiro e terceiro dias após a inoculação em raízes de milho, avaliando as células

planctônicas e epifíticas. Dessa forma, observaram que os genes que codificam o T4P foram pouco expressos em bactérias cultivadas em meio mínimo. No entanto, o gene Hsero\_0816 (*pilT*) não foi expresso. Nas células planctônicas, após um dia a inoculação, a expressão dos genes *pilOPQRSM* aumentou 10 vezes, sugerindo um papel inicial do T4P na colonização das plantas. Pankievickz e colaboradores (2015) também verificaram, pela análise do transcriptoma por RNA-seq, de *H. seropedicae* SmR1 aderido a raízes de trigo, a expressão de genes *pilT* e *pilI*, envolvidos com T4P. Ainda, no mesmo estudo, análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram estruturas similares ao T4P, sugerindo o envolvimento na interação. Em *H. rubrisubalbicans*, também foram observadas estruturas semelhantes no biofilme em lamínulas de vidro, pelo mesmo tipo de microscopia (TULESKI et al, 2019).

Genes homólogos ao T4P também foram encontrados no genoma de outras espécies do gênero *Herbaspirillum*, como em *H. frisingense* GSF30 (STRAUB et al., 2013), *H. rubrisubalbicans* M1, e nas estirpes Os34 (YE et al. 2012) e Os45 (ZHU et al., 2012) de *H. seropedicae*.

Com as evidências genômicas e transcriptômicas, observa-se que o T4P pode ser importante para interação/associação *Herbaspirillum*-planta e *Herbaspirillum*-meio. Dessa forma, este trabalho visa investigar o papel do *pili* Tipo IV de *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 na interação planta-bactéria, formação de biofilme e motilidade, pois o T4P participa dessas funções em diversas espécies de bactérias. Assim, propõe-se a construção de estirpes mutantes para os genes *pilA*, *pilN*, *pilT1* e *pilT2* de ambas as espécies, uma vez que esses genes apresentam homologia que indica serem fundamentais na montagem e funcionamento do *pili*. Por exemplo, o gene *pilA* codifica a pilina principal que é polimerizada com outras pilinas e forma o *pili* propriamente dito. O gene *pilN* codifica a proteína de mesmo nome, que participa de um complexo com outras proteínas, que mantêm a estabilidade do *pili*. A proteína PilT, codificada pelo gene *pilT*, tem participação ativa na retração do *pili*, e por isso pode desempenhar papel importante na motilidade do tipo *twitching*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INTERAÇÃO PLANTA BACTÉRIA

Nos anos 50, a bactéria associativa *Beijerinckia fluminesis* foi isolada da rizosfera de cana-de-açúcar (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958). Desde então, despertou-se interesse em estudar o uso da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em plantas não leguminosas e, após a redescoberta do gênero *Azospirillum*, cientistas do mundo inteiro passaram a se interessar por bactérias diazotróficas associadas com gramíneas (BALDANI et al., 1997). O isolamento de bactérias utilizando meio de cultura semi-sólido permitiu o conhecimento de novas espécies fixadoras de nitrogênio, dentro dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Glucanacetobacter* e *Paraburkholderia* (KIRCHHOF et al., 1997). Essas novas espécies estavam principalmente associadas com gramíneas e eram organismos endofíticos, encontrados nos tecidos das plantas hospedeiras.

As bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas podem ser agrupadas em 3 categorias: microrganismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (BALDANI et al., 1997). Na primeira categoria estão agrupadas as espécies que colonizam a porção superficial das raízes. Na segunda, estão aquelas capazes de colonizar tanto internamente como externamente as raízes, enquanto no terceiro grupo, estão as bactérias que colonizam o interior das raízes e porções aéreas das plantas. Segundo Kloepper *et al.* (1992), o termo endofítico refere-se às bactérias presentes dentro dos tecidos internos da epiderme. Nos diazotróficos, a amônia, resultante da redução do N<sub>2</sub> atmosférico pela nitrogenase, é rapidamente incorporada ao metabolismo bacteriano. Explorar a ocorrência natural da associação simbiótica bactéria-plantas é uma alternativa interessante e viável para ampliar o fornecimento de nitrogênio para as plantas de importância econômica (DÖBEREINER, 1992).

### 2.2 O GÊNERO *Herbaspirillum*

Bactérias que compõe o gênero *Herbaspirillum*, pertencem à família Oxalobacteraceae e Classe  $\beta$  do filo Proteobacteria. Apresentam células gram-

negativas, com formato geralmente vibrióide ou em espiral, com tamanho entre 0,6 a 0,7  $\mu\text{m}$  (BALDANI et al., 1986). As bactérias do gênero apresentam uma diversidade metabólica muito interessante, algumas são capazes de fixar nitrogênio e colonizar tecidos de plantas, outras foram isoladas de água limpa ou contaminada, ou ainda em diferentes tipos de solos. Também foram encontrados em fezes humanas, e até mesmo participando como oportunistas em infecções de pacientes imunodeprimidos. Apresentam ocorrência no mundo amplamente distribuída e atualmente o gênero possui 13 espécies e duas subespécies descritas. (ARGNO & SCHELEGEL, 1978; BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1992; BALDANI et al., 1996; BAE et al., 1996; KIRCHHOF et al., 2001; DING & YOKOTA, 2004; IM et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006; ROTHBALLER et al., 2006; DOBRITSA et al., 2010; LAGIER et al., 2012; BAJERSKI et al., 2013).

### 2.3 *Herbaspirillum seropedicae*

*Herbaspirillum seropedicae* é um microrganismo diazotrófico endofítico e foi a primeira espécie do gênero *Herbaspirillum* descrita, isolado de raízes lavadas e esterilizadas de milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e arroz (*Oryza sativa*) (BALDANI et al., 1986). Mais tarde, além da associação com essas gramíneas, também foi identificado associado à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) (OLIVARES et al., 1996) e plantas não gramíneas, como abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) e bananeira (*Musa* sp.) (CRUZ et al., 2001). É capaz de aprimorar a produtividade e o crescimento vegetal através do acúmulo de nitrogênio, como observado quando associado com um cultivar específico de arroz, tolerante à alumínio (GYANESHWAR et al., 2001).

### 2.4 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Em 1996, Baldani e colaboradores reclassificaram a bactéria *Pseudomonas rubrisubalbicans* como uma nova espécie do gênero *Herbaspirillum* passando a ser chamada de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Foi isolada a primeira vez das folhas doentes de cana-de-açúcar, sendo considerada causadora da doença da estria mosqueada (HALE & WILK, 1972). Além disso, mais tarde, verificou-se que em algumas variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

(cultivar B-4362), *H. rubrisubalbicans* pode atuar como fitopatógeno (PIMENTEL et al., 1991, BALDANI et al., 1996; JAMES et al., 1997; OLIVARES, et al., 1997, TAN et al., 2010) e em outras não causa doença (OLIVARES et al., 1997), podendo promover o crescimento vegetal em arroz, sorgo e trigo (RADWAN et al, 2004; CHAVES et al., 2015). A necrose do tecido foliar em algumas cultivares ocorre, possivelmente, por colonizar densamente o meta- e proto-xilema, ocasionando o entupimento dos vasos e diminuição da fotossíntese (JAMES et al., 1997; OLIVARES et al., 1997).

## 2.5 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ASSOCIAÇÃO E O PROCESSO DE COLONIZAÇÃO EM *Herbaspirillum* spp.

Balsanelli e colaboradores (2015) propuseram um modelo do estabelecimento da associação de *H. seropedicae* SmR1 com a planta, baseado no perfil transcricional da bactéria, avaliando células planctônicas e aderidas à raiz de milho após 1 e 3 dias a inoculação. Nesse modelo, no início da interação, há um acúmulo de energia ou carbono, na forma de polihidroxi butirato (PHB), e há assimilação de nitrogênio por FBN ou por outras fontes disponíveis. Em seguida, através de sistemas específicos de quimiotaxia, as células planctônicas encontram a raiz e se fixam usando o T4P e lipopolissacarídeos.

Na colonização endofítica, sugere-se que *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* aderidos à superfície da raiz, conseguem penetrar para colonizar o interior da raiz através dos pontos de emergência das raízes laterais ou onde há fissuras. Em seguida, os espaços intercelulares são ocupados e os demais tecidos como aerênquima e xilema são atingidos, até alcançar caules e folhas da planta (JAMES & OLIVARES, 1998; JAMES et al., 2002; RONCATO-MACCARI et al., 2003; MONTEIRO et al., 2008).

*H. seropedicae* SmR1, necessita de LPS para a colonização em milho, pois mutantes de genes relacionados à síntese de LPS apresentaram uma queda significativa de bactérias aderidas à raiz de milho, em comparação com a estirpe selvagem (BALSANELLI et al., 2010). No entanto, EPS parecem não participar da colonização das plantas por *H. seropedicae* SmR1, uma vez que a estirpe mutante para o gene *espB*, que participa da síntese de EPS, não apresentou diferença significativa na colonização em relação à estirpe selvagem, mas houve diferença na

produção de biofilme em superfície abiótica (BALSANELLI et al., 2014). Além disso, os genes envolvidos na biossíntese de EPS, apareceram reprimidos com a bactéria associada à raiz de milho (BALSANELLI et al., 2015; BALSANELLI et al., 2014)

Estudos realizados por Schmidt e colaboradores (2012) mostraram que o Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) é requerido durante a colonização de *H. rubrisubalbicans* M1 em plantas hospedeiras. Observou-se a redução das bactérias associadas ao arroz e nenhuma hipersensibilidade em *Vigna unguiculata* quando esse sistema foi mutado. Monteiro e colaboradores (2012) e Tuleski e colaboradores (2019) detectaram a importância de genes envolvidos com a produção de celulose em *H. rubrisubalbicans*, atuando nas colonizações epifíticas e endofíticas, e nas interações benéficas e fitopatogênicas.

## 2.6 PILI DO TIPO IV (T4P)

O *pili* do tipo IV (T4P – “*type four pill*”) é um apêndice filamentosos flexível e fino, composto por polímeros de pilina e está amplamente distribuído entre integrantes do Domínio Bacteria (Filos Cianobactéria, Firmicutes e classes  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  das Proteobactérias) (BURDMAN et al., 2011; BURROWS, 2012) e Archaea (MARAKOVA et al., 2016). Inicialmente, acreditava-se que apenas bactérias gram-negativas possuíam o T4P, uma vez que as proteínas do aparelho de montagem do *pili* abrangem as membranas bacterianas interna e externa e o periplasma (MELVILLE & CRAIG, 2013).

O T4P pode desempenhar variadas funções quando as células dos microrganismos interagem com diferentes superfícies, que podem ser outras células da mesma espécie, células eucarióticas ou até mesmo superfícies abióticas e pouco hidratadas. Por exemplo, já foi relatada a participação do T4P em virulência, formação de biofilme (MARKO et al., 2018; BAHAR et al., 2009; TAGUCHI & ICHINOSE, 2011), motilidades denominadas “*twitching motility*” (“motilidade em espasmos”) e *swarming motility* (“motilidade de enxame”) (MATTICK, 2002), transferência horizontal de genes (HAN et al., 2007; AVERHOFF & FRIEDRICH, 2003) e transporte de elétrons (REGUERA et al., 2005).

## 2.7 ESTRUTURA E DINÂMICA DO T4P

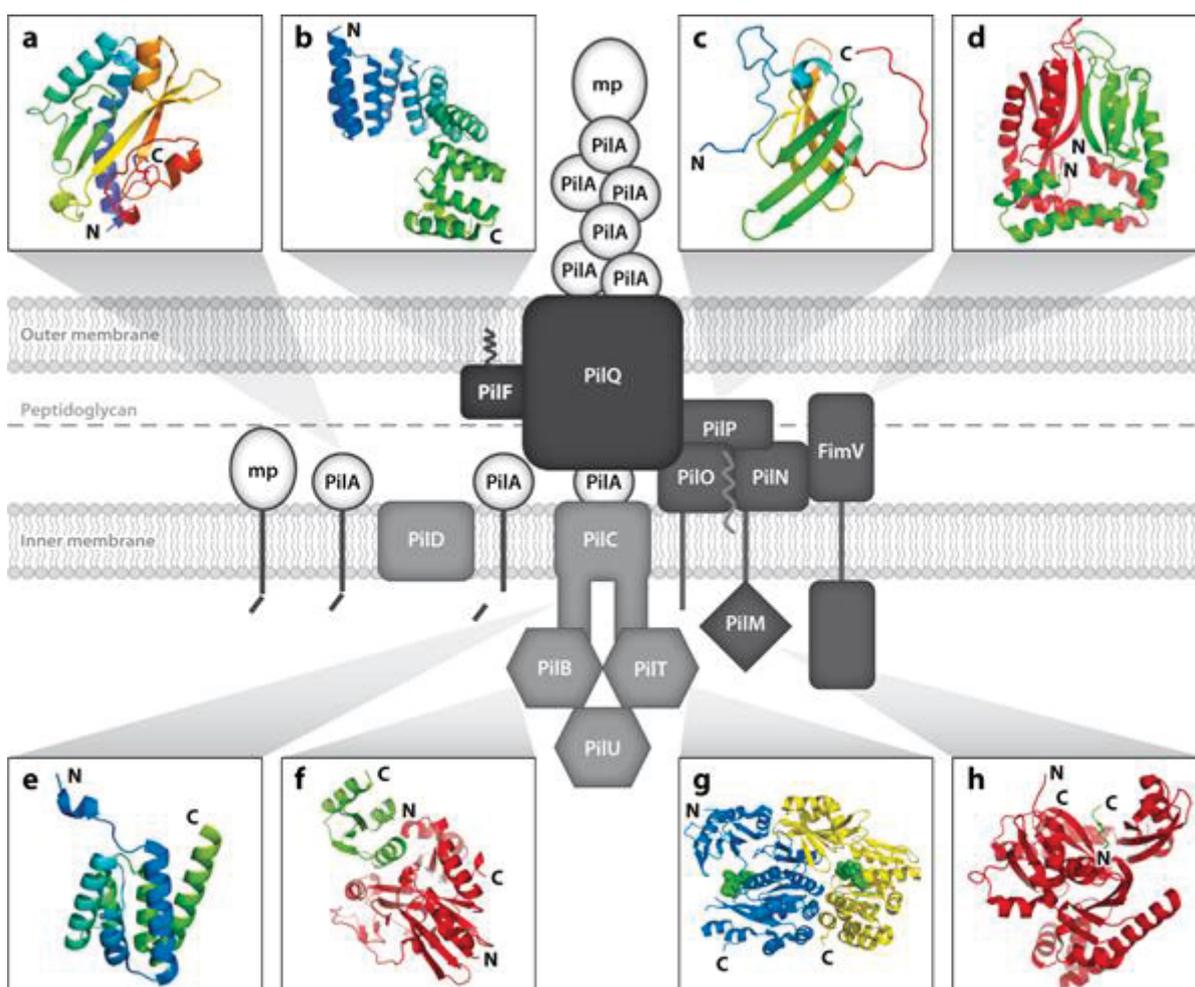
*Pseudomonas aeruginosa* tem emergido como modelo de investigação da estrutura e função do T4P, principalmente por ser um patógeno humano geneticamente suscetível e, por isso, há inúmeros estudos que tentam desvendar o funcionamento desse sistema que envolve proteínas muito interessantes (BURROWS, 2012).

O T4P é composto por uma variedade de proteínas que estão relacionadas com a montagem e desmontagem do *pili*, além da ancoragem e manutenção da estrutura nas membranas e da sua regulação. A maquinaria de montagem do *pili* pode ser subdividida em 4 subcomplexos principais: secretina da membrana externa, subcomplexo motor, subcomplexo de alinhamento e o *pili* propriamente dito (LEIGHTON et al., 2015). Juntos, são responsáveis pela montagem e funcionamento do *pili*. A Figura 1 mostra as principais proteínas envolvidas nesses processos.

### 2.7.1 O *pili* e as pilinas

Caracterizado como uma estrutura extremamente fina, o T4P possui espessura menor que 8 nm e os filamentos são constituídos por milhares de cópias de monômeros da proteína pilina. As pilinas ficam armazenadas na forma de pré-pilinas, com o domínio C-terminal no espaço periplasmático e o N-terminal no citoplasma (STROM & LORY, 1993). O N-terminal é conservado entre vários organismos e é denominado peptídeo de sinal de classe III, possuindo um curto peptídeo hidrofílico líder, seguido por um trecho de resíduos hidrofóbicos (SZABÓ et al., 2007). O peptídeo líder termina com uma glicina, que precede o local de clivagem. Para ser clivada, a pré-pilina é translocada pela membrana interna e a sequência de sinal do lado citoplasmático da membrana é removida por uma pré-pilina peptidase, chamada PilD, pois somente a pilina processada pode ser polimerizada (LAPOINTE & TAYLOR, 2000; LORY & STROM, 1997). Quando clivada, a pré-pilina é denominada pilina madura, caracterizada por possuir frequentemente no N-terminal, um resíduo de fenilalanina N-metilado, e, com menos frequência, de metionina, seguido dos 20 a 25 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos conservados e uma ligação dissulfeto no C-terminal, devido a dois resíduos de cisteína. Além disso, as pilinas variam muito em

tamanho e estrutura, embora compartilhem uma arquitetura geral (CRAIG, PIQUE & TAINER, 2004; BERRY & PELICIC, 2015).



**AR** Burrows LL. 2012.  
Annu. Rev. Microbiol. 66:493–520

Figura 1- ESQUEMA GERAL DA ESTRUTURA DO *pili* TIPO IVa. A montagem do sistema T4P compreende a interação de quatro subcomplexos. O complexo da membrana externa (PiIF e PilQ) estão coloridos em cinza escuro; o subcomplexo motor da membrana interna (PiIB, PiIC, PiID, PiIT e PiIU) estão em cinza claro; o subcomplexo de alinhamento (PiIM, PiIN, PiIO, PiIP e FimV) estão em cinza médio; e o subcomplexo *pili* (pilinas menores: FimU, PiIV, PiIW, PiIX e PiIE; pilina principal: PiIA) estão representadas em branco. a), b), c), d), e), f) g) e h) representam a estrutura de cada proteína.

FONTE: Modificado de BURROWS, 2012.

As pilinas são classificadas em dois subtipos: pilinas do tipo IVa (T4aP) e tipo IVb (T4bP), distintas pelo tamanho do peptídeo de sinal e da pilina madura (PELICIC, 2008). As pilinas do tipo IVa são amplamente distribuídas e compartilham maior homologia nas sequências do N-terminal entre vários microrganismos, os quais têm como hospedeiros plantas, humanos e mamíferos, como por exemplo *Neisseria* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Dichelobacter nodosus*, *Moraxella bovis*, *Eikenella corrodens*, *Azoarcus* sp., *Myxococcus xanthus*, *Bdellovibrio bacteriovorus*. Tendem a ter peptídeos de sinal mais curtos (entre 5 a 7 resíduos de aminoácidos), pilinas maduras médias (150 resíduos de aminoácidos) e possuem uma arquitetura mais simples.

As pilinas do tipo IVb exibem sequências maduras mais longas (190 resíduos de aminoácidos) e peptídeos de sinal também mais longos (15 a 30 resíduos de aminoácidos). Possuem uma arquitetura mais complexa e formam um grupo mais heterogêneo. A classe monofilética de pilinas Tad está incluída no grupo do T4bP, apresentam sequência de sinal de tamanho variável (10 a 26 resíduos de aminoácidos) e pilinas maduras pequenas (90 resíduos de aminoácidos). Na subfamília T4bP, são comuns as espécies entéricas como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* (EPEC) e *Salmonella entérica*. As pilinas Tad são encontradas em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Caulobacter crescentus* (BURROWS, 2012; CRAIG, PIQUE & TAINER, 2004).

### 2.7.2 A secretina

O T4P atinge o meio externo através da secretina, a qual permite a passagem do *pili* pela membrana externa (ausente em sistemas de bactérias Gram-positivas). Consiste pela proteína PilQ, um oligômero de 12 a 14 subunidades, apresentando estrutura de barril  $\beta$  transmembrana e a lipoproteína PilF, responsável pela multimerização e localização da secretina PilQ na membrana externa (KOO et al, 2008, GOLD et al., 2015).

### 2.7.3 O subcomplexo de alinhamento

O subcomplexo de alinhamento é formado pelas proteínas PilM, PilN, PilO e PilP e tem o papel de interligar o complexo motor com a secretina PilQ. PilN e PilO formam um heterodímero estável e constroem a base de ancoragem do complexo PilM/N/O/P na membrana interna, tornando esse complexo essencial para a montagem do *pili* funcional (AYERS, *et al.* 2009). As proteínas PilO e PilN possuem uma organização semelhante e são precedidas por um curto N-terminal citoplasmático, um único domínio transmembrana e um C-terminal periplasmático com uma longa região espiralada (SAMPALANU *et al.*, 2009). Tammam e colaboradores (2013) também verificaram mais tarde, que PilP forma um heterodímero estável com PilO e PilN, sendo a ponte que interliga os complexos de membrana interna e externa. A cauda N-terminal citoplasmática de PilN interage com a proteína PilM, conectando todos os compartimentos celulares através da rede de interação das proteínas PilMNOPQ.

### 2.7.4 O subcomplexo motor

O complexo motor realiza a extensão e retração do *pili*, no entanto os mecanismos envolvidos nestes processos são compreendidos parcialmente. Na extensão do *pili*, ocorre a polimerização, as subunidades de pilina são adicionadas na base do *pili*, originárias do reservatório na membrana interna (CRAIG *et al.*, 2007), onde são processadas pela proteína PilD, uma pré-pilina peptidase ligada à membrana, que remove a sequência de sinal nos N-terminais das pilinas, e N-metila o novo terminal (STROM, NUNN & LORY, 1993). Na retração do *pili* há a despolimerização, em que as subunidades de pilina da base são removidas e transferidas para a membrana interna, ocorrendo assim, a reciclagem das pilinas (MORAND *et al.*, 2004; SKERKER & BERG, 2001). Essa dinâmica de extensão e retração de T4P é realizada por dois membros da Família de ATPases de secreção: PilB e PilT. Ambas as proteínas, contêm motivos de ligação ao nucleotídeo, motivos *Walker box*, indicando atividade NTPase e podem, portanto, ser motores (MATTICK, 2002; WALL & KAISER, 1999). Todas as proteínas do T4P são necessárias para a extensão do *pili*, com exceção de PilT, que é especificamente envolvida na retração (MERZ, SO & SHEETZ, 2000).

PilB é uma ATPase hexamérica e é capaz de converter energia química a partir da hidrólise do ATP em energia mecânica, necessária para a montagem do *pili*. Entretanto, não se sabe exatamente como essa energia é transferida através da membrana citoplasmática. Em um modelo proposto por Craig & Li (2008), os meios de transmissão de energia poderiam ser fornecidos por uma proteína integral de membrana associada ao T4P, sugerindo que a hidrólise do ATP afastaria o domínio N- do C-terminal da ATPase. Com esse movimento, a proteína integral de membrana seria empurrada para cima e, conseqüentemente, levantaria a base do *pili*, resultando em um mecanismo cíclico. Os monômeros de pilina ancorados na base do *pili* por interações eletrostáticas, podem ser encaixados ao filamento principal, liberando novos locais para ligação de pilina livre.

PilT também é uma ATPase hexamérica, membro de uma grande família de ATPases que são conservadas nos sistemas T4P, secreção do Tipo II e secreção do Tipo IV que também necessita da hidrólise do ATP para a despolimerização do *pili* (CHIANG et al., 2008; JAKOVLJEVIC et al., 2008). PilT rodeia a base do *pili* e é capaz de proporcionar um curso de potência rotativo axial, análogo ao que é fornecido pela porção F1 da ATPase, sendo dessa forma que a proteína PilT age retraindo o *pili* (SATYSHUR et al., 2007; KAISER, 2000). Dessa maneira, o papel central da proteína PilT é fornecer os meios para a desmontagem dos filamentos em subunidades, processo que se deve à retração. Estima-se que a retração do *pili*, mediada pela proteína PilT, ocorra a cerca de 1000 subunidades de pilina/seg (MERZ, SO & SHEETZ, 2000; KAISER, 2000). A despolimerização rápida do T4P em pilinas e a polimerização das pilinas em T4P, pôde ser observada em *Pseudomonas aeruginosa* e *Myxococcus xanthus* através de sofisticadas técnicas microscópicas (SKERKER & BERG, 2001, SUN et al., 2000). Os mutantes PilT são incapazes de retraindo o *pili*, levando à “hiperpiliação” e a perda da motilidade, tornando, assim, a retração a base do “*twitching motility*” (WOLFGANG et al., 2000; WHITCHURCH et al., 1991; BRADLEY, 1980).

## 2.8 O T4P E *Herbaspirillum* spp.

Utilizando *P. aeruginosa* PAO1 como organismo referência para análises comparativas diretas de genes do T4P, Chicora (2015) identificou grupos de genes

ortólogos usando o banco de dados KEGG e verificou a similaridade de proteínas, encontrando genes estruturais do T4P nas sequências genômicas de *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1, além dos genes previamente citados por Pedrosa e colaboradores (2011). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 possui 42 genes envolvidos na biogênese do *pili*, incluindo genes regulatórios, e mais 18 genes equivalentes funcionais (BURROWS, 2012). No genoma de *H. seropedicae* SmR1, foram identificados um total de 29 genes homólogos aos genes *pil* e se encontram distribuídos em 8 regiões distintas do genoma (CHICORA, 2015).

Dois genes homólogos ao gene *pilT* de *P. aeruginosa* PAO1 foram identificados no genoma de *H. seropedicae* SmR1, Hsero\_0816 e Hsero\_3804. O gene Hsero\_3804 mostrou 68% de similaridade e aproximadamente 50% de identidade com o gene *pilT* de *P. aeruginosa* PAO1 e forma um operon com o gene Hsero\_3805, que codifica para uma proteína glutationa peroxidase (EC 1.11.1.9). O gene Hsero\_0816 foi identificado com 60% de similaridade e 30% de identidade em relação ao gene de *P. aeruginosa* PAO1 e é encontrado dentro de um grupo de genes envolvidos com o T4P (CHICORA, 2015). Também foi verificado se a sequência das duas proteínas PilT compartilhariam características comumente encontradas nos homólogos, como a presença de quatro domínios conservados nos membros da superfamília de ATPases de secreção, incluindo dois motivos de ligação ao nucleotídeo, denominados Walker boxes A e B, e duas regiões conservadas designadas como Asp e His boxes, além de motivos de sequência única na região C-terminal (AUKEMA, et al, 2005; PLANET et al., 2001). Assim, observou-se que a proteína codificada a partir do gene Hsero\_3804 apresenta os domínios mais conservados do que Hsero\_0816. Os genes *pilA* e *pilN* também foram identificados no genoma de *H. seropedicae* SmR1, sendo respectivamente Hsero\_0660 e Hsero\_0809 (CHICORA, 2015).

Em *H. rubrisubalbicans* M1, foram observados 19 genes homólogos aos genes *pil* distribuídos em 8 regiões diferentes do genoma. Três genes homólogos ao gene *pilT* de *P. aeruginosa* PAO1 também foram identificados no genoma, sendo eles 0001.0065, 0001.2384 e 0001.3715. Esses genes possuem tamanhos de 366 pb, 1095 pb e 1029 pb, respectivamente. O gene 0001.2394, homólogo ao *pilN*, também foi identificado no genoma do *H. rubrisubalbicans* e possui 1725 pb.

## 2.9 MOTILIDADES E O *TWITCHING MOTILITY*

Lautrop (1961) usou o termo *twitching motility* (“motilidade em espasmos”) pela primeira vez para definir uma motilidade independente do flagelo, observada em *Acinetobacter calcoaceticus*, usada para deslocamento em superfícies. Posteriormente, uma motilidade semelhante foi descrita em outras bactérias, das quais as melhores estudadas são *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Myxococcus xanthus* (MATTICK et al., 2002).

Segundo Henrichsen (1972), o *twitching motility* é um tipo de translocação superficial que produz zonas de propagação em meios sólidos, e as colônias apresentam bordas com padrões micromorfológicos variáveis. Por exemplo, *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, possuíam zonas de *twitching* sobre ágar tão pequenas, que chegavam a ser quase invisíveis (HENRICHSEN, 1975), sugerindo que a ocorrência do *twitching motility* pode variar em diferentes espécies e/ou que as condições de cultura *in vitro* são abaixo do ideal para este processo (MATTICK et al., 1987; HENRICHSEN, 1983). Essa motilidade pode ocorrer tanto em superfícies orgânicas quanto em inorgânicas, como géis de ágar, células epiteliais, plásticos, vidros e metais. Além disso, é um meio das bactérias transitarem em ambientes com baixa quantidade de água ou de colonizarem superfícies hidratadas, em vez de viverem livres em fluidos (MATTICK, 2002).

O *twitching motility* é mediado pelo T4P e é importante diferenciá-lo de outros tipos de motilidade (Figura 2). Por exemplo, o *swarming motility* (“motilidade de enxame”) é definido como um rápido movimento da bactéria através de uma superfície, motorizado pela rotação dos flagelos, embora o T4P também possa participar nesse tipo de motilidade em alguns organismos (ANYAN et al., 2014). O *swarming motility* pode ser estimulado experimentalmente através do cultivo em meio de cultura com concentrações de ágar acima de 0,3%, para excluir o *swimming motility* (“motilidade de natação”) e forçar a bactéria a se movimentar em cima da superfície. Concentrações acima de 1% de ágar inibem o *swarming* de várias espécies de bactérias, e são usadas para visualizar experimentalmente o *twitching motility*. O conteúdo de água no meio também é um fator limitante para esta motilidade, em que pouca água resulta em pouco *swarming*, enquanto muita água pode possibilitar o *swimming* (KEARNS, 2010).

*Swimming motility* (“motilidade de natação”) é um tipo de motilidade bacteriana que também é motorizada pela rotação dos flagelos, mas é diferente do *swarming*, pois refere-se ao movimento celular individual em ambiente líquido. O *swimming motility* pode ser visualizado experimentalmente com concentrações de ágar abaixo de 0,3% (KEARNS, 2010).

*Gliding motility* (“motilidade de deslize suave”) é um movimento ativo que acontece em superfícies, ao longo do eixo longitudinal da célula sem o auxílio do flagelo ou do *pili*. O *gliding* parece estar envolvido independentemente em múltiplas linhagens, mas geralmente envolve o movimento do corpo celular através do uso de complexos de adesão que ligam à superfície do substrato (MIGNOT, 2007).

*Sliding motility* é uma forma passiva de espalhamento em superfície que não requer um motor ativo, mas em vez disso, depende de surfactantes para reduzir a tensão de superfície, permitindo a colônia se espalhar além da sua origem, direcionada pela pressão externa do crescimento celular (MURRAY & KAZMIERCZAK, 2008).

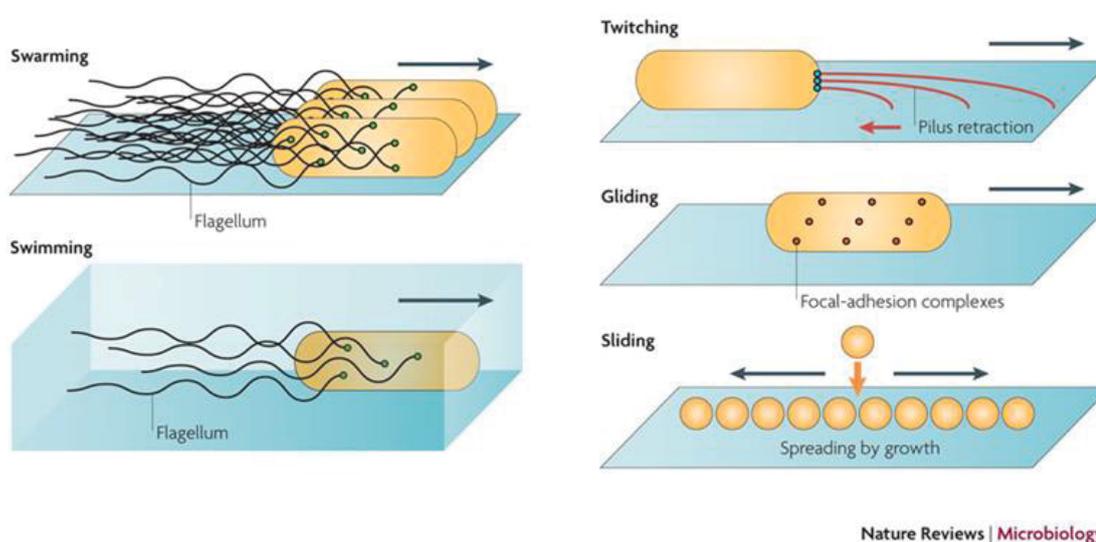


Figura 2 - TIPOS DE MOTILIDADE UTILIZADAS PELAS BACTÉRIAS. *Swarming* é o movimento multicelular da bactéria através de uma superfície e é mediado pela rotação dos flagelos. *Swimming* é o movimento individual da bactéria em líquidos, também motorizado pelos flagelos. *Twitching* é um movimento realizado em superfícies pela bactéria que é realizado pela extensão do *pili*, o qual prende na superfície e em seguida retrai, puxando a bactéria em direção ao local de ancoragem. *Gliding* é um movimento ativo usado em superfícies, que não requer *pili* ou flagelos, e envolve complexos de adesão. *Sliding* é uma translocação de superfície, que é alimentada pelo crescimento e facilitada por surfactantes. As setas pretas indicam a direção do movimento das células e os motores que desencadeiam o movimento estão indicados pelos círculos coloridos.

FONTE: Modificado de KEARNS, 2010.

## 2.10 O T4P E AS BACTÉRIAS ASSOCIADAS À PLANTAS

O envolvimento do T4P como fator de virulência na patogenicidade de bactérias associadas a animais já é bem elucidado e, cada vez mais, o papel do T4P de bactérias patogênicas de plantas vem sendo determinado (BURDMAN, et al., 2011). No entanto, ainda poucos estudos relatam envolvimento do T4P em bactérias não-patogênicas promotoras do crescimento vegetal ou diazotróficas. Por exemplo, Groot e colaboradores (1994), desenvolveram os primeiros estudos relacionando genes do T4P com uma bactéria promotora do crescimento vegetal, *Pseudomonas putida* WCS358, originalmente isolada da raiz de batata. Em seus estudos, verificaram a presença dos genes *pilD*, *pilC* e *pilA* do T4P na bactéria e expressaram a proteína PilA. Em outro estudo, Dörr, Hurek e Reinhold-Hurek (1998), verificaram a importância do T4P em *Azoarcus* sp. BH72, uma bactéria endofítica, fixadora de nitrogênio associada a gramíneas, em que o *pili* mostrou-se essencial na formação do biofilme e no estabelecimento de microcolônias nas superfícies das raízes jovens de arroz. Posteriormente, verificou-se também ser necessário na propagação dentro do broto (REINHOLD-HUREK et al., 2006). Assim, na colonização endofítica, *Azoarcus* sp. BH72 requer o *twitching motility*, uma vez que o mutante *pilT* mostrou-se capaz de produzir o *pili*, mas não de realizar a motilidade. Esse mutante formava microcolônias na superfície da raiz do arroz, mas gerava uma diminuição muito grande da colonização endofítica (BÖHM, HUREK & REINHOLD-HUREK, 2007).

Algumas espécies de bactérias promotoras do crescimento vegetal, ao terem o genoma sequenciado, apresentaram genes que constituem o T4P, como *Variovorax paradoxus* S110. Essa bactéria pertence ao grupo das rizobactérias, exerce efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas, possuindo a característica de diversidade metabólica como a principal responsável por estabelecer associações benéficas com as plantas (HAN et al., 2011). Outro exemplo é a bactéria *Enterobacter* sp. 638, um endofítico, isolado do caule de choupo (*Populus trichocarpa* x *deltoides* cv. H11-11, uma árvore com capacidade de produção de biomassa lignocelulósica, destinada à produção de biocombustível. Esse organismo apresentou grupos de genes envolvidos na biossíntese do T4P, bem como um conjunto de genes do *pili* não caracterizados, possivelmente envolvidos na captação de DNA (TAGHAV et al., 2010). Ainda *Cellvibrio japonicus*, não exatamente um promotor de crescimento vegetal, mas sim uma bactéria saprófita, isolada do solo, capaz de degradar partes da planta, facilitando

a decomposição e a reciclagem de matéria orgânica, também apresentou genes do T4P no genoma (DEBOY et al., 2008).

Em fitopatógenos, as contribuições do T4P para a virulência foram investigadas principalmente em patógenos vasculares, como aqueles que possuem a capacidade de colonizar e se difundir através dos vasos do xilema da planta, por exemplo: *Ralstonia solanacearum*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e *Pseudomonas syringae*. O T4P pode fornecer os meios para a colonização e disseminação da bactéria no xilema através da fixação celular, formação de biofilme e do *twitching motility*. Além da colonização endofítica, o envolvimento do T4P na aptidão epifítica tem sido relatado e, também, na virulência de bactérias patogênicas não vasculares (BURDMAN, et al., 2011).

Em estudos de Romantschuk e Bamford (1986) foram analisadas várias estirpes de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, as quais se diferenciavam pela quantidade de *pili* que produziam. Os autores observaram uma correlação: aquelas com maior quantidade de *pili*, eram as que mais aderiam às folhas de feijão quando borrifadas. Roine e colaboradores (1998) também relataram em seus estudos a importância do T4P nos estágios iniciais da infecção por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, uma vez que a estirpe mutante *pilA* desenvolveu doença apenas com sintomas fracos em folhas de tomate. As estirpes mutantes de genes T4P em *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605, apresentaram redução da motilidade, da formação de biofilme e da virulência ao hospedeiro de planta de tabaco (TAGUCHI & ICHINOSE, 2011).

*Ralstonia solanacearum* é responsável por doenças bacterianas em mais de 200 famílias de plantas, incluindo culturas de tomate, batata, amendoim e banana (GENIN, 2010). A inativação de genes *pilQ* e *pilT* de *R. solanacearum* AW1, resultou na ausência de *twitching motility* e redução de virulência (LIU et al., 2001). Estes fenótipos também foram observados em mutantes do gene *pilA*, que também mostraram redução na formação de biofilme e na autoagregação, além da falta de capacidade de ligação às células do tabaco em suspensões de cultura e raízes de tomate (KANG et al., 2002).

*Acidovorax avenae* subsp. *citrullie* é o agente patogênico da mancha bacteriana no fruto das cucurbitáceas. Quando os genes T4P dessa bactéria foram mutados, houve redução da formação do biofilme, da virulência e do *twitching motility* (BAHAR et al., 2009), além do T4P desempenhar um papel crítico tanto na fixação da

superfície como na formação de biofilme sob um fluxo médio (BAHAR et al., 2010). Mutações nos genes *pilT*, *pilM*, *pilQ* ou *pilZ3* de *Acidovorax avenae* subsp. *oryzae* RS-2 reduziram significativamente a virulência bacteriana em arroz, na formação de biofilme e na motilidade (LI et al., 2018).

A propagação da bactéria dentro da planta hospedeira é um processo ativo que envolve o *twitching motility*, como foi visto em *Xylella fastidiosa*, fitopatógeno causador da doença de Pierce em videiras e folhas queimadas em pêra, que usa essa motilidade mediada pelo T4P para se deslocar no sistema vascular do hospedeiro (MENG et al., 2005). Estudos realizados em *X. fastidiosa* por Li e colaboradores (2007), mostraram que em mutantes sem o T4P, houve uma produção maior de biofilme do que a estirpe selvagem.

Mutantes de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, um patógeno de arroz, mostraram que os genes envolvidos na montagem do *pili* e no *twitching motility* são necessários para a virulência (WANG et al., 2007).

### 3 JUSTIFICATIVA

*Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* são bactérias que se associam a diversas gramíneas de grande interesse comercial, promovendo seu crescimento ou causando danos. A presença de espécies que promovem interações benéficas e fitopatogênicas dentro do gênero *Herbaspirillum*, possibilita utilizá-lo como modelo de estudo para os processos moleculares envolvidos nestes dois tipos de associação planta-bactéria. Além disso, desperta grande interesse biotecnológico, uma vez que, conhecer os principais mecanismos envolvidos na associação planta-bactéria permite o avanço na área da seleção de estirpes e produção de inoculantes. Ambas bactérias possuem a habilidade de colonizar as gramíneas epifiticamente e endofiticamente, desde as raízes e, em alguns casos, até atingir os componentes aéreos. No entanto, tem-se tentado entender cada vez mais quais processos e sistemas estariam envolvidos durante a interação. Sabe-se que a bactéria é atraída até a raiz da planta provavelmente por quimiotaxia, adere à superfície radicular e então inicia-se o processo de colonização interna, pela penetração de algumas células que desenvolvem uma população endofítica. Muitos estudos têm mostrado que o T4P está envolvido na colonização de plantas por bactérias associativas de diversos gêneros, e genes homólogos aos genes *pil* foram identificados nos genomas de *Herbaspirillum* spp. Para determinar a possível função deste sistema na interação entre *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* com a planta, estirpes mutantes dos genes *pil* em ambas bactérias, poderiam contribuir para responder essa questão.

Além disso, o T4P também atua na formação de biofilme e tem um papel importante na motilidade em várias espécies de bactérias. Assim, avaliar esses fenótipos nos mutantes de *Herbaspirillum* spp. é necessário, uma vez que esses processos também podem ter influência na colonização da planta, além de serem características importantes para o sucesso do estabelecimento da bactéria no ambiente.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a estrutura e função do T4P de *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 na interação planta-bactéria, motilidade e formação de biofilme.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1:

- Identificar e caracterizar estruturalmente o T4P;
- Analisar a expressão dos genes envolvidos com o T4P através de RT-qPCR;
- Construção e confirmação de estirpes mutantes de genes T4P;
- Realizar a caracterização fenotípica dos mutantes obtidos;
- Avaliar a função do T4P em ambas estirpes.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 BACTÉRIAS

Para a realização deste estudo foram utilizadas as estirpes de bactérias listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Estirpes de bactérias utilizadas e suas características.

BACTÉRIA/ESTIRPE	GENÓTIPO OU FENÓTIPO	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Sm <sup>R</sup> , F' [ <i>proAB+lacZ_M15</i> ]	SAMBROOK et al., 1989
<i>Escherichia coli</i> S17.1	Sm <sup>R</sup> , Tra <sup>+</sup>	SIMON et al., 1983
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	Z78 <sup>1</sup> , Sm <sup>R</sup> , Nif <sup>+</sup>	SOUZA et al., 2000
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1	Nif <sup>+</sup> , fitopatogênico	PIMENTEL et al. 1991 BALDANI et al., 1996
<i>H. seropedicae</i> fliCΩnptI	Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , gene fliC interrompido com o cassete nptI	BALSANELLI et. al., 2015
<i>H. seropedicae</i> SmR1_pilA	<i>H. seropedicae</i> SmR1 com gene <i>pilA</i> interrompido	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i> SmR1_pilN	<i>H. seropedicae</i> SmR1 com gene <i>pilN</i> interrompido	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i> SmR1ΔpilT2	<i>H. seropedicae</i> SmR1 com gene <i>pilT2</i> deletado	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i> SmR1ΔpilT2/_pilN	<i>H. seropedicae</i> SmR1ΔpilT2 com gene <i>pilN</i> interrompido	Este trabalho
<i>H. rubrisubalbicans</i> M1ΔpilA	<i>H. rubrisubalbicans</i> M1 com gene <i>pilA</i> deletado	Este trabalho
<i>H. rubrisubalbicans</i> M1_pilN	<i>H. rubrisubalbicans</i> M1 com gene <i>pilN</i> interrompido	Este trabalho

Sm<sup>R</sup>, resistente a estreptomicina; Nif<sup>+</sup>, fixa N<sub>2</sub>; Km<sup>R</sup>, resistente a canamicina.  
<sup>1</sup>Z78, estirpe original da qual a estirpe SmR1 foi derivada. FONTE: O Autor.

## 5.2 PLASMÍDEOS

Os vetores utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela

Tabela 2- Características dos plasmídeos utilizados.

VETOR	CARACTERÍSTICA <sup>1</sup>	REFERÊNCIA
pSUP202	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , <i>mob site</i> .	SIMON et al., 1983
pUC4K	Cassete Km <sup>R</sup>	VIEIRA & MESSING, 1982
pK18mobsacB	Km <sup>R</sup> , <i>mob site</i> , <i>sacB</i> – Km	SCHÄFER, 1994
pSUPsacBKm3804	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , <i>mob site</i> , contém o cassete <i>sacB</i> - Km (Km <sup>R</sup> ), fragmento inicial e final do gene <i>pilT2</i> (Hsero_3804) SmR1	Este trabalho
pSUPsacBKm0624	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , <i>mob site</i> , contém o cassete <i>sacB</i> - Km (Km <sup>R</sup> ), fragmento inicial e final do gene <i>pilA</i> (0001.0624) M1	Este trabalho
pKHr2384	Contém um fragmento do gene <i>pilT1</i> (0001.2384) M1, com a região central deletada	Este trabalho
pKHr3715	Contém um fragmento do gene <i>pilT2</i> (0001.3715) M1, com a região central deletada	Este trabalho
pSUPAB(Hs_0816)	Contém o fragmento do gene <i>pilT1</i> (Hsero_0816) SmR1, com a região central deletada.	CHICORA, 2015
pSUPAKmB(Hs_0816)	Contém o fragmento do gene <i>pilT1</i> (Hsero_0816) SmR1, com a região central deletada. e o cassete <i>sacB</i> -Km (Km <sup>R</sup> ).	Este trabalho
pK_Hs0660	Contém um fragmento central do gene <i>pilA</i> (Hsero_0660) SmR1	Este trabalho
pK_Hs0807	Contém um fragmento central do gene <i>pilN</i> (Hsero_0807) SmR1	Este trabalho
pK_Hr2394	Contém um fragmento central do gene <i>pilN</i> (0001.2394) M1	Este trabalho

<sup>1</sup>Ap<sup>R</sup>, resistente a ampicilina; Cm<sup>R</sup>, resistente a canamicina; Tc<sup>R</sup>, resistente a tetraciclina; *mob site*, região que permite a mobilização do plasmídeo; Km<sup>R</sup>; *sacB*, confere sensibilidade a sacarose.  
 FONTE: O Autor.

### 5.3 CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram cultivadas em meio NFbHPN líquido, com malato como fonte de carbono (KLASSEN et al., 1997 doi: 10.1139/m97-129) a 30°C, e 120 rpm, durante o tempo necessário para realização de cada experimento. No momento do inóculo foram adicionados 50,0 mmol/L de solução de fosfatos ( $K_2HPO_4$  17,8 g/L;  $KH_2PO_4$  159,5 g/L), e 20,0 mmol/L de  $NH_4Cl$ , previamente autoclavados. Para o meio NFbHPN sólido, foi adicionado 15,0 g/L de ágar e para o meio semi-sólido 1,75 g/L. Na ocasião de seleção de mutantes de *Herbaspirillum* spp., foram usados 10,0 mL/L de solução de fosfatos, sendo o meio denominado NFbLPN – Malato (baixo fosfato).

As estirpes S17.1 e DH10B de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989), a 120 rpm, e a 37° C. Para o cultivo dessas estirpes em meio sólido, foi utilizado o meio Luria-Bertani-ágar (LA), composto pelo meio LB combinado com 15,0 g/L de ágar.

### 5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DO *PILI* TIPO IV

A expressão relativa dos genes *pilA* (Hsero\_0660), *pilT1* (Hsero\_0816) e *pilT2* (Hsero\_3804) de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e dos genes *pilA* (0001.0624), *pilT1* (0001.2384) e *pilT2* (0001.3715) de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1, foram avaliadas em 3 condições de cultivo diferentes, iniciando pela extração de RNA dessas bactérias, formação de cDNA pela ação da transcriptase reversa e quantificação por RT-qPCR.

#### 5.4.1 Oligonucleotídeos iniciadores para RT-qPCR

Para realizar o RT-qPCR, os oligonucleotídeos iniciadores foram planejados utilizando o software Primer Express 3.0. Os parâmetros dos oligonucleotídeos correspondiam a um tamanho de sequência de aproximadamente 20 pb, tamanhos de amplicons entre 90 e 100 pb, e temperatura de fusão próxima de 60°C. Na Tabela

3 estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos usados para a realização do RT – qPCR para os genes alvo deste trabalho.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para análise de expressão gênica por RT-qPCR.

GENE	GENE ID <sup>1</sup>	OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA (5'→3)	T <sub>m</sub> (°C) <sup>2</sup>
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1				
<i>pilA</i>	Hsero_0660	Hs-pilA-FOR	CAGCCGTCACCCGTTTCAT	58,1
	Hsero_0660	Hs-pilA-REV	GCCAGGATGCCGACGAT	58,1
<i>piIT1</i>	Hsero_0816	Hs-piIT-FOR	CGGCCATCGACGAAGACT	57,4
	Hsero_0816	Hs-piIT-REV	GCCATTCGCCCAACACAT	56,5
<i>piIT2</i>	Hsero_3804	Hs-piIT-FOR	CGCCGATCCCGACGTAT	57,3
	Hsero_3804	Hs-piIT-REV	CACCAGATGGCCGGTTTC	56,5
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1				
<i>pilA</i>	Hrubri_0001.0624	Hr-pilA-FOR	TTCACCGTGGCGCAACT	58,0
	Hrubri_0001.0624	Hr-pilA-REV	TTTTCCATCGGCGAGACTTC	55,2
<i>piIT1</i>	Hrubri_0001.2384	Hr-piIT-FOR	GCCAGCGAGATGGTGTTC	57,9
	Hrubri_0001.2384	Hr-piIT-REV	AATCAGCGGTAGCTTTTCAGGAT	56,6
<i>piIT2</i>	Hrubri_0001.3715	Hr-piIT-FOR	GGTCCGGCACATCAATGAA	55,6
	Hrubri_0001.3715	Hr-piIT-REV	GACGTGGGTGCCGATCTC	58,4

<sup>1</sup>Identificação dos genes nas sequências genômicas depositadas no banco de dados GenBank com os números de acesso CP002039 e CP013737; <sup>2</sup>Calculado a partir da fórmula:  $T_m = [4(A+T)] + [2(C+G)]$ . FONTE: O Autor.

#### 5.4.2 Preparação de amostras e condições experimentais

*H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 foram cultivados em 3 condições: crescimento em meio líquido NFbPN-Malato, crescimento em meio sólido NFbHPN-Malato e bactérias aderidas à raiz de milho.

Para a extração do RNA das amostras crescidas em meio líquido, foi usado inóculo com D.O.<sub>600nm</sub> inicial 0,05 em duplicata biológica, em 5 mL de meio NFbPN-Malato. Após aproximadamente 5 horas de crescimento, 1,5 mL das amostras foram

centrifugadas para a retirada do meio de cultura, em seguida foram ressuspensas em 300 µL de tampão de lise (TrisHCl pH 8,0 50 mmol/L – EDTA pH 8,0 10 mmol/L – SDS 0,1%).

Para a extração do RNA das amostras cultivadas em meio sólido, inicialmente as bactérias foram cultivadas em NFbPN-Malato líquido até atingirem D.O.<sub>600nm</sub> 0,5. Em seguida, duas placas de Petri para cada bactéria, contendo uma fina camada de 3 mm de espessura (10 mL) de NFbHPN-Malato com 1,5% de ágar, foram perfuradas com palitos de dente imersos nas culturas crescidas. Depois de realizadas as perfurações as placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas; após esse período, metade de cada colônia crescida foi ressuspensa em 300 µL de tampão de lise.

Na extração de RNA da bactéria aderida à raiz de milho, foram utilizadas 40 plantas em cada uma das duas replicatas biológicas. As sementes de milho foram desinfestadas, com etanol 70% durante 5 minutos, em seguida, as sementes foram imersas em hipoclorito 6% durante 20 minutos e então foram lavadas com água destilada estéril quatro vezes para remover os resíduos. As sementes foram germinadas em ágar-água 0,7% durante 48 horas, a 30°C. Após esse período, as plantas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio Plant Medium, e então inoculadas com 1 mL de cultura a 10<sup>8</sup> células de *H. seropedicae* SmR1 crescido. Após 24 horas do inóculo, as plantas foram coletadas e tiveram as raízes cortadas, e logo em seguida foram imersas em 18 mL de *RNA later* e água DEPC (Dicarbonato de dietila) na proporção de 2:1. As raízes foram *vortexadas* vigorosamente e continuamente durante um minuto. Em seguida, as raízes foram removidas e o sobrenadante foi centrifugado a 5.000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa em 300 µL de tampão de lise.

#### 5.4.3 Extração de RNA total

As amostras foram coletadas e ressuspensas em 300 µL de tampão de lise como descrito no item anterior. Em seguida, foi adicionado 1 mL de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific), a mistura foi bem homogeneizada e incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente. Foi acrescentado 200 µL de clorofórmio e misturado vigorosamente por 15 segundos, aguardando-se entre 2 a 3 minutos, para as amostras serem centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. Nessa etapa, ocorreu a separação em duas fases, sendo a fase mais acima transferida para um tubo novo.

Nesse novo tubo adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol para a precipitação do RNA; as amostras foram misturadas por inversão e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado, o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 75%. Enfim, foram centrifugadas por mais 5 minutos, o sobrenadante resultante descartado e as amostras foram secas a vácuo. O RNA foi ressuspensionado em 30 a 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de RNase.

#### 5.4.4 Tratamento com DNase

As amostras ressuspensionadas em água após a extração foram quantificadas no Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 e, então, incubadas com 1  $\mu\text{L}$  de TURBO™ DNase (2 U/ $\mu\text{L}$ ) (Thermo Fisher Scientific) e 10  $\mu\text{L}$  de tampão para 10  $\mu\text{g}$  de RNA em uma reação de 50  $\mu\text{L}$  para remoção de DNA presente nas amostras. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após este período, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  do Reagente Inativador de DNase, a mistura foi incubada por 5 minutos, misturando ocasionalmente a reação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos e o sobrenadante foi removido cuidadosamente e transferido para outro tubo.

No novo tubo, foram adicionados glicogênio 1:50, acetato de sódio 1:20 e 330  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, e as amostras foram deixadas 30 minutos a -70°C. Em seguida, foram centrifugadas por 30 minutos, o sobrenadante foi removido e as amostras foram secas a vácuo. Quando secas, adicionou-se 15  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de RNase, e então as amostras foram novamente quantificadas.

#### 5.4.5 Reação da transcriptase reversa (RT) para formação de cDNA e qPCR

Após a quantificação, 500 ng de RNA foram usados em 20  $\mu\text{L}$  de reação de RT. Para a reação da transcrição reversa usou-se *kit high-capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems – Life Technologies). As amostras de cDNA obtidas foram diluídas 1/60 em água comercial livre de RNase/DNase e mantidas a -20°C. O kit Power SYBR-Green PCR Master Mix foi usado para amplificação do cDNA no termociclador *Step One Plus Real Time-PCR System* (Life Technologies).

#### 5.4.6 Quantificação Relativa

Métodos de quantificação relativa da expressão gênica permitem quantificar diferenças nos níveis de expressão de um gene alvo específico entre diferentes amostras. Os dados são expressos em *fold-change* e pode-se analisar mudanças na expressão de um gene específico em tempo determinado de uma amostra tratada em relação a uma amostra não tratada. Para isso, é necessária uma amostra calibradora e um gene referência para normalizar os valores das amostras (BUSTIN et al., 2009). Como amostra calibradora, tanto para *H. seropedicae* quanto para *H. rubrisubalbicans*, foram usadas as culturas cultivadas em meio líquido e, como gene referência, foi utilizado o 16S rRNA. Dessa forma foram avaliados, os genes *pilA*, *pilT1*, *pilT2* e *fliC*. O gene *fliC* é um gene cujo comportamento de expressão já é conhecido, possuindo a expressão aumentada quando na presença de extratos de cana-de-açúcar (CORDEIRO et al., 2013).

Os dados obtidos foram analisados usando o método do  $\Delta\Delta C_T$ . Para isso, inicialmente é calculado a média dos  $C_{T_s}$  das replicatas técnicas de cada gene. Em seguida, calculou-se a variação dos  $C_{T_s}$  médios dos genes alvo (*pilA*, *pilT1*, *pilT2* e *fliC*) e referência (16S rRNA) da amostra calibradora (líquido) como na fórmula abaixo:

$$\Delta C_{T(\text{amostra calibradora})} = C_{T(\text{alvo})} - C_{T(\text{referência})}$$

E a diferença entre os genes alvo e referência das amostras testes (sólido e associado ao milho):

$$\Delta C_{T(\text{amostra teste})} = C_{T(\text{alvo})} - C_{T(\text{referência})}$$

Em seguida, calcula-se o  $\Delta\Delta C_T$ , que é a variação entre o  $\Delta C_{T(\text{amostra calibradora})}$  e o  $\Delta C_{T(\text{amostra teste})}$ :

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{amostra teste})} - \Delta C_{T(\text{amostra calibradora})}$$

Com o valor de  $\Delta\Delta C_T$  pode-se encontrar a relação de diferença de expressão do gene alvo num determinado tratamento em comparação com o tratamento da amostra calibradora. Essa relação é chamada de quantificação relativa (RQ) e é determinada pelo cálculo de  $2^{-\Delta\Delta C}$  (PFAFFL, 2001).

## 5.5 TÉCNICAS DE MANIPULAÇÃO DE DNA

### 5.5.1 Amplificação de DNA por PCR

O sistema de reação de PCR foi elaborado com concentrações finais de 0,2  $\mu\text{mol/L}$  de oligonucleotídeos iniciadores, 0,2  $\text{mmol/L}$  de dNTP, 1,5  $\text{mmol/L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , solução tampão 1X para *PfuX7* (20,0  $\text{mmol/L}$  Tris/HCl pH 8,8; 10,0  $\text{mmol/L}$  KCl, 6,0  $\text{mmol/L}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,0  $\text{mmol/L}$   $\text{MgSO}_4$ , 0,1  $\text{mg/mL}$  BSA e Triton X-100 a 0,1%), 0,5  $\mu\text{L}$  de *PfuX7* (NØRHOLM, 2010; o plasmídeo para purificar a *PfuX7* foi gentilmente cedido por NØRHOLM, e a purificação foi realizada pelos Doutores Marcelo B. Batista e Paloma Bonato, no Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR). As reações foram realizadas em sistemas de 10,0  $\mu\text{L}$  ou 50,0  $\mu\text{L}$ , e utilizou-se DNA genômico ou cultura de bactéria fervida como DNA molde. O programa de amplificação consistiu das seguintes temperaturas: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 60°C durante 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos; e, por último, um ciclo final de alongamento a 72°C durante 5 minutos. Os tamanhos dos fragmentos resultantes da amplificação foram verificados em gel de agarose 1% após coloração com brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) sob iluminação UV.

Os oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes, bem como endonucleases usadas nas construções, seguem descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho.

OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR	SEQUÊNCIA (5'->3') <sup>1</sup>	TM (°C)	ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO USADA PARA CLONAGEM
Hsero0807F	CAGACCCAGCCGACCTTTAC	57,0	-
Hsero0807R	GAAAAGCCCGAGGTTCCACT	59,0	-
0001.2394F	TGACAGGGTTCAATGCCACC	60,0	-
0001.2394R	TGCTGATGCCGAAGTTACGA	60,0	-
Hsero0660F	CCAGGACTACATTGCCCGTG	58,0	-
Hsero0660R	GAAGCCGGTATTGGCCGTTG	60,0	-

Hs3804 E1 F	CGAGGCCA <u>AGCTT</u> GCTGTCTTCGC	60,0	HindIII
Hs3804 E2R	GCCGGCGT <u>CTAGAT</u> GCAGGTCGGA	60,0	XbaI
Hs3804 E2 F	GCCTGCAT <u>CTAGA</u> AGGCCGTATCA	58,0	XbaI
Hs3804 E3 R	TCCGGAC <u>GATCC</u> GCGGCATAG	58,0	BamHI
Hs3804delF	GCCTCCGACCTGCATCTAT	59,0	-
Hs3804delR	AGGGTCCCAGCACCAGATG	60,0	-
HR3715 I	GCTGAT <u>GGATCC</u> TTGCAGACAAAT	59,0	BamHI
HR3715 Int I	CAACAA <u>AGCTT</u> CAGACCTGCACA	60,0	HindIII
HR3715 Int F	CGCATT <u>AAGCTT</u> CAGACCGCCCGT	60,0	HindIII
HR3715 F	CGCTT <u>GGATCC</u> CTGCCGTCGCGA	58,0	BamHI
HR2384 F	AATATCT <u>CTAGAC</u> AGCGTGCGAAA	61,0	XbaI
HR2384 Int F	ATCAATA <u>AAGCTT</u> GACGCCTTGCGC	60,0	HindIII
HR2384 Int I	GATATCA <u>AAGCTT</u> GGTCTTTGGATT	60,0	HindIII
HR2384 I	CGCAAC <u>GTCGACA</u> ACAAATCAGTC	58,0	Sall
pAHRE1F	GGGTGAGCATA <u>AAGCTT</u> CTGCTGGT	57,0	HindIII
pAHRE2R	GCCAGCGAGAT <u>CTTCAGTTC</u> GAGC	58,0	BglII
pAHRE2F	CCGTGGCAGAT <u>CTGCTGGC</u> CATAGC	60,0	BglII
pAHRE3R	TACAGGCG <u>GATCC</u> GAATGCAGGC	60,0	BamHI
piTE1	GCCAAGCTTGTATAGTAGACTCATTTCG	62,0	-
piTE3	ACGGGATCCGCGTTGGC	62,0	-
KAN-2FP-1 F	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	60,0	-
KAN-2RP-1 R	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	60,0	-

<sup>1</sup>Os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas listadas na coluna "Enzima de restrição usada para clonagem" estão sublinhados nas sequências dos oligonucleotídeos iniciadores. FONTE: O Autor.

### 5.5.2 Extração de DNA a partir de gel de agarose de baixo ponto de fusão

A metodologia utilizada para purificação dos fragmentos de DNA a partir da agarose de baixo ponto de fusão, foi modificada de Sambrook e colaboradores (1989). A eletroforese foi realizada em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,8%, utilizando o tampão TAE 1 X (Tris base 40,0 mmol/L; ácido acético 40,0 mmol/L; EDTA 2,0

mmol/L; pH 8,0), por 2 horas, sob voltagem de 50 V e amperagem de 400 mA. No gel foram aplicados o marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas) e 50,0 µL da amostra. Após a eletroforese, o gel foi cortado verticalmente em duas porções, na primeira porção havia o marcador e uma parte pequena da amostra, e, na segunda, apenas a amostra. Em seguida, a primeira porção foi corada com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 minutos, apenas para localizar espacialmente o fragmento de interesse e assim excisá-lo da porção de gel não corada. Para purificação dos fragmentos extraídos do gel, foi utilizado o produto *QIAquick® Gel Extraction Kit*.

### 5.5.3 Digestão de DNA por endonuclease de restrição

Os fragmentos de DNA amplificados foram posteriormente digeridos em sistema de reação contendo água, endonucleases de restrição (*Invitrogen* ou *Fermentas*), tampão e temperatura conforme indicados pelo fabricante. A incubação variou entre 4 e 16 horas, conforme enzima utilizada e quantidade de DNA. As reações tiveram volume entre 10,0 e 50,0 µL, e, após incubação, as enzimas utilizadas foram inativadas com aquecimento, de acordo com o tempo requerido ou então sendo precipitadas com fenol. Todas as restrições foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose.

### 5.5.4 Ligação de fragmentos de DNA

A ligação dos fragmentos de DNA foi realizada a partir da montagem de um sistema de reação com volume final de 10,0 µL, contendo: 1,0 µL de tampão de ligação, 0,5 µL de T4 DNA ligase, vetor linearizado e inserto numa razão molar de 1:5; e água ultrapura estéril suficiente para completar o volume de reação. Esse sistema de reação foi, por fim, incubado a 18°C durante a noite, e, no dia seguinte, a ligação foi inserida em *E. coli* DH10B através de transformação por choque térmico.

### 5.5.5 MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A metodologia utilizada para purificação de plasmídeos em pequena escala (miniprep) foi uma modificação do método de lise alcalina criado por Sambrook e colaboradores (1989). As culturas de *E. coli* DH10B com o plasmídeo de interesse foram cultivadas em 5,0 mL meio LB, durante o período aproximado de 16 horas. Uma fração de 1,0 mL da cultura foi transferida para um microtubo plástico de 1,5 mL e em seguida centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm, a fim de separar as células do meio. Em seguida, as células foram lavadas em 150,0 µL de solução GET (Tris-HCl 25,0 mmol/L pH 8,0; glucose 50,0 mmol/L; EDTA 10,0 mmol/L), centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto e novamente ressuspensas em 150,0 µL de tampão GET. A fim de promover a lise celular, foram adicionados 150,0 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,2 mol/L) e a mistura foi homogeneizada cuidadosamente por inversão. Logo após, adicionou-se 150,0 µL de acetato de potássio (3 mol/L, pH 4,8), sendo a mistura incubada durante 10 minutos em banho de gelo, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, para a precipitação de proteínas, de DNA cromossômico, e de restos celulares. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, no qual 100,0 µL de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico (25:24:1) foram adicionados e centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm, para que os demais resíduos proteicos fossem precipitados. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, para que não fosse captado o material residual da interface, e, então, transferido para um tubo novo. Foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol à solução, que foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, para precipitar o DNA plasmidial. O DNA foi lavado com 100,0 µL de etanol 80%, centrifugado a 12.000 rpm e seco a 30°C por 1 hora. Por fim, a amostra foi ressuspensa em volume variável de 10,0 a 50,0 µL de água ultrapura estéril, e a qualidade e concentração foram avaliadas em eletroforese de gel de agarose 1%.

### 5.5.6 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

Para o preparo de células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B e S17.1, 1,0 mL do pré-inóculo crescido durante a noite, foi adicionado em 100,0 mL de meio LB, e incubado a 30°C a 120 rpm de agitação, até a cultura atingir D.O.<sub>600nm</sub> 0,4. Após obter o crescimento desejado, dividiu-se a cultura igualmente entre dois tubos falcon

(50,0 mL) e centrifugou-se a 4.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a massa celular formada foi ressuspensa em 25,0 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1

mol/L, sendo a mistura incubada em banho de gelo durante uma hora. Foi realizada uma nova centrifugação, a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado, e a massa de células ressuspensa em 2,0 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 mol/L + 15% de glicerol. As amostras resultantes foram aliqotadas e armazenadas a – 80°C.

### 5.5.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Para transformar plasmídeos fechados, utilizou-se um volume de 3,0 µL do plasmídeo, e para reações de ligação, foram usados 5 µL do sistema, em 100,0 µL de células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B e S17.1. Após adicionar o plasmídeo às células quimiocompetentes, a mistura foi incubada durante 30 minutos em banho de gelo. Então, a mistura foi submetida ao choque térmico, sendo incubada à 42°C em banho maria durante 1 minuto, e em seguida, por 2 minutos em banho de gelo. Foram adicionados 900,0 µL de meio LB e a amostra foi incubada à 37°C durante uma hora. Por fim, as células foram centrifugadas à 12.000 rpm por um minuto, parte do sobrenadante foi dispensado e as células foram ressuspensas no restante de sobrenadante do tubo. As amostras foram então plaqueadas com os antibióticos correspondentes.

### 5.5.8 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEO PARA ESTIRPES DE *Herbaspirillum* POR CONJUGAÇÃO

O plasmídeo foi inicialmente transformado em *E. coli* S17.1, que foi utilizada como estirpe doadora para as estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1, as receptoras. O cultivo foi realizado durante 16 horas nos meios líquidos e temperaturas adequadas, e então foram reinoculadas, sendo as estirpes de *Herbaspirillum* na proporção 1/50 sendo cultivado por 6 horas e *E. coli* S17.1 na proporção 1/100 cultivado por 3 horas. Depois, 5,0 µL de *E. coli* S17.1 foram misturados com 50,0 µL de *Herbaspirillum*; a mistura foi depositada em forma de gota

numa placa com meio NFbHPN-Malato sólido e LA, na proporção de 3:1, que foi incubada a 30°C por 18 horas. A massa de células crescida, foi coletada e dissolvida em 400,0 µL de meio NFb-Malato líquido, e, em seguida, 200,0 µL foram plaqueados em meio NFbLPN-Malato (baixo fosfato – 10,0 mL/L de fosfato; 20,0 mmol/L de cloreto de amônia) com antibióticos específicos para a obtenção dos transconjugantes. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas.

#### 5.6 ESTRATÉGIA PARA MUTAGÊNESE DOS GENES *pilA*, *pilN*, *pilT1* E *pilT2* DE *H. seropedicae* E SmR1 E *H. rubrisubalbicans* M1

Para obter estirpes mutantes dos genes *pilA* (Hsero\_0660), *pilT1* (Hsero\_0816), *pilT2* (Hsero\_3804) e *pilN* (Hsero\_0807) de *H. seropedicae* SmR1 e, também, dos genes *pilA* (0001.0624), *pilT1* (0001.2384), *pilT2* (0001.3715) e *pilN* (0001.2394) de *H. rubrisubalbicans* M1, foram usadas duas estratégias de clonagem, explicadas a seguir.

**Estratégia 1.** Usada para os genes: *pilT2* de *H. seropedicae*; *pilA*, *pilT1* e *pilT2* de *H. rubrisubalbicans*. Nessa estratégia, objetivou-se a deleção de um fragmento na região central de cada gene, no final da etapa de clonagem. Para isso, as regiões a montante e a jusante do fragmento central permitiriam que este fragmento fosse deletado do genoma de *Herbaspirillum* spp. por recombinação homóloga. Para tanto, dois fragmentos nas extremidades de cada gene foram amplificados, utilizando pares de oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios para endonucleases de restrição.

**Estratégia 2.** Usada para os genes *pilA* e *pilN* de *H. seropedicae* e o gene *pilN* de *H. rubrisubalbicans*. Nessa estratégia, o plasmídeo pK18*mobsacB*, contendo um fragmento de cada gene alvo, foi integrado ao genoma, resultando na interrupção do gene.

##### 5.6.1 Construções plasmidiais para mutagênese usando a estratégia 1

A estratégia 1, de deleção parcial dos genes alvos *pilT2* de *H. seropedicae* e *pilA*, *pilT1* e *pilT2* de *H. rubrisubalbicans*, iniciou a partir da amplificação das regiões a montante e a jusante de cada gene, gerando fragmentos denominados A e B,

respectivamente. Para cada gene obteve-se os tamanhos de fragmentos descritos na Tabela 5.

Assim, cada fragmento amplificado com sucesso, foi subclonado no plasmídeo pTZR/T, formando os plasmídeos pTZ+A e pTZ+B. Após verificação da orientação, os plasmídeos pTZ+A foram digeridos com endonuclease apenas para abrir o plasmídeo, enquanto pTZ+B foi submetido a dupla digestão para liberação do fragmento B. Dessa forma, o fragmento B foi inserido ao pTZ+A aberto, resultando em pTZA+B. Em seguida, após obter colônias de *E. coli* DH10B transformantes, foram realizadas ampliações, para verificar a presença de fragmentos A+B formados.

Os plasmídeos pTZA+B foram digeridos com endonucleases de restrição, para permitir a liberação e purificação dos fragmentos A+B. Após digestão e purificação, os fragmentos foram clonados nos plasmídeos pSUP202 (*pilT2*-Hsero\_3804 e *pilA*-0001.0624) ou pK18*mobsacB* (*pilT1*-0001.2384 e *pilT2*-0001.3715). Após realizar essa clonagem, as ligações foram transformadas em *E. coli* DH10B e as colônias obtidas foram avaliadas para verificar a presença do vetor com inserto, através da amplificação de cada gene. Os tamanhos de fragmentos obtidos estão descritos na Tabela 5.

Após a confirmação, a extração dos plasmídeos foi realizada. No caso das construções referentes ao plasmídeo pSUP202, foi inserido o cassete *sacB*Km, excisado do plasmídeo pMH1701, responsável por conferir sensibilidade à sacarose e resistência à canamicina. Nesta etapa foram formados os plasmídeos: pSUP*sacB*Km3804, pSUP*sacB*Km0624, pKHr3715 e pKHr2384.

Tabela 5 - Estratégias usadas para mutagênese de cada gene.

GENE	ESTRATÉGIA	TAMANHO DOS FRAGMENTOS CLONADOS	VETORES FORMADOS
<i>H. seropedicae</i>			
<i>pilA</i> (Hsero_0660)	Estratégia 2	349 pb	pK_Hs0660
<i>pilN</i> (Hsero_0807)	Estratégia 2	701 pb	pK_Hs0807
<i>pilT1</i> (Hsero_0816)	Estratégia 1	1.924 pb	pSUPAKmB(Hs0816)
<i>pilT2</i> (Hsero_3804)	Estratégia 1	A: 576 pb, B: 584 pb A+B = 1160 pb	pSUP <i>sacB</i> Km3804

<i>H. rubrisubalbicans</i>			
<i>pilA</i> (0001.0624)	Estratégia 1	A:529 pb, B: 483 pb A+B= 1012 pb	pSUPsacBKm0624
<i>pilT1</i> (0001.2384)	Estratégia 1	A: 572 pb, B: 463 pb A+B= 1035 pb	pKHr2384
<i>pilN</i> (0001.2394)	Estratégia 2	729 pb	pK_Hr0807
<i>pilT2</i> (0001.3715)	Estratégia 1	A: 554 pb, B: 544 pb A+B= 1098 pb	pKHr3715

A= fragmento A; B= fragmento B. FONTE: O Autor.

### 5.6.2 Construções plasmidiais para mutagênese usando a estratégia 2

Nessa estratégia, os fragmentos dos genes *pilA* e *pilN* de *H. seropedicae* e *pilN* de *H. rubrisubalbicans* foram amplificados e clonados no plasmídeo pTZR/T (os tamanhos dos fragmentos podem ser observados na Tabela 5). Em seguida, foram excisados com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* e clonados no plasmídeo pK18*mobsacB*, formando os plasmídeos pK\_Hs0660, pK\_Hs0807 e pK\_Hs2394.

### 5.6.3 Construção do mutante *pilT1* de *H. seropedicae* SmR1

Para a construção do mutante do gene *pilT1* de *H. seropedicae* SmR1, foi realizada uma otimização da construção de CHICORA (2015), uma vez que não houve obtenção de mutantes. A construção original utilizou o plasmídeo pSUP202 e apresenta o mesmo formato da estratégia 1 de deleção deste trabalho. Aqui, foi inserido um cassete de canamicina entre os fragmentos de A+B de *pilT1*, a fim de aumentar a distância entre esses e, desse modo, evitar que o genótipo selvagem pudesse ser recuperado. Mantendo a utilização dos mesmos oligonucleotídeos iniciadores, ao inserir o cassete de canamicina de 1.264 pb, o fragmento A+B de *pilT1* com 660 pb, passaria a ter 1.924 pb, enquanto a estirpe selvagem apresentaria amplificação de 1.190 pb.

Inicialmente, o cassete de canamicina foi excisado do plasmídeo pUC4K, pela digestão da endonuclease *BamHI* e, purificado do gel de agarose com baixo ponto de fusão. Enquanto isso, a construção pSUPAB(Hs\_0816) (CHICORA, 2015) foi tratada com endonuclease de restrição *BglII*, para abertura entre os fragmentos A e B. Como as digestões realizadas com *BglII* e *BamHI* geram pontas coesivas compatíveis, foi

possível ligar o plasmídeo e o cassete, formando a construção pSUPAKmB(Hs0816). Essa ligação foi transformada em *E. coli* DH10B, e logo após foram realizadas amplificações das colônias resultantes com os oligonucleotídeos iniciadores pilTE1 e pilTE3. Colônias que apresentaram amplificações com bandas de 2.010 pb indicam que a ligação foi realizada com sucesso, enquanto as de 660 pb indicam que não houve inserção do cassete de canamicina.

## 5.7 CURVA DE CRESCIMENTO ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPE MUTANTE

Para avaliar o perfil de crescimento da estirpe selvagem e mutante, as bactérias foram inoculadas em 10 mL de meio NFbPN – Malato, em D.O.<sub>595nm</sub> 0,1, incubadas a 30°C e agitação a 120 rpm. A cada uma hora, era retirada uma alíquota de 300 µL de cada estirpe para realizar a leitura da D.O.<sub>595nm</sub> e acompanhar a multiplicação das estirpes.

## 5.8 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO

O ensaio de biofilme foi realizado baseado em Balsanelli e colaboradores (2010). Foram utilizados frascos iguais contendo 50 mg de fibra de vidro esterilizadas e 10 ml de meio NFbPN – Malato. Inicialmente, um pré-inóculo das bactérias analisadas foi incubado *overnight*, e após o crescimento, foram inoculadas no meio com fibra de vidro, ajustando a D.O.<sub>595nm</sub> inicial para 0,2. As culturas foram incubadas a 30 °C, 120 rpm e após 48h o meio de cultura foi removido restando apenas as fibras de vidro. Foi adicionado às fibras, 200 µL de cristal violeta 1%, em seguida as fibras foram lavadas com 10 mL de solução salina 0,9%, três vezes. Para remoção do corante aderido às bactérias presentes no biofilme formado na fibra, 1 mL de etanol absoluto foi adicionado, após, o etanol foi coletado para leitura da absorbância a 540 nm.

## 5.9 ENSAIO DE *TWITCHING*, *SWARMING* E *SWIMMING* MOTILITY

Nos ensaios de motilidade do tipo *swarming*, baseado em KEARNS (2010), foram utilizadas placas de Petri contendo 10 ml de meio NFbHPN – Malato com ágar 0,3%, 0,5% e 0,8%. Para os ensaios de *swimming* foi utilizado ágar 0,175% e 0,3%, e para os ensaios de *twitching* foi usado ágar 1%. Dois microlitros das estirpes selvagem e mutante de *Herbaspirillum* sp., em D.O.<sub>595nm</sub> 0,5, foram inoculadas no centro da placa com perfuração do meio e incubados em câmara úmida a 30°, para avaliar o *swimming* e o *twitching*. Para o *swarming*, uma gota de 5 µL foi depositada na superfície da placa. Após 48h, o halo de crescimento em placa foi medido, e as placas fotografadas.

## 5.10 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

### 5.10.1 Preparo das amostras

A purificação de proteínas de superfície foi realizada segundo Rivera & Forest (2017). As estirpes *H. seropedicae* SmR1 e SmR1 $\Delta$ pilT2 foram crescidas em 50 placas cada uma (meio NFbHPN – Malato sólido), de maneira que as placas ficassem forradas. Após 24 horas, as placas foram raspadas cuidadosamente, evitando partículas do meio sólido. As bactérias foram ressuspensas em 75 mL de tampão PDB (Pilus Disaggregation Buffer) gelado (1mM DTT, 150 mM etanolamina, pH 10,5). As células foram ressuspensas gentilmente e grosseiramente com a pipeta, e em seguida sob agitação a 4°C por 1 hora.

Passado esse período, as amostras foram vortexadas 3 vezes por 1 minuto em agitação máxima, intercalando banho de gelo de 2 minutos entre as vortexagens, originando o sobrenadante S0. Nessa fase, obtiva-se desprender proteínas que estejam na superfície das bactérias, como as proteínas do *pili*. A suspensão foi centrifugada a 15000 x g por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi removido e transferido para tubos de centrifuga limpos e o *pellet* (P1) foi formado. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado uma segunda vez, com a mesma velocidade por 10 minutos. O sobrenadante S1 resultante, foi transferido para um novo tubo.

### 5.10.2 Purificação das proteínas

A membrana de diálise (33 mm de diâmetro) foi fervida em água destilada por 1 minuto e a amostra S1 foi adicionada a ela. Em um béquer, foi adicionado 1 L do tampão PBB (Pilus Bundling Buffer – 150 mM NaCl, 0,02% Na N3, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 – 4°C) e o tubo de diálise foi mantido submerso nesse tampão. Após 6 horas o tampão foi renovado, e deixado *overnight*, para que houvesse equilíbrio entre os pHs e, a amostra dentro do tubo de diálise, atingisse pH 7,5. Realizada a confirmação do pH da amostra, essa foi transferida para um tubo de centrífuga, e, centrifugada por 40 minutos a 20000 x g.

O sobrenadante S2 resultante, foi removido e o *pellet* P2 resuspendido em tampão PDB, até a obtenção de uma solução não viscosa. Em seguida, P2 resuspendido, foi centrifugado novamente, resultando no sobrenadante S3 e *pellet* P3. Uma segunda diálise foi realizada contra o S3 e tampão PBB. A amostra foi centrifugada e obteve-se S4 e P4.

### 5.10.3 Separação das proteínas de superfície por SDS-PAGE

A separação das proteínas purificadas foi realizada por eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 12,5% (m/v). As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical, segundo recomendação do fabricante (Biorad), a 170 V por 1 hora. Após, o gel foi corado com Coomassie Blue e algumas bandas foram selecionadas para análise, sendo recortadas do gel.

### 5.10.4 Identificação das proteínas de superfície de *H. seropedicae* por MALDI-TOF/MS

As amostras foram preparadas para análise MALDI-TOF/MS de acordo com Shevchenko e colaboradores (1996), com modificações. As bandas de interesse foram excisadas do gel, divididas em pedaços menores, descoradas duas vezes durante 30 minutos com solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e

acetonitrila 50%. Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados com acetonitrila 100%. As amostras foram reidratadas com solução de tripsina 15 ng/ $\mu$ L em bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 e acetonitrila 10% e incubadas em gelo por 30 minutos. Após, as amostras permaneceram por 16 horas a 30°C. Passado esse período, 1  $\mu$ L da amostra tripsinizada e 1  $\mu$ L da matriz HCCA (acetonitrila 50%, TFA-ácido trifluoroacético 0,1% saturado em HCCA – ácido  $\alpha$ -4-hidroxicinâmico) foram misturadas e depositadas na placa de amostras MALDI-TOF. Os espectros foram adquiridos com o espectrômetro MALDI-TOF/MS Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) no modo positivo e voltagem de 20 kV. A lista de picos foi criada usando o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A Identificação de proteínas foi realizada com o software MASCOT (MATRIX SCIENCE) e o banco de dados do genoma de *H. seropedicae* SmR1.

## 5.11 ENSAIOS *IN PLANTA*

### 5.11.1 Preparação de sementes de milho

As sementes de milho (*Zea mays* cv. 30A37PW) passaram inicialmente por um processo de desinfestação onde permaneceram durante 20 minutos em uma solução de hipoclorito de sódio 6% (v/v) e *Tween* 20 0,1% (v/v), em seguida, em etanol 70% por 5 minutos. A quantidade das soluções seguiu sempre a proporção de um mililitro para cada semente.

Após a desinfestação, as sementes foram transferidas para placas contendo ágar – água (0,9%). As placas foram enroladas em papel-alumínio para proporcionar um ambiente escuro, e mantidas a 30°C por três dias para germinação. As plântulas germinadas, foram inoculadas com  $10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC) de *Herbaspirillum* sp. por 30 minutos e então transferidas para tubos de ensaio (30 cm) contendo 30 mL de meio *Plant Medium* e 10 g de esferas de polipropileno e, crescidas a 25°C com período de luz de 12 h e 1.250 lux. Foram utilizadas 5 repetições para cada bactéria, onde foram analisados *H. seropedicae* SmR1 (controle positivo), controle negativo (sem inóculo) e as estirpes mutantes obtidas.

### 5.11.2 Ensaio de colonização superficial às raízes de milho pelas estirpes de *Herbaspirillum* sp. selvagens e mutantes

Para o ensaio de adesão, foram avaliadas as raízes imediatamente após a inoculação. Já o ensaio de colonização epifítica, avaliou-se o primeiro, terceiro e sétimo dia após a inoculação. As plantas coletadas tiveram suas raízes cortadas, pesadas, colocadas em tubos com 1 mL de solução salina 0,9% estéril e então *vortexadas* durante 20 segundos. O sobrenadante foi utilizado para determinar o número de bactérias aderidas à raiz, através de diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) e contagem de unidades formadoras de colônia em meio sólido.

### 5.11.3 Ensaio de colonização interna às raízes de milho das estirpes de *Herbaspirillum* sp. selvagens e mutantes

A quantificação do número de bactérias endofíticas foi realizada no primeiro, terceiro e sétimo dia após a inoculação. As raízes tiveram a superfície desinfestada da seguinte forma: imersão por 1 minuto em hipoclorito 1%, seguida por 2 minutos em etanol 70% (v/v), e por fim, duas lavagens com água destilada estéril. As raízes foram cortadas e maceradas em *graa* estéril em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%). A partir dos extratos foi realizada diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) e contagem de unidades formadoras de colônia em meio sólido.

## 5.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

### 5.12.1 Preparo de amostras para microscopia

As estirpes selvagem e mutantes foram cultivadas em placas com meio NFbHPN-Malato sólido (ágar 1,5%) a 30° C por 24 horas. Uma massa celular foi recolhida e ressuspensa em 50 µL de água destilada e corada com molibdato de amônio 2%. Todas as soluções utilizadas foram previamente filtradas para remoção de partículas suspensas.

Para *H. seropedicae* SmR1 associado à raiz de milho (*Zea mays* cv. 30A37PW), a bactéria foi cultivada em meio líquido e incubada por 15 minutos com plântulas de milho (germinadas por três dias após a desinfestação da superfície, item 3.18.1). As plântulas foram lavadas uma vez com solução salina estéril e então transferidas para tubos contendo meio *Plant Medium* e incubadas com temperatura e iluminação controlada. Vinte e quatro horas após a inoculação, as plantas foram coletadas, as raízes foram vigorosamente agitadas em vórtex por 1 minuto com água destilada, e o sobrenadante foi corado com molibdato de amônio 2%.

#### 5.12.2 Método e coloração negativa para contrastação das amostras

Como contrastante, utilizou-se a solução de molibdato de amônio 2% em pH 7,0. Em um microtubo, foram misturadas quantidades iguais do corante e das amostras (20  $\mu$ L de cada um). Uma gota dessa mistura foi adicionada diretamente nas grades revestidas com película de parlódio e após 20 segundos, a solução foi removida delicadamente da grade, absorvendo todo o excesso com papel filtro. A grade foi seca em temperatura ambiente durante a noite e visualizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200EX-II, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. O registro das imagens foi feito através da câmera CCD Gatan (BioScan) e da câmera de alta resolução CCD Gatan (Orius SC1000B).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 A EXPRESSÃO DE GENES DO T4P E FLAGELO É ALTERADA NA INTERAÇÃO COM A PLANTA

Foi observado anteriormente que a expressão de genes estruturais do flagelo (ex., *fliC*) possuem sua expressão alterada em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 em condições de laboratório, quando cultivada somente em meios de cultura ou em associação a raízes de plantas de milho (BALSANELLI et al, 2015). Para verificar e quantificar possíveis alterações na expressão de genes homólogos estruturais do *pilI* tipo IV (T4P) em *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1, os genes *pilA*, *pilT1* e *pilT2* nestas espécies foram analisados por PCR em tempo real quantitativa (RT-qPCR), após cultivo das bactérias em meio líquido, em meio sólido e associadas epifiticamente à raiz de milho após 1 dia da inoculação. A expressão do gene estrutural do flagelo, *fliC* em ambas as espécies, foi também quantificada para comparação. A alteração no padrão de expressão destes genes, nas condições testadas, pode sugerir envolvimento do T4P na colonização de raízes de plantas. Os resultados mostraram que em *H. seropedicae* SmR1 cultivado em meio sólido, todos os genes apresentaram expressão relativa reduzida quando comparados à multiplicação em meio líquido (condição usada para padronização da expressão gênica,  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,0$ ), como é possível observar na Figura 3A. Contrariamente, a expressão relativa aumentou para os genes *pilA* (cerca de 1,5 vezes) e *pilT2* (cerca de 2,5 vezes) na condição da bactéria aderida à raiz, um padrão totalmente diferente daqueles observados para o gene *fliC* nesta condição, que apresentou uma grande diminuição na expressão relativa. Para o gene *pilT1*, não houve diferença significativa na expressão relativa para a condição da bactéria aderida à raiz de milho. A diminuição na expressão relativa dos genes estruturais para o T4P e para o flagelo quando a bactéria foi cultivada em meio sólido não era esperada, uma vez que estas estruturas são utilizadas para mobilidade em meio de cultivo semi-sólido e sólido, respectivamente. O aumento na expressão relativa dos genes *pilA* e *pilT2* quando a bactéria está aderida à raiz, sugere uma possível participação destes genes, e do T4P, neste processo. Entretanto, a falta de diferença na expressão relativa observada para o gene *pilT1* não era esperada, uma vez que este gene se encontra presente no agrupamento dos genes estruturais para

T4P no genoma da bactéria, enquanto o gene *pilT2* encontra-se em local diferente deste agrupamento no genoma.

Para *H. rubrisubalbicans* M1 um padrão diferente de expressão relativa foi observado para o crescimento em meio de cultivo sólido (Figura 3B): uma diminuição foi observada somente para o gene *pilA*, não houve variação na expressão do gene *pilT1* e um grande aumento foi observado para o gene *pilT2* (aproximadamente 6 vezes). Entretanto, um padrão semelhante foi observado para a bactéria aderida à raiz, onde houve aumento na expressão dos genes *pilA* (cerca de 6 vezes) e *pilT2* (cerca de 8 vezes), mas não houve variação significativa observada para o gene *pilT1*. O gene estrutural do flagelo, *fliC*, seguiu o mesmo padrão observado para *H. seropedicae* SmR1, onde observou-se diminuição na expressão do gene tanto no crescimento em meio de cultivo sólido, quando para a bactéria aderida à raiz.

Apesar de algumas diferenças observadas no padrão de expressão dos genes em relação às condições analisadas, os resultados para *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* mostraram diminuição na expressão do gene *fliC* nas bactérias cultivadas em meio sólido e associadas à raiz de milho, em relação ao cultivo em meio líquido. Para ambas as bactérias, o gene *pilT1* não mostrou variação significativa na expressão relativa para as bactérias aderidas à raiz, enquanto o gene *pilT2* mostrou um grande aumento para ambas. Desta forma, os resultados sugerem que o T4P é importante para *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* colonizarem a superfície da raiz do milho, com participação da transcrição dos genes *pilA* e *pilT2* para ambas bactérias.

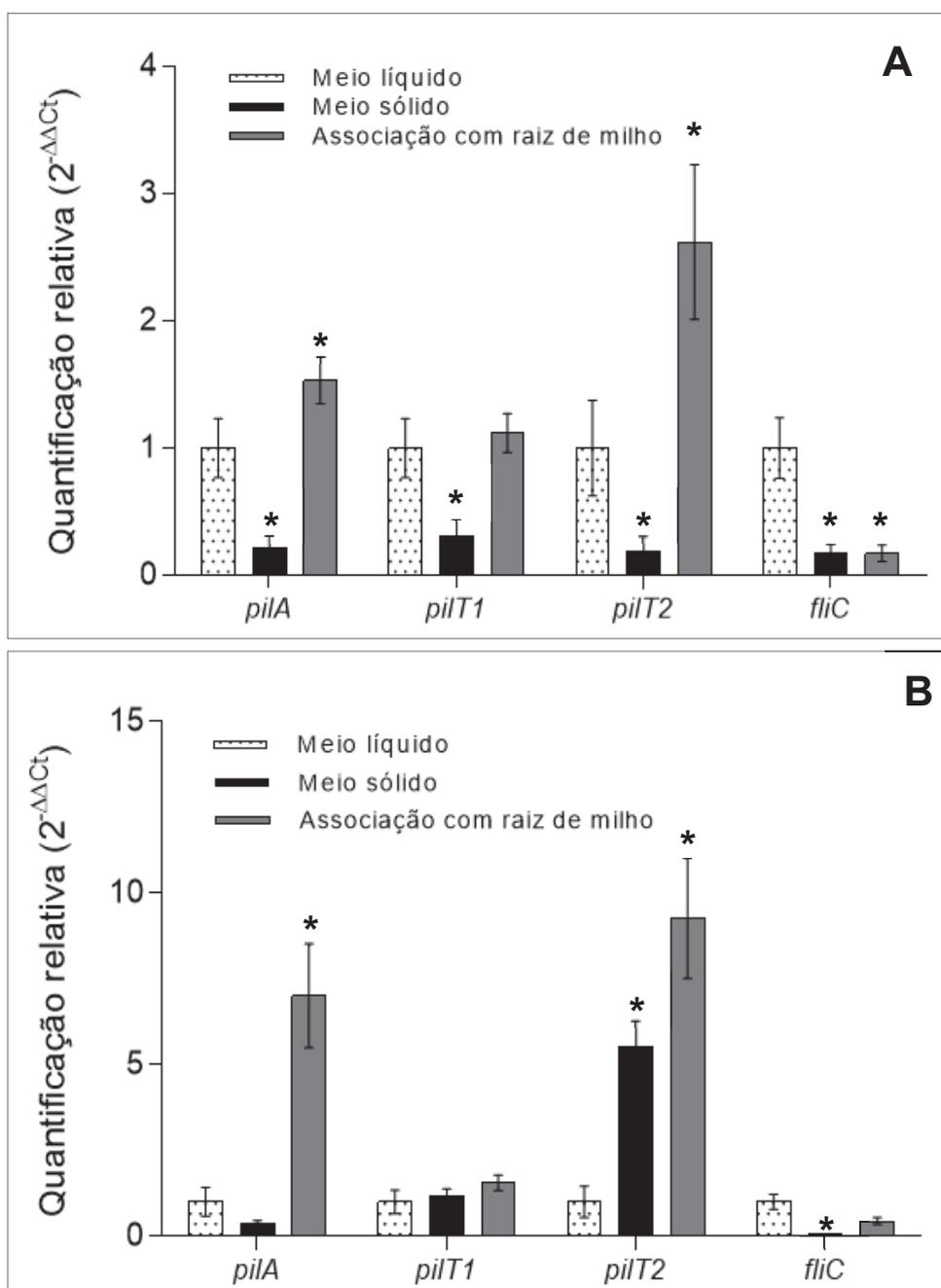


Figura 3 - QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA EM *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. Expressão dos genes do T4P *pilA*, *pilT1*, *pilT2* e do flagelo, gene *fliC* de **A)** *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e **B)** *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. Estirpes cultivadas em meio sólido NFbHPN – Malato ágar 1% e associadas epifiticamente a raízes de milho por RT- qPCR. Estas condições foram comparadas com células cultivadas em meio líquido NFbHPN - Malato. Os dados representam a média de três replicatas técnicas e 2 réplicas biológicas. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre as expressões dos genes nas condições teste em relação a condição controle (líquido) (Teste t Student) \* $p \leq 0,05$ . FONTE: O Autor.

## 6.2 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES PARA GENES NO T4P EM *Herbaspirillum* spp.

Com o objetivo de caracterizar estruturalmente e identificar o papel funcional do T4P na colonização de raízes de milho das bactérias promotoras do crescimento vegetal/fitopagênicas *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1, neste trabalho foram construídos mutantes para diferentes genes estruturais homólogos do T4P nestas duas espécies, descritos na Tabela 6. Inicialmente, vetores contendo o gene de interesse ou o gene parcial, deletado na sua região central, foram construídos para 4 dos 29 genes homólogos ao T4P em *H. seropedicae* SmR1 (CHICORA, 2015) e mais 4 genes para *H. rubrisubalbicans* M1. Posteriormente, mutantes com o gene interrompido no genoma das estirpes alvo foram obtidos para os genes *pilA*, *pilN*, *pilT2* e *pilT2/pilN* de *H. seropedicae* SmR1 e para os genes *pilA* e *pilN* de *H. rubrisubalbicans* M1.

Tabela 6 - Genes do T4P de *Herbaspirillum* spp. mutados e estratégia utilizada para mutação

GENE <sup>1</sup>	MUTANTE	ESTRATÉGIA <sup>2</sup>	PLASMÍDEOS
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1			
<i>pilA</i> (Hsero_0660)	SmR1_ <i>pilA</i>	Estratégia 2	pK_Hs0660
<i>pilN</i> (Hsero_0807)	SmR1_ <i>pilN</i>	Estratégia 2	pK_Hs0807
<i>pilT1</i> (Hsero_0816)	não obtido	Estratégia 1	pSUPAKmB(Hs0816)
<i>pilT2</i> (Hsero_3804)	SmR1Δ <i>pilT2</i>	Estratégia 1	pSUPsacBKm3804
<i>pilT2</i> e <i>pilN</i> (Hsero_0816 e 0807)	SmR1Δ <i>pilT2_pilN</i>	SmR1Δ <i>pilT2</i> + Estratégia 2	pK_Hs0807
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1			
<i>pilA</i> (0001.0624)	M1Δ <i>pilA</i>	Estratégia 1	pSUPsacBKm0624
<i>pilT1</i> (0001.2384)	não obtido	Estratégia 1	pKHr2384
<i>pilN</i> (0001.2394)	M1_ <i>pilN</i>	Estratégia 2	pK_Hr2394
<i>pilT2</i> (0001.3715)	não obtido	Estratégia 1	pKHr3715

<sup>1</sup>A identificação do gene é mostrada entre parênteses para as sequências genômicas depositadas no GenBank com os números de acesso CP002039 para *H. seropedicae* SmR1 e CP013737 para *H. rubrisubalbicans* M1; <sup>2</sup>estratégia como descrita no item 5.4 do Material e Métodos. FONTE: O Autor.

### 6.2.1 Obtenção de estirpes mutantes para genes do T4P em *Herbaspirillum* spp.

Para obter mutantes cromossomais para os genes alvo, as construções plasmidiais foram transferidas, por conjugação, para *H. seropedicae* SmR1 (pSUPsacBKm3804), e *H. rubrisubalbicans* M1 (pSUPsacBKm0624 e pKHr2384). Após a conjugação, colônias transconjugantes foram verificadas para a ocorrência da recombinação homóloga simples. Uma segunda seleção foi também realizada com meio de cultivo contendo sacarose e as colônias que cresceram em sacarose foram amplificadas para verificar a presença da cópia do gene parcialmente deletado.

Para a deleção do gene *pilT2* de *H. seropedicae*, em torno de 60 colônias transconjugantes foram verificadas, dentre as quais, 4 colônias foram selecionadas por apresentarem produtos de PCR com tamanhos esperados (1160 pb; Figura 4A) e, finalmente, apenas duas colônias foram confirmadas (Figura 4B) como estirpes mutantes após nova PCR com um par de oligonucleotídeos iniciadores diferente, que anelam na região da deleção, permitindo identificar mais claramente as estirpes mutantes (sem amplificação) daquelas selvagens (onde houve amplificação; Figura 4C).

A deleção do gene *pilA* de *H. rubrisubalbicans* M1 (M1 $\Delta$ pilA), foi obtida e confirmada a partir do fragmento amplificado por PCR de 1012 pb (Figura 5A)

Por outro lado, para a deleção do gene *pilT1* de *H. rubrisubalbicans* M1, obteve-se apenas uma colônia nas etapas de seleção e com o tamanho esperado de 1.035 pb confirmado por PCR (Figura 5B). Após re-inóculos em meio líquido e uma segunda etapa de seleção com sacarose, a confirmação por PCR indicou a presença do gene selvagem e do gene deletado, não sendo possível garantir a obtenção do mutante para esse gene (Figura 5C).

Os vetores pK\_Hs0660, pK\_Hs0807 e pK\_Hs2394, foram transferidos para as estirpes selvagens de *Herbaspirillum* spp. por conjugação. Após obtenção das colônias selecionadas em canamicina 500 ug/mL, essas foram amplificadas para confirmar a obtenção dos mutantes SmR1\_pilA, SmR1\_pilN, SmR1 $\Delta$ pilT2\_pilN e M1\_pilN, como é possível verificar na Figura 6.

Após as confirmações das estirpes mutantes por PCR, também foi realizada a confirmação por sequenciamento.

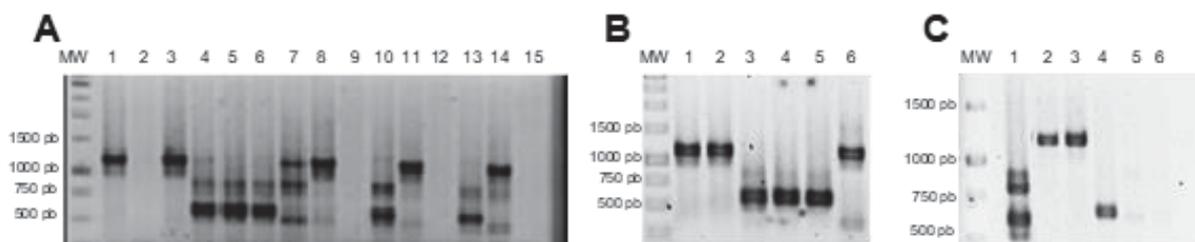


Figura 4 - CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES COM GENES DO T4P TRUNCADOS DE *H. seropedicae* SmR1. **A)** Seleção de colônias com perfil do gene deletado para o gene *pilT2* de *H. seropedicae* SmR1. Linhas 1 a 15: *screening* das colônias obtidas após o crescimento em sacarose 15%, amplificação com os oligonucleotídeos Hs3804E1F e Hs3804E3R. Linhas 1, 3, 8 e 11 representam as colônias que apresentaram banda com o tamanho esperado para o mutante *pilT2* (1160 pb). **B)** Nova amplificação após re-inóculo dos possíveis mutantes. Linhas 1 e 2: colônia 1 e 3 confirmadas (1160 pb); linhas 3 e 4: colônia 8 e 11 não confirmadas; linha 5: *H. seropedicae* SmR1 (amplificação inespecífica); linha 6: pSUPsacBKm3804 (1160 pb). **C)** Linhas 1 a 3, amplificações com os pares de primers Hs3804E1F e Hs3804E3R. *H. seropedicae* SmR1 apresenta amplificação inespecífica (linha 1) e, as colônias 1 e 3, perfil de mutante (1160 pb; linhas 2 e 3). Linhas 4 a 6, mostram amplificações com os pares de primers Hs3804delF e Hs3804delR (anelam na região deletada). Linha 4: *H. seropedicae* SmR1 (641 pb); linhas 5 e 6: não houve amplificação dos mutantes colônias 1 e 3. MW: padrão de massa molecular (pb). FONTE: O Autor.

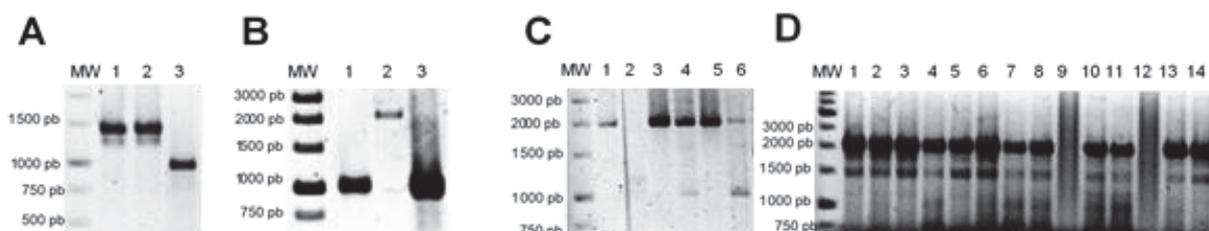


Figura 5 - CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES COM GENES DO T4P TRUNCADOS DE *H. rubrisubalbicans* M1 **A)** Perfil eletroforético do gene *pilA* de *H. rubrisubalbicans* M1. Linhas 1 e 2 indicam perfil da estirpe selvagem *H. rubrisubalbicans* M1 (1441 pb) cultivado em meio líquido e meio sólido, respectivamente. Linha 3 indica o perfil da estirpe mutante M1 $\Delta$ *pilA* obtida (1012 pb). **B)** Perfil eletroforético do gene *pilT1* de *H. rubrisubalbicans* M1. Linha 1: possível colônia mutante (1.035 pb); linha 2: *H. rubrisubalbicans* M1 (1973 pb), linha 3: amplificação de pKHr2384 (1035 pb). **C)** Linha 1: amplificação do gene *pilT1* de *H. rubrisubalbicans* M1 (1973 pb). Linhas 2 a 6: amplificações da possível colônia mutante do gene *pilT1*, identificada no gel B, após 2 re-inóculos em meio líquido. Observa-se o perfil de estirpes simples recombinante (cópia selvagem e cópia deletada; linhas 4 e 6) ou apenas selvagem (linhas 3 e 5). **D)** Amplificação do gene *pilT1* em colônias obtidas em sacarose 15%. MW: padrão de massa molecular (pb). FONTE: O Autor.

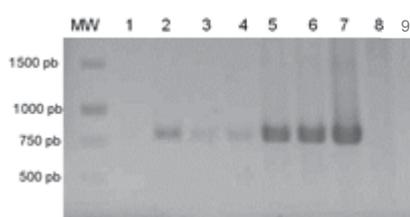


Figura 6 - CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES DE *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 GENES *pili* TIPO IV. Confirmação dos mutantes pela amplificação de um fragmento do vetor pK18mobsacB, com aproximadamente 760 pb. Linha 1: *H. seropedicae* SmR1; linha 2: SmR1\_ *pilA*; linha 3: SmR1\_ *pilN*; linha 4: SmR1 $\Delta$ *pilT2*\_ *pilN*.; linha 5: M1\_ *pilN*-1; linha 6: M1\_ *pilN*-2; linha 7: vetor pK18mobsacB purificado e vazio; linha 8: *H. rubrisubalbicans* M1; linha 9: controle negativo, sem DNA. MW: padrão de massa molecular (pb). FONTE: O Autor.

### 6.2.2 Construção do mutante *pilT1* de *H. seropedicae* SmR1

Após a confirmação da construção pSUPAKmB(Hs0816), esta foi transferida para *E. coli* S17.1, a fim de realizar conjugação com *H. seropedicae* SmR1. As colônias resultantes da conjugação, foram selecionadas em canamicina 500 µg/mL, e então repicadas simultaneamente em duas placas diferentes: uma com canamicina e a outra com cloranfenicol 30 µg/mL. As que não cresceram em cloranfenicol, foram amplificadas para verificar a presença do mutante. Neste caso, obteve-se muitas ampliações com perfil de gene selvagem (1.160 pb) e, apenas uma colônia (colônia 8), apresentou amplificação com duas bandas, referentes ao gene selvagem e ao gene mutante (1.924 pb) (Figura 7A). Assim, essa colônia foi repicada em meios sólido e líquido, contendo canamicina e nova PCR foi elaborada. Verificou-se a presença das duas bandas novamente (Figura 7 B). A presença da banda selvagem e mutante, não permite que seja possível concluir a obtenção desse mutante. Um trabalho publicado por Rosconi e colaboradores (2016), em que foram avaliados possíveis genes essenciais de *H. seropedicae* SmR1, cultivados em meio TY, através da análise de sequenciamento de inserção de transposon (Tn-seq), indicou que o gene *pilT1* (Hsero\_0816) é possivelmente um gene essencial. Dessa forma, a dificuldade em obter esse mutante pode ser explicada, se este gene também for essencial no crescimento em meio NFbHPN - Malato.

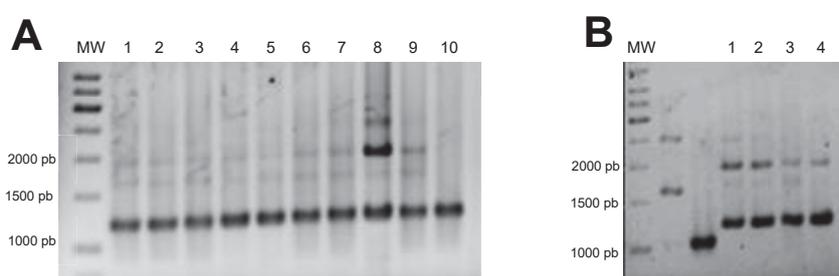


Figura 7 - SELEÇÃO DE COLÔNIAS COM PERFIL DO GENE DELETADO PARA O GENE *pilT1* de *H. seropedicae* SmR1. **A)** 1 ao 10: apenas a colônia 8 (linha 8) apresentou cópia do gene deletado (1924 pb). **B)** 1 ao 4 – ampliações da colônia 8 re-inoculada, apresentou novamente cópias do gene selvagem e mutante. FONTE: O Autor.

### 6.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS MUTANTES PARA GENES DO T4P EM *Herbaspirillum* spp.

#### 6.3.1 Perfil de crescimento entre estirpes selvagens e mutantes para genes do T4P

Para verificar se as mutações nos genes do T4P poderiam interferir no crescimento dos mutantes, o perfil de crescimento de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 selvagens e das estirpes mutantes em meio NFbHP-Malato líquido foi comparado. A multiplicação das bactérias foi acompanhada durante 12 h, até que atingissem a fase estacionária. Nas Figuras 8 e 9, vê-se que as estirpes apresentaram perfil de multiplicação semelhante, sem diferença significativa, indicando que o mutante cresce igualmente à estirpe selvagem. Isso permite a comparação experimental, para caracterização fenotípica das estirpes, sem que os resultados possam sofrer interferência devido a taxas diferentes de crescimento entre as estirpes selvagem e mutantes sendo comparadas.

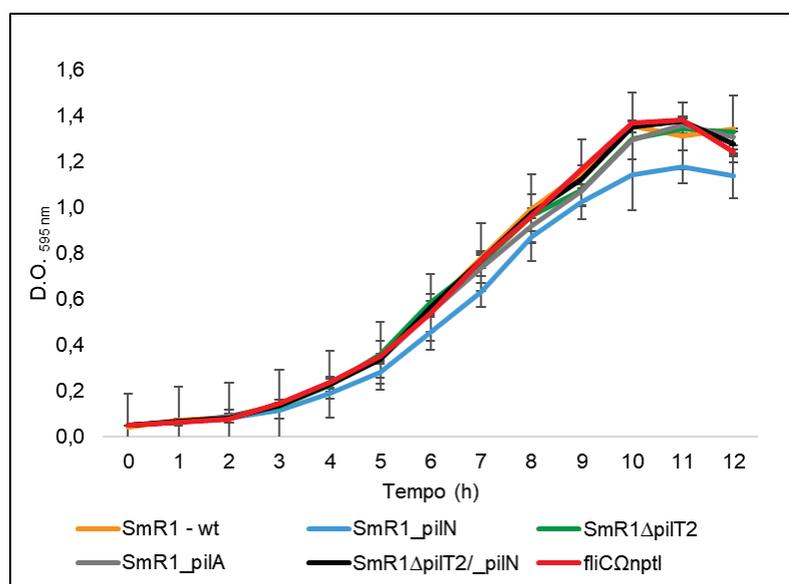


Figura 8 - CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES SELVAGENS E MUTANTES DE *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Cultivo em meio NFbHPN líquido com malato como fonte de carbono. As estirpes foram inoculadas a partir de D.O. <sub>595 nm</sub> 0,1, e a cada hora, foi verificada a absorbância das amostras. FONTE: O Autor.

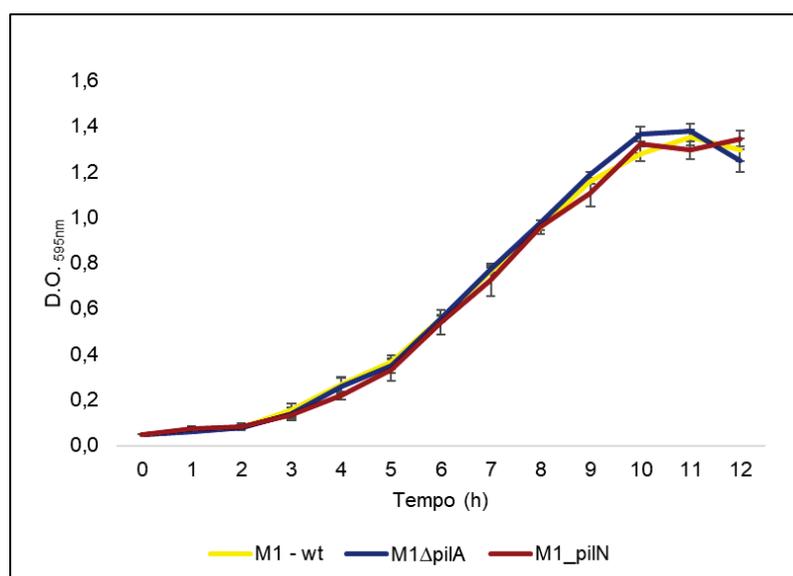


Figura 9 - CURVA DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES SELVAGENS E MUTANTES DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. Cultivo em meio NFbHPN líquido com malato como fonte de carbono. As estirpes foram inoculadas a partir de D.O. <sub>595 nm</sub> 0,1, e a cada hora, foi verificada a absorbância das amostras. FONTE: O Autor.

### 6.3.2 Os genes do T4P de *Herbaspirillum* spp. têm influência na capacidade formadora de biofilme

A formação de biofilme é um processo complexo e importante para efetiva colonização de raízes por parte das bactérias. A formação do biofilme envolve a agregação das bactérias em uma superfície e é possível que elementos estruturais do T4P interfiram neste processo. Com este objetivo, dois mutantes para genes do T4P foram comparados com as respectivas estirpes selvagens em *H. seropedicae* SmR1 (*pilT2*, que codifica a ATPase necessária para a despolimerização do *pili*) e *H. rubrisubalbicans* M1 (*pilA*, que codifica a principal pilina formadora do *pili*). Na comparação da formação de biofilme em fibra de vidro, o mutante SmR1 $\Delta$ pilT2 mostrou ser capaz de produzir mais biofilme em relação ao *H. seropedicae* SmR1 selvagem (Figura 10A). Contrariamente, a estirpe mutante M1 $\Delta$ pilA foi capaz de formar menos biofilme do que a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (Figura 10B). Assim, nota-se que os genes T4P de *Herbaspirillum* spp. tem influência na formação de biofilme em superfícies abióticas, como a fibra de vidro. A mutação nesses genes, pode aumentar ou diminuir a produção de biofilme.

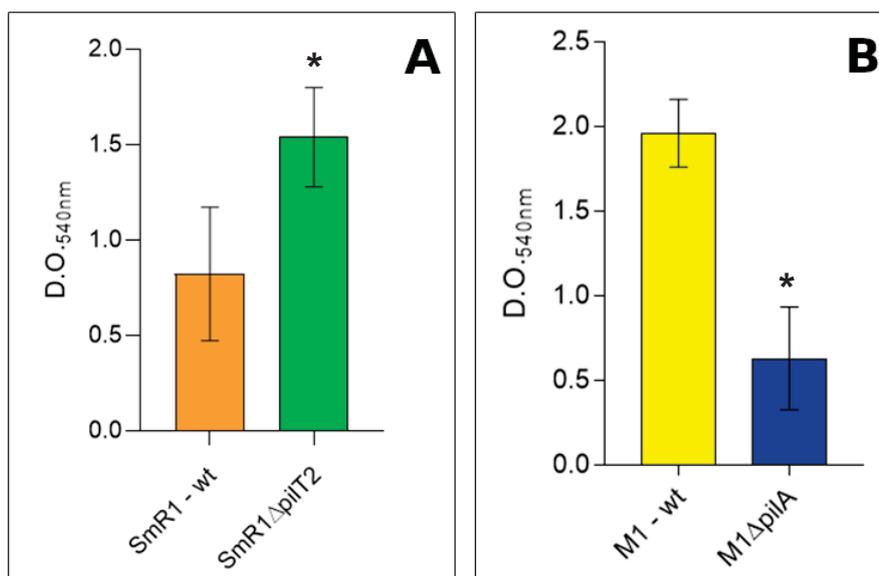


Figura 10 – FORMAÇÃO DE BIOFILME EM FIBRA DE VIDRO PELAS ESTIRPES SELVAGEM *H. seropedicae* SmR1 E *H. rubrisubalbicans* M1, E, SEUS RESPECTIVOS MUTANTES, SmR1 $\Delta$ pilT2 E M1 $\Delta$ pilA. As estirpes foram inoculadas com D.O.<sub>595nm</sub> inicial 0,2, em meio NfbHPN – Malato líquido, na presença de 50 mg de fibra de vidro. Quarenta e oito horas depois, o meio foi removido, a fibra corada com cristal violeta 1% e lavada com etanol absoluto. O etanol foi usado para realizar a leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda a 540 nm. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre as estirpes mutantes e estirpes selvagens (Teste t Student) \*p  $\leq$  0,05. FONTE: O Autor.

### 6.3.3. Genes do T4P atuam na motilidade por *twitching* e *swarming* em *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1

A estrutura do T4P está diretamente envolvida na motilidade da bactéria conhecida como *twitching*. Sendo assim, as estirpes selvagem e mutantes para os genes do T4P foram comparados em ensaios para visualizar experimentalmente o *twitching motility* em meio de cultivo com concentrações de ágar acima de 1%. Nestas concentrações de ágar, o *swarming motility* pode ser inibido (KEARNS, 2010), dependendo das espécies de bactérias. Dessa forma, ensaios foram realizados em placas de Petri contendo uma fina camada de meio de cultivo em ágar 1%, que permite caracterizar a motilidade por *twitching* através do crescimento de uma película intersticial, ou seja, pela presença de um espalhamento entre o ágar e o fundo da placa de Petri (SEMMLER, 1999). Verificou-se a presença de um pequeno crescimento, porém, difícil de avaliar quantitativamente, uma vez que os halos são

pequenos e com uma morfologia diversificada. No entanto, essa é principal maneira de observar a motilidade *twitching*, e aqui verifica-se que ocorre em *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. As estirpes SmR1\_pilA, SmR1\_pilN, SmR1 $\Delta$ pilT2/\_pilN, parecem desenvolver menos essa motilidade, como observado Na Figura 11.

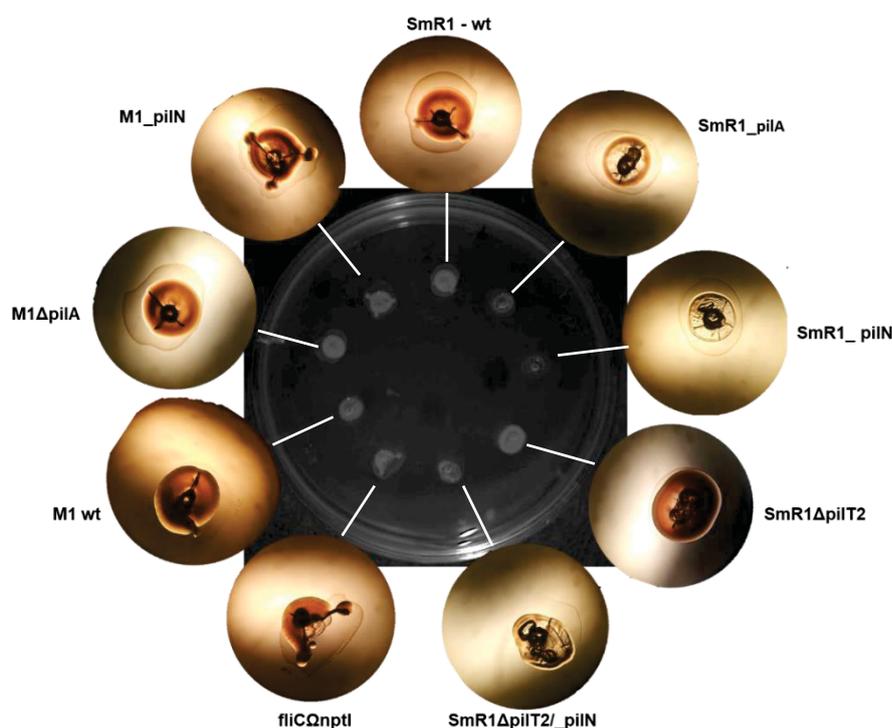


Figura 11 - CULTIVO EM ÁGAR 1% PARA AVALIAR A MOTILIDADE DO TIPO *TWITCHING*. As bactérias foram inoculadas com a perfuração do fino meio de cultura, usando a ponteira, e, 2  $\mu$ L de inóculo a D.O.  $_{595nm}$  0,5, foram dispensados na placa. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. O crescimento na região intersticial foi avaliado após a incubação. Em cinza escuro, placa fotografada; o detalhe indica a visualização em lupa das mesmas colônias, aumento de 20X. FONTE: O Autor.

Ensaio semelhante também foram realizados em meios de cultivo em placas de Petri com concentrações de ágar 0,3, 0,5 e 0,8% (Figura 12), normalmente recomendadas para observação do *swarming motility*, uma vez que a motilidade *swimming* é inibida (KEARNS, 2010). Neste primeiro ensaio, as culturas foram depositadas na forma de gota sobre a superfície do meio. Após 48 horas de crescimento, observou-se que as colônias em ágar 0,8%, apresentavam mais *swarming* do que as outras concentrações e, SmR1\_pilA e SmR1\_pilN apresentaram espalhamento levemente reduzido (Figura 12C).

Em ágar 0,3%, inoculando as bactérias perfurando o meio, observou-se a formação de um halo a partir do ponto do inóculo, esse halo foi maior na estirpe mutante de *H. seropedicae* SmR1 para o gene *pilT2* (SmR1 $\Delta$ pilT2), apresentando média de 5,6 cm de diâmetro, enquanto para a estirpe selvagem a média foi de 2,3 cm após 48 h de crescimento (Figura 13 E Figura 15A), os outros mutantes (SmR1\_pilA, SmR1\_pilN, SmR1 $\Delta$ pilT2/\_pilN e fliC $\Omega$ nptI) apresentaram espalhamento bem reduzido em relação à *H. seropedicae* SmR1, em torno de 0,5 cm de diâmetro após o mesmo período de incubação. Em meio com concentração de ágar 0,175%, em que o *swimming* é bem estimulado e evidente, observou-se perfil de espalhamento semelhante ao anterior, com halo proporcionalmente maior. Apenas o mutante SmR1 $\Delta$ pilT2\_pilN apresentou halo menor que em 0,3% (Figura 13).

A estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 apresentou um crescimento maior que a estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1, observados através da comparação do tamanho médio do diâmetro do halo de crescimento das colônias em ágar 0,3%, que foram 6,9 cm e 2,0 cm, respectivamente. De forma semelhante ao observado para *H. seropedicae* SmR1, o mutante para o gene *pilA* (M1 $\Delta$ 0624) em *H. rubrisubalbicans* M1 mostrou um crescimento muito inferior ao do selvagem, com halo médio de 2,9 cm. Por outro lado, o mutante para o gene *pilN* (M1\_pilN) não apresentou diferença significativa em relação a estirpe selvagem (Figura 14 e Figura 15B). Em ágar 0,175%, o espalhamento foi maior para todas as estirpes.

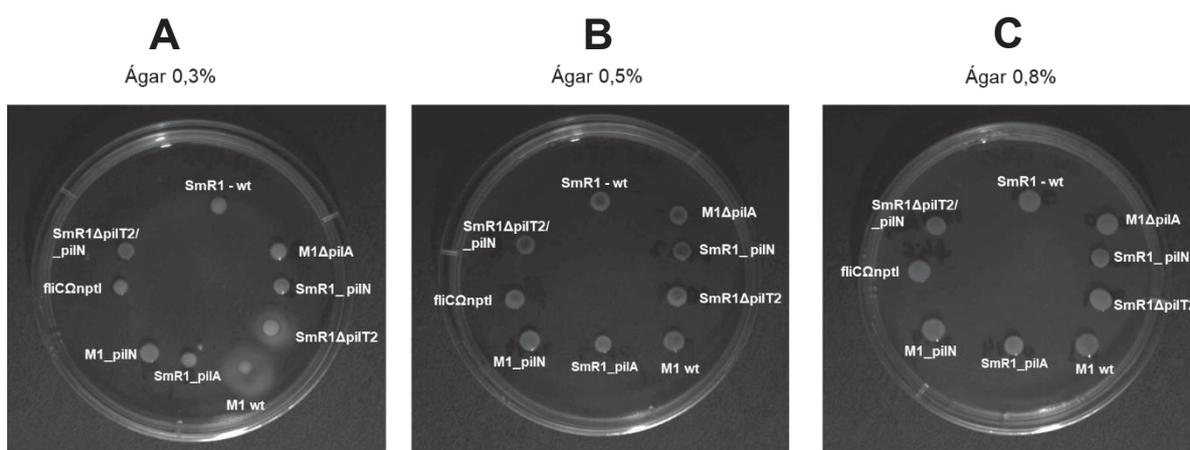


Figura 12 – ENSAIO DE SWARMING EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR COM AS ESTIRPES SELVAGENS E MUTANTES DE *Herbaspirillum* spp. A) Ágar 0,3%; B) ágar 0,5% e C) ágar 0,8%. FONTE: O Autor.

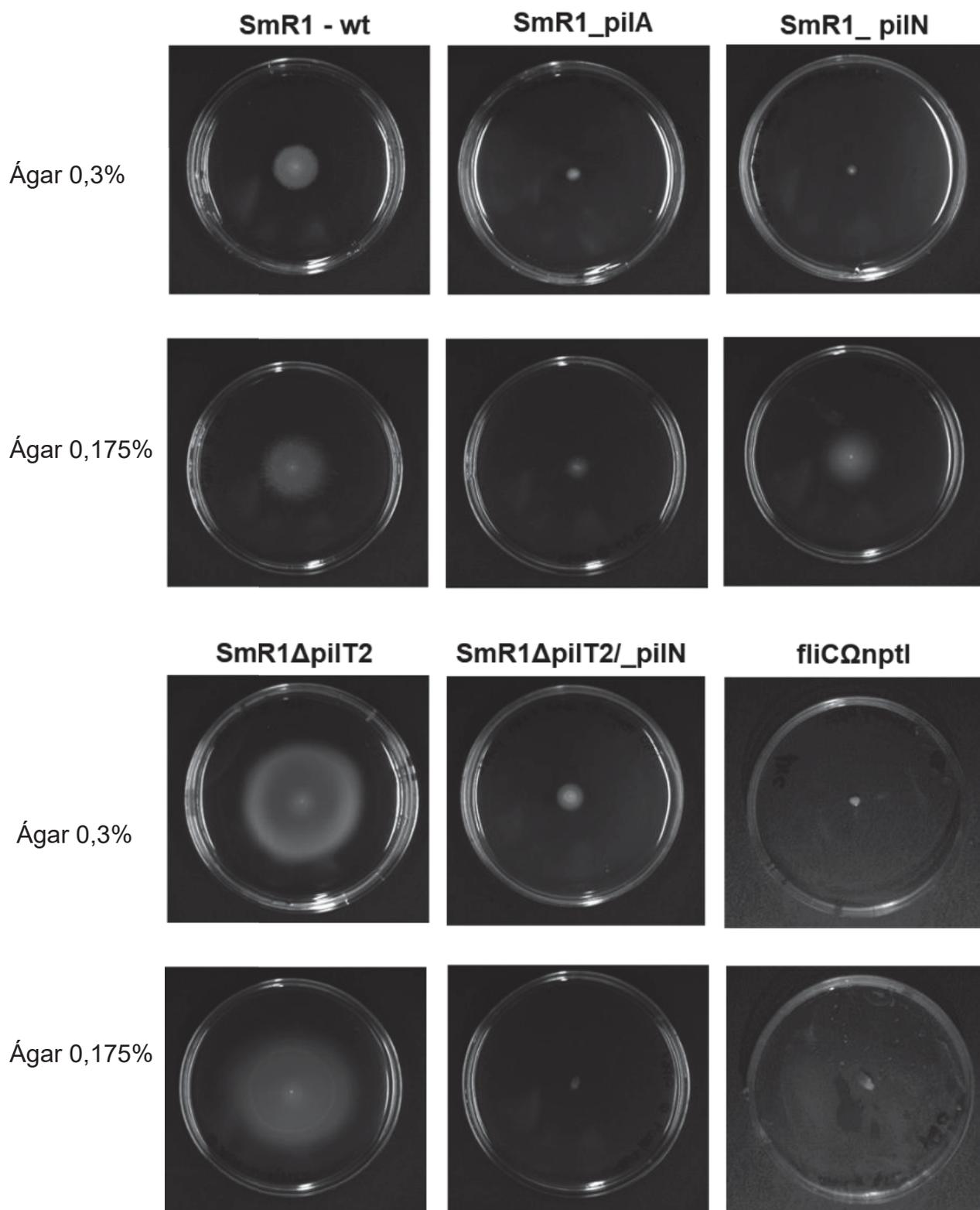


Figura 13 - ENSAIO DE SWARMING E SWIMMING MOTILITY DAS ESTIRPES MUTANTES E SELVAGEM DE *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Placas de Petri com meio de cultivo NFbHPN sólido (0,3% e 0,175% de ágar) com malato como fonte de carbono para estirpes selvagem e mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. FONTE: O Autor.

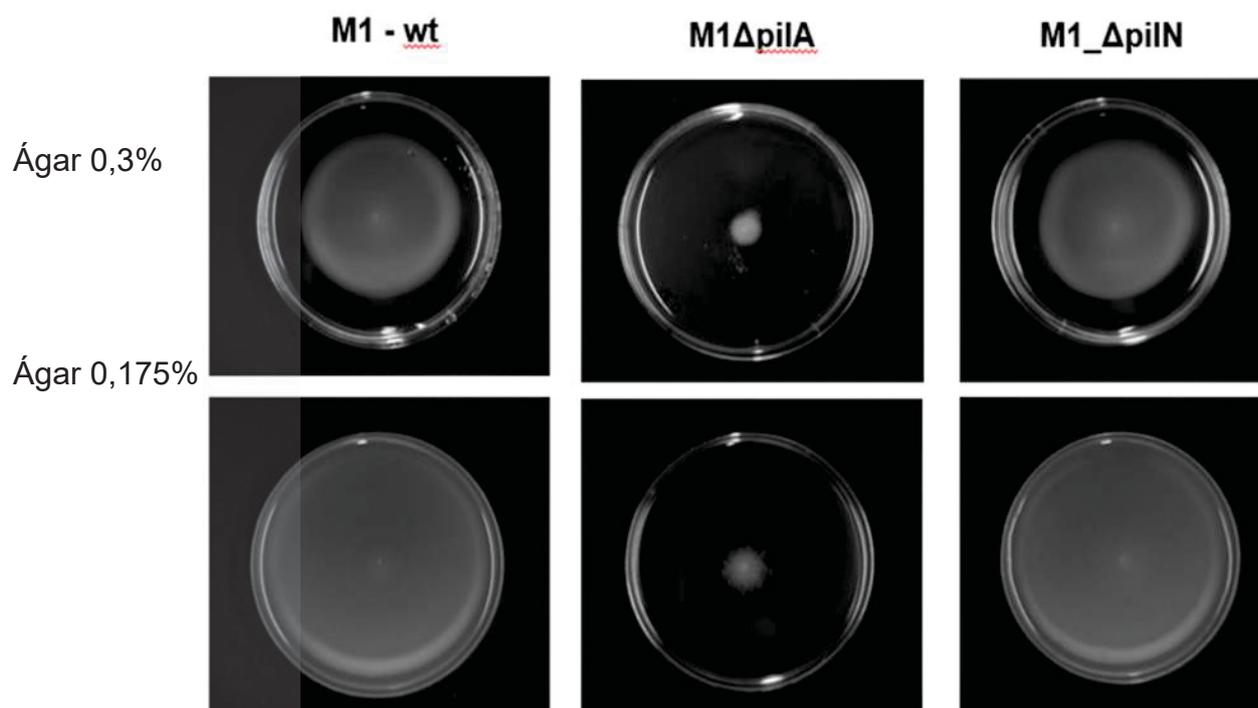


Figura 14 - ENSAIO DE SWARMING E SWIMMING MOTILITY DAS ESTIRPES MUTANTES E SELVAGEM DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. Placas de Petri com meio de cultivo NFbHPN sólido (0,3% e 0,175% de ágar) com malato como fonte de carbono, fotografadas após 48h de incubação a 30°C. Estirpes selvagem e mutantes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. FONTE: O Autor.

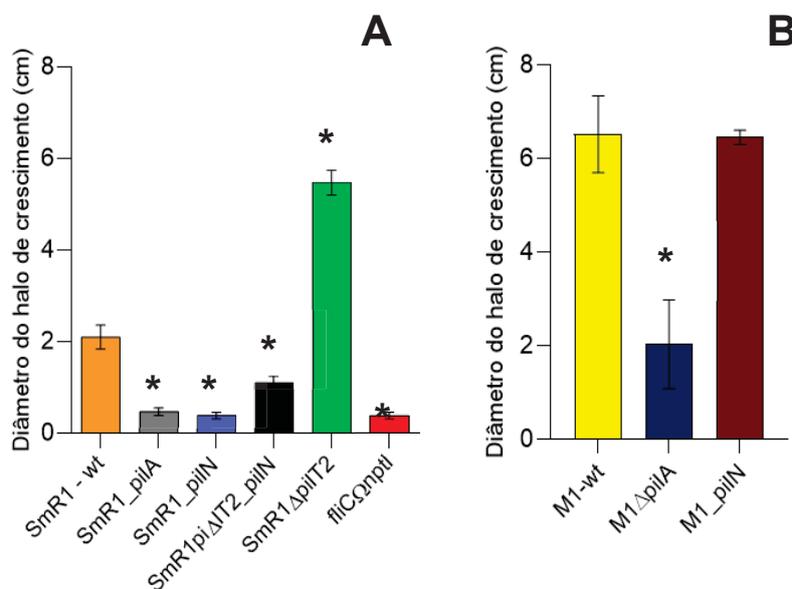


Figura 15 – DIÂMETRO DOS HALOS EM CENTÍMETROS EM ÁGAR 0,3%. Após 48h de incubação os halos foram medidos. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre as estirpes mutantes e estirpes selvagens (Teste t Student) \* $p \leq 0,05$ . FONTE: O Autor.

#### 6.3.4 Identificação e caracterização da estrutura do T4P em *Herbaspirillum* spp.

Microscopia eletrônica de transmissão tem sido empregada para visualizar a estrutura do T4P em diferentes espécies de bactérias, quando cultivadas em meio sólido (COWLES & GITAI, 2010; RIVERA & FOREST, 2017). Para identificar a estrutura do T4P em *Herbaspirillum* spp., também foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão a partir de bactérias crescidas em meio de cultivo sólido, com concentração de ágar 1,5 %, ou a partir de células desprendidas das raízes de milho após um dia da inoculação. A estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1, apresentou flagelos polares e estruturas bem finas semelhantes ao T4P em meio de cultivo sólido (Figura 16A), mas quando associado ao milho, os flagelos apareceram bem desenvolvidos ou então as células apareceram circundadas por abundante biofilme (Figura 16B). Entretanto, não foram observados flagelos nos mutantes para os genes *pilA* e *pilN* e duplo mutante *pilT2/pilN* (SmR1\_ *pilA*, SmR1\_ *pilN* e SmR1Δ*pilT2\_pilN*; Figura 16C e Figura 17A e 17C) ou poucos flagelos e/ou flagelos mais curtos no mutante *fliCΩnptI* (Figura 17D). Já a estirpe mutante para o gene *pilT2* (SmR1Δ*pilT2*; Figura 17B), mostrou flagelos bem desenvolvidos e alongados além de apresentar o T4P em grande quantidade, sendo sua estrutura claramente diferenciada daquela do flagelo. Não foi possível observar a estrutura do T4P nos demais mutantes, exceto no mutante duplo SmR1Δ*pilT2\_pilN* onde a estrutura foi observada bem fina e pouco abundante (Figura 17C).

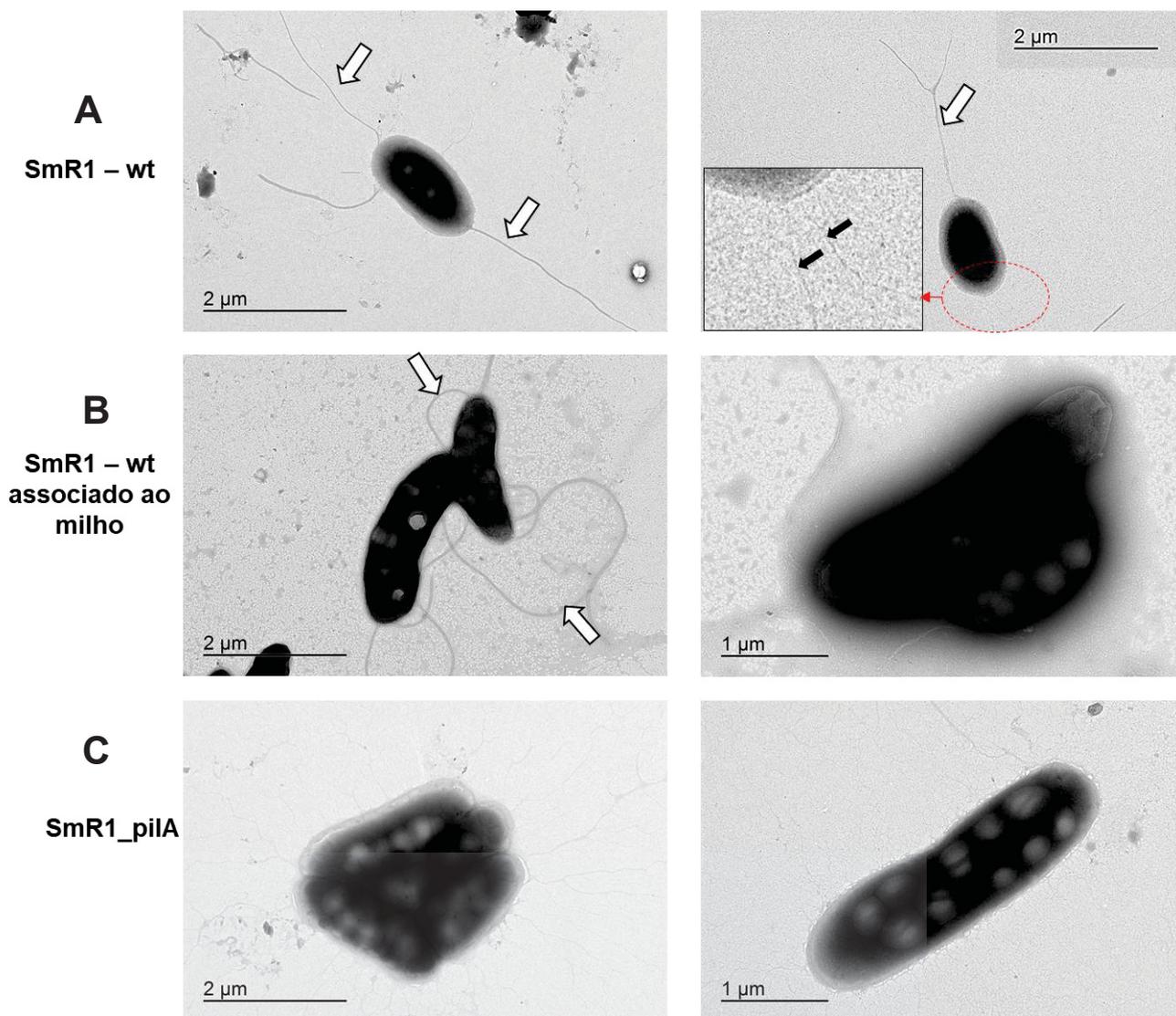


Figura 16 – MICROGRAFIAS OBTIDAS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM). Estirpes selvagem e mutantes de *H. seropedicae* SmR1. Setas brancas indicam flagelos; setas pretas indicam o T4P; círculo pontilhado vermelho indica região ampliada no detalhe. FONTE: O Autor.

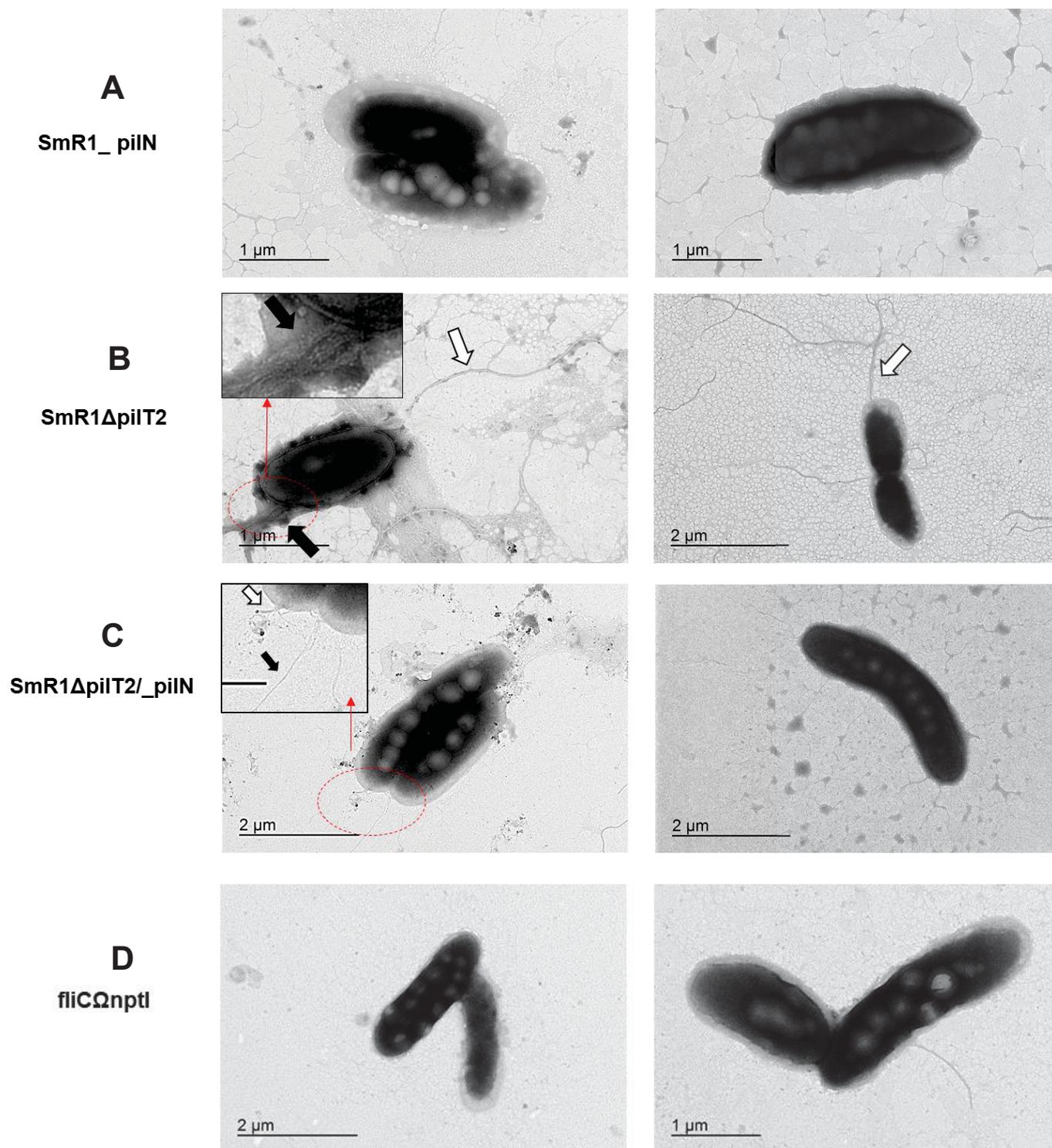


Figura 17 - MICROGRAFIAS OBTIDAS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM). Estirpe selvagem e mutantes de *H. seropedicae* SmR1. Setas brancas indicam flagelos; setas pretas indicam o T4P; círculo pontilhado vermelho e seta, indicam região ampliada no detalhe. FONTE: O Autor.

### 6.3.5 Extração de proteínas de superfície

Visando identificar a presença de proteínas T4P na superfície das células de *H. seropedicae* SmR1 e do mutante SmR1 $\Delta$ pilT2, proteínas da superfície foram isoladas das duas estirpes crescidas em meio NFbHPN-Malato sólido, seguida de agitação vigorosa, centrifugação e diálise com troca de pH. Os extratos proteicos foram analisados por eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE 12%(m/v)) (Figura 17). Analisando o gel é possível identificar que possivelmente o perfil de proteínas obtidas para cada estirpe é um pouco diferente. Por exemplo, na figura 18B, em P4, observamos uma banda bem concentrada e purificada.

Um total de 10 bandas proteicas foram excisadas dos dois géis e os fragmentos analisados por MALDI-TOF. Apenas duas proteínas foram identificadas com score aceitável (representadas na Figura 19), uma porina em *H. seropedicae* SmR1 (linha 1) e flagelina em SmR1 $\Delta$ pilT2 (linha 5).

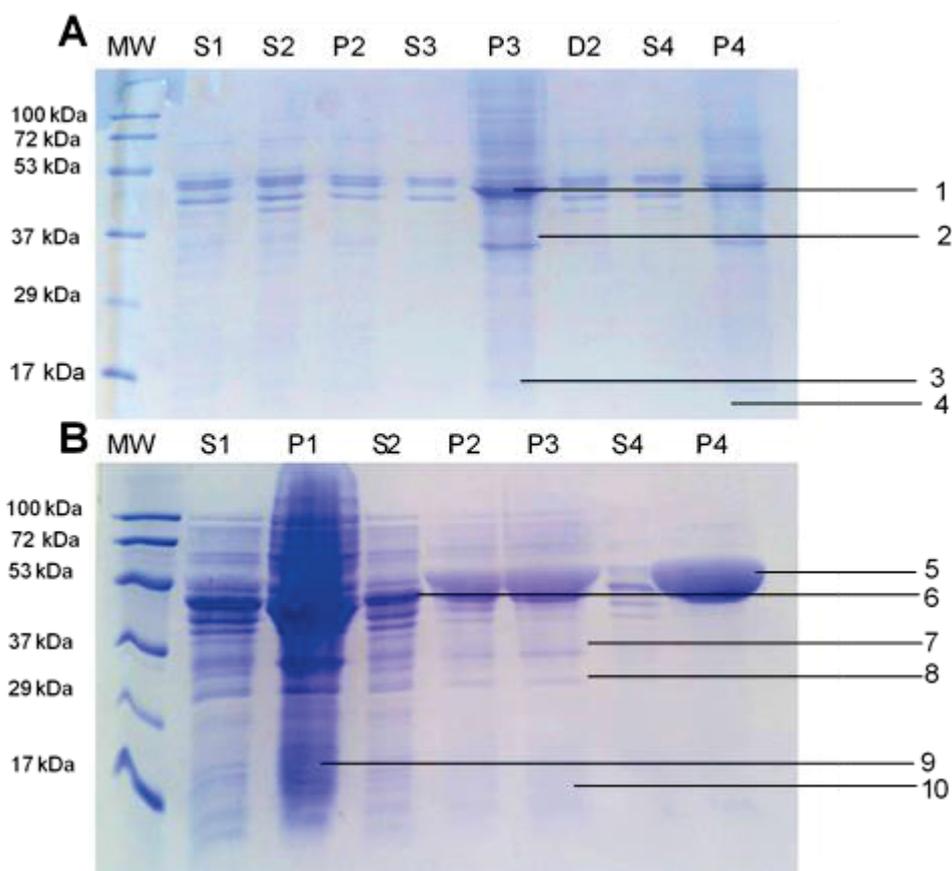
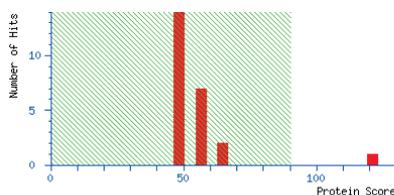


Figura 18 - ELETROFORESE DAS FRAÇÕES ADQUIRIDAS DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE. **A**) refere-se as proteínas purificadas em *H. seropedicae* SmR1; **B**) proteínas do mutante SmR1 $\Delta$ pilT2\_pilN. S: Sobrenadante; P: *pellet*. FONTE: O Autor.

**A****Mascot Score Histogram**

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 90 are significant ( $p < 0.05$ ).

**Concise Protein Summary Report**

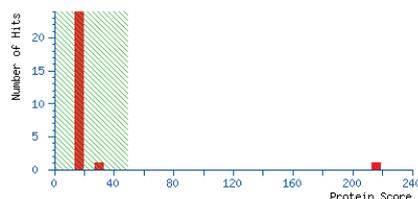
Format As	Concise Protein Summary	<a href="#">Help</a>
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Preferred taxonomy	All entries	

Re-Search All    Search Unmatched

1. [WP\\_013236220.1](#)    Mass: 39351    Score: **121**    Expect: 4.4e-05    Matches: 11  
porin [Herbaspirillum seropedicae]

**B****Mascot Score Histogram**

Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 49 are significant ( $p < 0.05$ ).

**Concise Protein Summary Report**

Format As	Concise Protein Summary	<a href="#">Help</a>
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits
Preferred taxonomy	All entries	

Re-Search All    Search Unmatched

1. [Hsero\\_2070](#)    Mass: 37323    Score: **216**    Expect: 1.2e-018    Matches: 19  
fliC flagellin protein; filament structural protein 2331271:2332359 reverse MW:37345

Figura 19 - ANÁLISE NO SOFTWARE MASCOT (MATRIX SCIENCE) PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS. **A)** *H. seropedicae* SmR1 – linha 1, identificou uma porina; **B)** SmR1 $\Delta$ pilT2 – linha 5, identificou flagelina. FONTE: O Autor.

### 6.3.6 Caracterização funcional de genes do T4P

*Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 são bactérias capazes de colonizar diferentes plantas endofiticamente e promover o crescimento vegetal. Para determinar se genes do T4P poderiam influenciar o processo de colonização de raízes de milho (*Zea mays* c.v. 30A37PW), ensaios de inoculação de plantas foram realizados com *H. seropedicae* SmR1 e a colonização quantificada através da contagem de células de bactérias aderidas às raízes. Os resultados mostraram diferenças no número de células por grama de raiz obtidas para as estirpes mutantes em relação à estirpe selvagem, sugerindo que os produtos dos genes do T4P são importantes durante a interação planta-bactéria. A contagem de células foi realizada para bactérias aderidas às raízes (Figura 20) e bactérias endofíticas (figura 21), colonizando o interior do tecido radicular em amostras obtidas durante 7 dias de cultivo, após a inoculação com a bactéria. No ensaio de adesão à superfície radicular, as raízes foram mantidas submersas nas culturas de bactérias durante 30 minutos. Neste ensaio, a estirpe mutante para o gene *pilN* (SmR1\_ *pilN*) não foi capaz de aderir às raízes, e o mutante para o gene estrutural do flagelo *fliC* (*fliC* $\Omega$ nptI) apresentou uma redução de 10 vezes no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas por grama de raiz.

Os mutantes para os genes *pilA* e *pilN* (SmR1\_*pilA* e SmR1\_*pilN*), mostraram redução na colonização no primeiro e terceiro dias após inoculação. Esta tendência foi mantida para o mutante SmR1\_*pilN* no sétimo dia, mas revertida para o mutante SmR1\_*pilA*, que apresentou aumento em relação ao selvagem. Por outro lado, o mutante para o gene *pilT2* (SmR1 $\Delta$ *pilT2*) mostrou um aumento de aproximadamente 10 vezes no primeiro dia e de 100 vezes no terceiro dia, mas atingiu níveis semelhantes ao selvagem no sétimo dia. Contrariamente, o duplo mutante para os genes *pilT2* e *pilN* (SmR1 $\Delta$ *pilT2\_pilN*) mostrou tendência de redução na capacidade de colonização ao longo dos 7 dias.

Não houve variação significativa na colonização pelo mutante do gene estrutural do flagelo *fliC* (*fliC* $\Omega$ *nptI*) em relação ao selvagem nos três dias de amostragem.

A colonização endofítica das raízes também foi avaliada no primeiro, terceiro e sétimo dias após a inoculação (Figura 21). De forma geral, o mutante *fliC* $\Omega$ *nptI* apresentou o mesmo comportamento observado para colonização epifítica, sem variação significativa em relação ao selvagem. O mutante SmR1 $\Delta$ *pilT2* também seguiu a tendência anterior de aumento na colonização, em relação ao selvagem, ao longo dos dias amostrados. Entretanto, o comportamento para os mutantes SmR1\_*pilA* e SmR1\_*pilN* foi muito variável, não sendo possível detectá-los em todas as amostras, mas atingiram níveis próximos ao do selvagem no dia 7. Finalmente, o duplo mutante SmR1 $\Delta$ *pilT2\_pilN* também apresentou grande variação, não sendo detectado no dia 3, mas, diferentemente do observado para colonização epifítica, mostrou tendência a aumento na colonização endofítica e não apresentou variação significativa em relação ao selvagem.

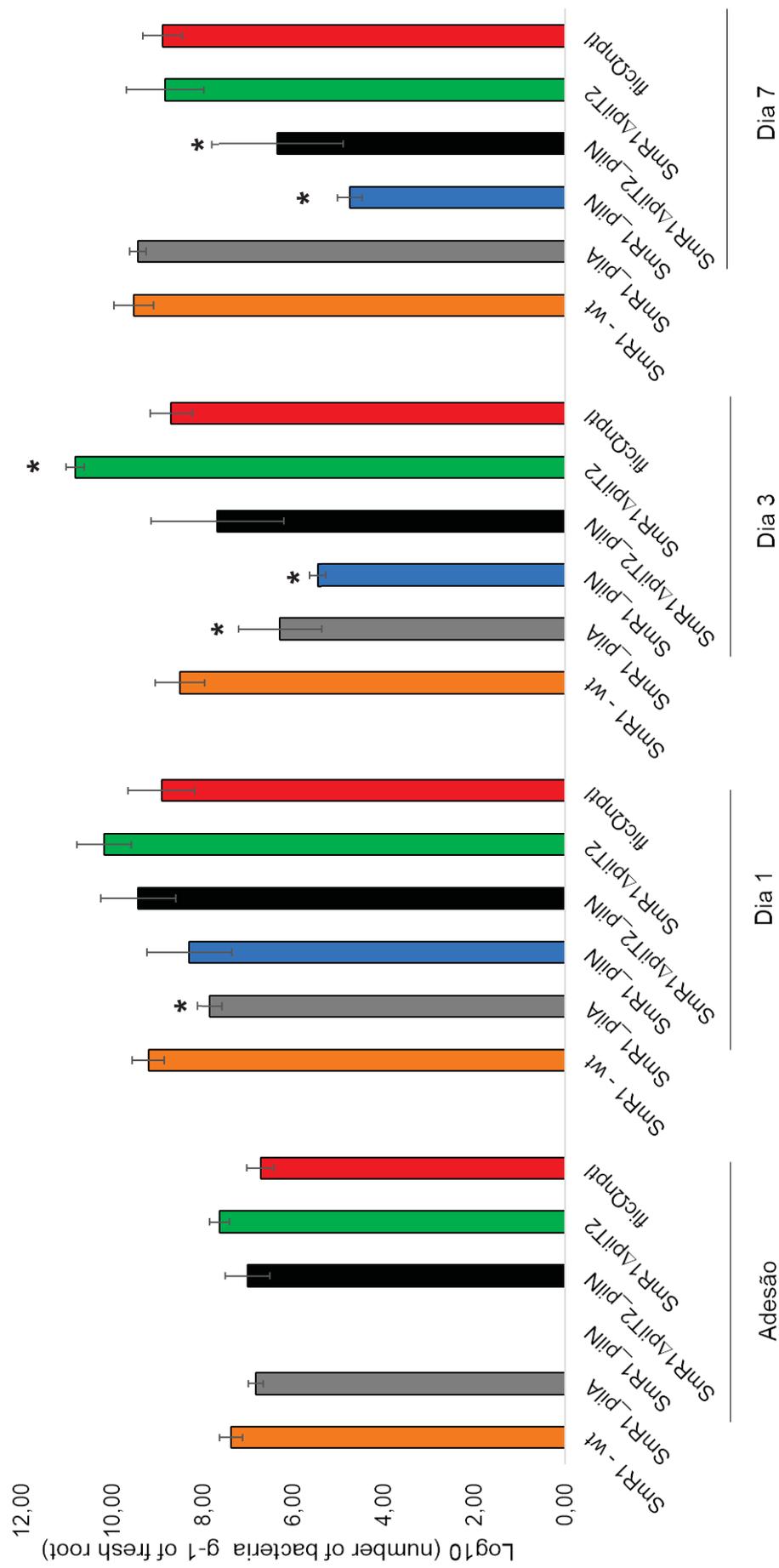


Figura 20 – ENSAIO DE COLONIZAÇÃO EPIFÍTICA EM RAÍZES DE MILHO INDICA A IMPORTÂNCIA DE GENES T4P PARA O ESTABELECIMENTO DE *H. seropedicae* DURANTE A COLONIZAÇÃO. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre as estirpes mutantes e estirpes selvagens (Teste t Student) \*p ≤ 0,05. FONTE: O Autor.

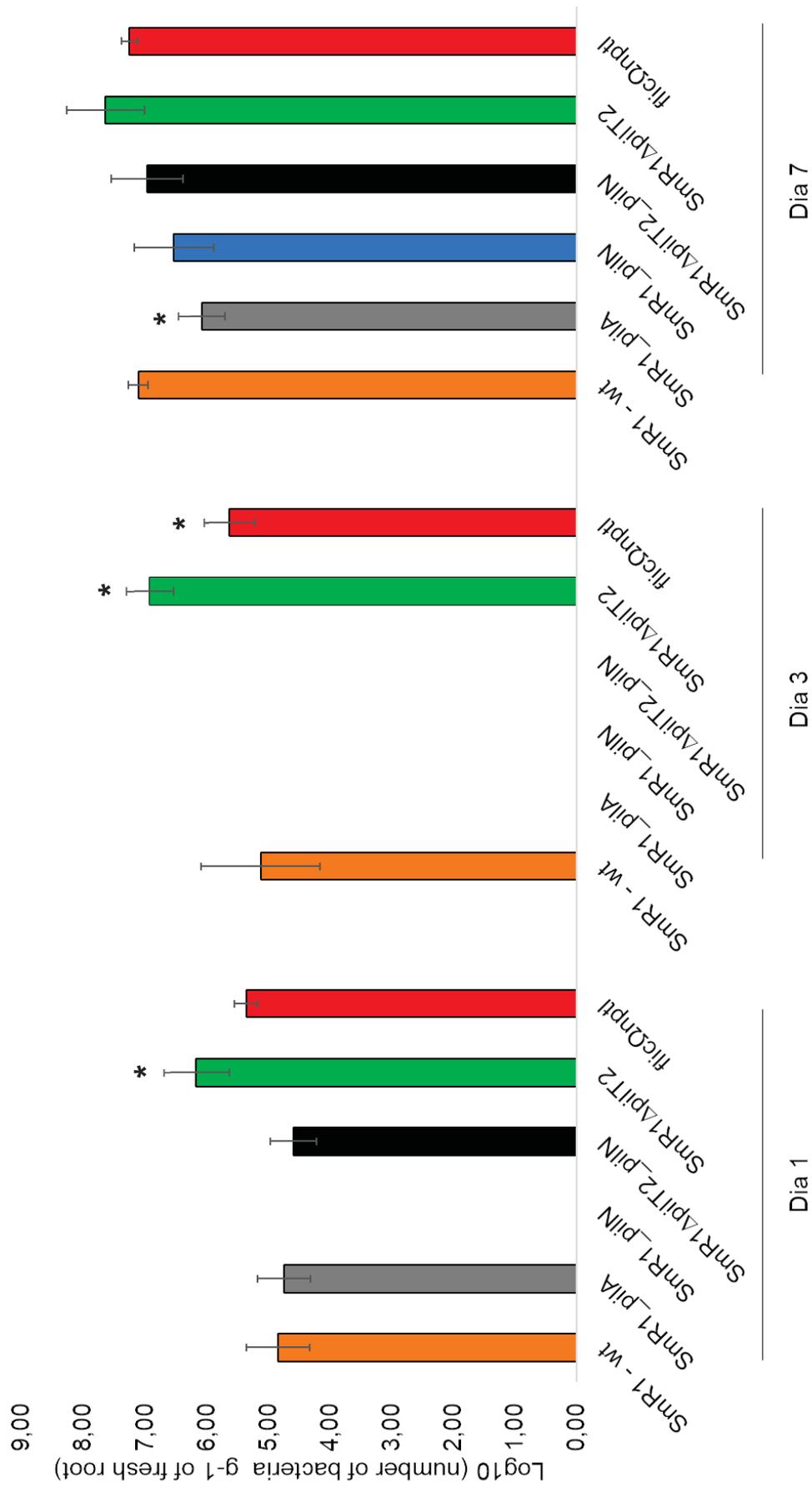


Figura 21 - ENSAIO DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA EM RAÍZES DE MILHO INDICA A IMPORTÂNCIA DE GENES T4P PARA O ESTABELECIMENTO DE *H. seropedicae* DURANTE A COLONIZAÇÃO. Asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre as estirpes mutantes e estirpes selvagens (Teste t Student) \* $p \leq 0,05$ . FONTE: O Autor.

## 7 DISCUSSÃO

O *pili* do tipo IV é normalmente caracterizado como uma estrutura filamentar formada por subunidades de pilina, as quais são polimerizadas em *pili* pela proteína PilB e, despolimerizadas pela proteína PilT. O *pili* atinge a superfície por meio de PilQ, e outras proteínas como PilN, PilO e PilM intermedeiam sinais e auxiliam na estabilização da base do *pili*. O T4P está presente em uma ampla gama de espécies de bactérias e desempenha papéis na virulência, colonização do hospedeiro, formação de biofilme e na motilidade. Aqui, nós avaliamos os genes homólogos ao T4P em *Herbaspirillum* spp., através da expressão pela formação de mRNA, por meio de caracterização fenotípica de estirpes mutantes, identificação da estrutura e a sua influência na interação planta-bactéria.

Cowles e colaboradores (2010), verificaram a expressão dos genes *pilA* e *pilT* em *P. aeruginosa*, cultivada em meio líquido e em meio sólido. Neste estudo, a expressão do gene *pilA* aumentou 15 vezes em meio sólido quando comparado ao crescimento em meio líquido, diferente do que observamos para *Herbaspirillum* spp., em que a maioria dos genes apresentaram menor expressão em meio sólido do que em meio líquido (apenas *pilT2* apresentou maior expressão). Os autores sugerem que esse aumento da transcrição de *pilA* acontece devido ao estímulo do contato com a superfície o que permitiria aumento da expressão de genes do T4P. *Herbaspirillum* spp. possui genes que possuem homologia com outras pilinas (CHICORA, 2015), denominadas pilinas secundárias, que também podem compor o *pili*, como acontece em *P. aeruginosa* (GILTNER et al., 2010; NGUYEN et al., 2015), *Xylella fastidiosa* (LI et al., 2007) e *Myxococcus xanthus* (SHARMA et al., 2018). O gene *pilT* de *P. aeruginosa* (COWLES et al., 2010) não apresentou diferença de expressão nas condições comparadas e, o mesmo foi observado para o *pilT1* de *H. seropedicae* nos 3 meios testados, e também, para o gene *pilT1* de *H. rubrisubalbicans* associado ao milho. Ainda, no mesmo estudo, os autores sugerem que possa ocorrer regulação pós-transcricional, uma vez que foi encontrada maior quantidade da proteína PilT em *P. aeruginosa* cultivada em meio sólido do que a cultivada em meio líquido. Assim, talvez esse mesmo comportamento também possa ocorrer em *Herbaspirillum* spp. Por outro lado, Shikata e colaboradores (2015) não observaram diferenças significativas nos níveis de expressão dos genes *pilA* e *pilT* de *P. aeruginosa* PAO1, em células adesivas e planctônicas, cultivadas na presença de superfícies bióticas e abióticas, o

que mostra um comportamento variável dos mesmos genes na mesma espécie de bactéria, mas de estirpes diferentes.

Nos estudos de Taguchi & Ichinose (2011) mostrou-se que a estirpe mutante *pilA* de *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci 6605, perdeu a capacidade da motilidade *swarming* e apresentou capacidade bem reduzida de natação por flagelos (*swimming*), assim como visto nos mutantes SmR1\_*pilA* e M1Δ*pilA* deste trabalho. O mutante SmR1Δ*pilT2* mostrou motilidade mais acentuada tanto em meio com ágar 0,125% e 0,3%. No entanto, alguns estudos mostraram aumento de *swarming* em *P. aeruginosa* com a deleção do gene *pilA* (SHROUT et al., 2006; ANYAN et al., 2014), o que não foi observado em SmR1\_*pilA* e em M1Δ*pilA*. No caso de *P. aeruginosa*, os autores observaram que o T4P de uma célula interage com T4P de outra célula durante o *swarming*, para promover a interação célula-célula e limitar o movimento individual durante a expansão. Assim, o mutante *pilA* de *P. aeruginosa* ao apresentar alteração na formação do T4P, perde essas interações célula-célula mediadas pelo *pili*, tornando o *swarming* pelo flagelo mais individualizado e permitindo uma movimentação mais livre (ANYAN et al., 2014). Apesar de não ser o mesmo gene com mutação em *H. seropedicae* SmR1 que causa maior motilidade, algo semelhante também pode estar acontecendo na bactéria. Outra hipótese, é que a mutação do gene *pilT2* em *H. seropedicae* SmR1 possa estar refletindo nos genes que transcrevem proteínas flagelares, aumentando sua atividade ou a sua produção. Há evidências de que alguns genes, como o gene *pilR* e *pilS* de *P. aeruginosa* também regulem a expressão dos flagelos (KILMURY & BURROWS, 2018).

No mutante SmR1\_*pilN* é possível notar drástica redução de *swarming*, enquanto no ensaio de *swimming* nota-se que essa redução não é tão acentuada. Além disso, o duplo mutante SmR1Δ*pilT2\_pilN*, também apresentou redução de *swarming*, mostrando que a proteína PilN tem um papel importante para a motilidade da bactéria e corrobora com os resultados do mutante SmR1\_*pilN*. Já o mutante M1\_*pilN*, não mostrou diferença na motilidade, o que indica a possibilidade de existirem algumas diferenças na regulação dos genes do T4P de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. Ayers e colaboradores (2009) verificaram ao truncar o gene *pilN*, que a proteína PilN é essencial para o *twitching motility* em *P. aeruginosa*. Neste estudo os autores sugerem que o complexo *pilMNOPQ* interliga os componentes citoplasmáticos com os da membrana externa e que a interação entre PilO e PilP não é estável na ausência de PilN. Além disso, verificou-se que a proteína PilN forma um

heterodímero com a proteína PilO, e a proteína PilP interage com o PilNO, e, assim juntas estabilizam a secretina PilQ (TAMMAM et al., 2011). Dessa forma, nota-se a importância de PilN na estabilização de todo complexo.

O mutante SmR1 $\Delta$ pilT2 mostrou aumento na produção de biofilme em fibra de vidro em relação a estirpe selvagem. Isso também foi observado no mutante do gene *pilT* de *P. aeruginosa* PAK (CHIANG & BURROWS, 2003). Segundo os autores, esse aumento poderia ser justificado pela provável hiperpiliação, uma vez que a proteína responsável pela retração do *pili* estaria prejudicada, impedindo a retração do *pili*, e, assim, favoreceria a agregação celular e a maior produção de biofilme. No entanto, alguns estudos mostraram um fenótipo oposto, em que mutação no gene *pilT* resultou em baixa produção de biofilme, como em *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* M6 (BAHAR et. al, 2009). Já o mutante M1 $\Delta$ pilA, apresentou redução na formação do biofilme. Em mutantes para os genes *pilA* e *pilO* de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 (TAGUCHI & ICHINOSE, 2011), também visualizou-se habilidade reduzida de formação de biofilme. O mesmo foi observado em mutantes *pilT* e *pilM* de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* M6 (BAHAR et al., 2009), que tiveram menos biofilme formado.

Durante a interação de *H. seropedicae* notamos que há uma dificuldade do mutante SmR1\_PilN em aderir às raízes das plântulas de milho durante os primeiros 30 minutos do ensaio. No entanto, após o primeiro dia percebemos a presença da estirpe mutante em níveis comparáveis com a estirpe selvagem, mas no terceiro e sétimo dias o número de UFC por grama de raiz decaiu significativamente. Quando realizada a interação endofítica verificamos que no primeiro e terceiro dias, não observa-se a presença do mutante, mas, no sétimo dia encontramos quantidade de UFC por grama de raiz semelhante ao selvagem. Aqui podemos perceber, que há um claro atraso na colonização das superfícies endofítica e epifítica das raízes de milho pelo mutante SmR1\_pilN. Nas condições experimentais testadas, onde a planta foi cultivada em condições estéreis, bactéria inoculada consegue realizar a colonização interna do tecido radicular, porém demora mais para se estabelecer. Em um cenário de competição com outras bactérias, esta pode representar uma grande desvantagem, impedindo a colonização. Provavelmente, encontramos bactérias epifíticas após o primeiro dia e endofíticas no sétimo dia, devido a uma pequena parcela que consegue se aderir, e que depois coloniza a raiz. Algo semelhante também acontece com o mutante SmR1\_pilA, os níveis na colonização epifítica e endofítica no geral são menores que o selvagem, revelando uma dificuldade da

bactéria em colonizar a raiz. Algo semelhante foi detectado em *Azoarcus* sp. BH72, observou-se uma forte redução na colonização de raízes de arroz para um mutante do gene *pilA*, tanto epifítico, quanto endofítico (BÖHM et al., 2007), o que também foi visto em um mutante *pilAB* (DÖRR et al., 1998). Mutantes do gene *pilA* de *Ralstonia solanacearum* também mostraram colonização reduzida (KANG et al., 2002).

O mutante SmR1 $\Delta$ pilT2 apresentou maior colonização epifítica e principalmente endofítica nas raízes de milho, bem como a formação de biofilme em fibra vidro, que também foi maior neste mutante. Não sabemos o mecanismo que possa ter desencadeado este comportamento. Maior adesão a tecidos foi vista também no mutante *pilT* de *Neisseria meningitidis*, onde foi observada adesão muito eficiente do mutante a monocamadas celulares vivas e tratadas com paraformaldeído (PUJOL et al., 1999). Mais tarde, Yasukawa e colaboradores (2006) demonstraram que a proteína envolvida na retração do *pili* (PilT), regulava negativamente a capacidade de adesão do T4P, através da expressão aumentada de *pilC1*. No entanto, é mais comum encontrar em mutantes do gene *pilT* outros fenótipos: redução da adesão às superfícies hospedeiras, as bactérias são incapazes de retrair o *pili*, sendo então, às vezes hiperpiliadas. Por exemplo, o mutante *pilT*, hiperpiliado e não retrátil de *Azoarcus* BH72 foi capaz de aderir à superfície da planta, embora com metade da eficiência e o número de endofíticos nas raízes de arroz foi reduzido (BÖHM et al., 2007). O fenótipo caracterizado pela hiperpiliação também foi descrito para *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* (MERZ et al., 2000) e *Myxococcus xanthus* (SUN et al., 2000). O mutante *pilT* de *Ralstonia solanacearum* causou doença menos severa em plantas de tomate suscetíveis (LIU et al., 2001). *Xylella fastidiosa* usa o T4P para migração mediada por contração no sistema vascular do hospedeiro (MENG et al., 2005).

Nos ensaios de microscopia verificamos a presença de estruturas similares ao T4P em *H. seropedicae*, SmR1\_pilN e SmR1 $\Delta$ pilT2, sendo que este último parece estar hiperpiliado. No trabalho de Chiang & Burrows (2003), a figura 2B refere-se a micrografia do mutante do gene *pilT* (R364) de *Pseudomonas aeruginosa* PAK, indicando na imagem a maior quantidade de T4P, sendo essa estrutura muito semelhante com a que encontramos no mutante SmR1 $\Delta$ pilT2 (Figura 17F). As bactérias com mutação no gene *pilT* tendem a ser hiperpiliadas, pois o *pili* é produzido, mas a desmontagem pode ser afetada. Além disso, frequentemente, a célula hiperpiliada vem acompanhada da perda de *twitching motility*, uma vez que a proteína

PilT é o principal motor retrátil (WOLFGANG et al., 2000; WHITCHURCH et al., 1991). Nos mutantes SmR1\_pilA, SmR1\_pilN e SmR1 $\Delta$ pilT2\_pilN, fliC $\Omega$ nptI observamos ausência de flagelos e T4P.

A maior motilidade do mutante SmR1 $\Delta$ pilT2, pode ser explicada pela purificação de proteínas de superfície realizada, pois a estirpe produz flagelina em abundância, o que não é observado no selvagem. No entanto, os mecanismos envolvidos e que permitem a maior produção de flagelina, e, provavelmente resultem em maior mobilidade da bactéria ainda são desconhecidos. Não foi possível detectar a presença de pilina na purificação, sendo necessário a aplicação de outros métodos para obter a pilina.

## 8. CONCLUSÕES

- Os genes *pilA* e *pilT2* de *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1 possuem maior expressão quando há colonização epifítica, do que em meio líquido e meio sólido;
- Estirpes mutantes para os genes *pilA*, *pilN*, *pilT2* foram obtidas para *H. seropedicae* SmR1, e para *H. rubrisubalbicans*, mutantes dos genes *pilA* e *pilN*;
- Os genes avaliados neste trabalho indicam que o T4P em *Herbaspirillum* spp. é importante para a formação de biofilme em superfícies abióticas, motilidades do tipo *swarming* e *swimming* e provavelmente no *twitching*;
- Os genes do T4P parecem ser importantes para a interação epifítica e endofítica entre o *Herbaspirillum seropedicae* e o milho, principalmente nos estágios iniciais da colonização;
- Estruturas muito semelhantes ao *pili* foram identificadas em microscopia eletrônica de transmissão na estirpe selvagem, e nos mutantes SmR1 $\Delta$ *pilT2* e SmR1 $\Delta$ *pilT2*/*\_pilN*. Alguns mutantes não apresentam *pili* e nem flagelos (SmR1\_*pilA*, SmR1\_*pilN*).
- O mutante SmR1 $\Delta$ *pilT2* parece produzir mais flagelina do que o selvagem, e provavelmente por isso possui maior motilidade em ágar 0,175 e 0,3%, do que a estirpe selvagem;

## REFERÊNCIAS

- ANYAN, M. E.; AMIRI, A.; HARVEY, C. W.; et al. Type IV pili interactions promote intercellular association and moderate swarming of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 18013–18018, 2014.
- ARAGNO, M.; SCHLEGEL, H. G. *Aquaspirillum autotrophicum*, a new species of hydrogen-oxidizing, facultatively autotrophic bacteria. **J Syst Bacteriol**, v. 28, p. 112–116, 1978.
- AUKEMA, K.; KRON, E. M.; HERDENDORF, T. J.; FOREST, K. T. Functional dissection of a conserved motif within the pilus retraction protein PilT. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 611–618, 2005.
- AVERHOFF, B.; FRIEDRICH, A. Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 180, p. 385–93, 2003.
- AYERS, M.; SAMPALLEANU, L. M.; TAMMAM, S.; et al. PilM/N/O/P Proteins Form an Inner Membrane Complex That Affects the Stability of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus Secretin. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 1, p. 128–142, 2009.
- BAE, H.S.; LEE, J. M.; KIM, Y. B.; LEE, S. T. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. **Biodegradation**, v.7, p. 463–469, 1996.
- BAHAR, O.; GOFFER, T.; BURDMAN, S. Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v, 22, p. 909-920, 2009.
- BAHAR, O.; DE LA FUENTE, L.; BURDMAN, S. Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.**, v. 312, p. 33-39, 2010.
- BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K.; BAJERSKI, F., LIPSKI, A., BUSSE, H.-J., PADUR, L., & WAGNER, D. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a novel member of the family *Oxalobacteraceae* from a glacier forefield of the Larsemann Hills, East Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2013.

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

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65–7, 1992.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.46, p.802-810, 1996.

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

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

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

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H., PANKIEVICZ, V. C. S.; BAURA V. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R. A. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**. 2015.

BERRY, J.-L.; PELICIC, V. Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 1, p. 134–154, 2015.

BLEIGHTON, T. L.; BUENSUCESO, R. N. C.; HOWELL, P. L.; BURROWS, L. L. Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. **Environmental Microbiology**. 2015.

BOHM, M.; HUREK, T.; bD-HUREK, B. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N<sub>2</sub>-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 20, p. 526–533, 2007.

BRADLEY, D.E. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. **Canadian journal of microbiology**, v. 26, p. 146–154, 1980.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; ALBERTON, D., VALDAMERI, G.; CAMILIOS-NETO, D.; COVRE, R.; LOPES, K.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; MONTEIRO, R. A.; SILVA, A. B.; BROUGHTON, W. J.; PEDROSA, F. O.; WASSEM, R.; SOUZA, E. M. Modulation of defence and iron homeostasis genes in rice roots by the diazotrophic endophyte: *Herbaspirillum seropedicae*. **bioRxiv**. 2018.

BURDMAN, S.; BAHAR, O.; PARKER, J. K.; DE LA FUENTE, L. Involvement of type IV pili in pathogenicity of plant pathogenic bacteria. **Genes**, v. 2, n. 4, p. 706–735, 2011.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 493–520, 2012.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**. v. 55:4, p. 611–622, 2009.

CHAVES, V. A. et al. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **R. Bras. Ci. Solo**. 39, 1595–1602, 2015.

CHIANG, P.; BURROWS, L. L. Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2374–2378, 2003.

CHIANG, P.; SAMPALEANU, L. M.; AYERS, M.; PAHUTA, M.; HOWELL, P. L.; BURROWS, L. L. Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. **Microbiology**, v.154, p.114–126, 2008.

CHICORA, V.K. **Associação benéfica e fitopatogênica entre espécies de *Herbaspirillum* e plantas hospedeiras**. Curitiba, 87 p. Dissertação (Mestrado em

Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. 2015.

CORDEIRO, F. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M. Proteomic Analysis of *Herbaspirillum seropedicae* Cultivated in the Presence of Sugar Cane Extract. **J. Proteome Res.** v. 12, p. 1142–1150, 2013.

COWLES, K. N.; GITAI, Z. Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 76, p. 1411–1426, 2010.

CRAIG, L.; PIQUE, M. E.; TAINER, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 363–378, 2004.

CRAIG, L.; VOLKMANN, N.; ARVAI, A. S.; et al. Type IV Pilus Structure by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography: Implications for Pilus Assembly and Functions. **Molecular Cell**, v. 23, p. 651–662, 2006.

CRAIG, L.; LI, J. Type iv pili: paradoxes in form and function. **Curr Opin Struct Biol**, v.18, p. 267–77, 2008.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comusus* (L.) Merrill). **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, p. 2375–3279, 2001.

DEBOY, R. T.; MONGODIN, E. F.; FOUTS, D. E.; et al. Insights into Plant Cell Wall Degradation from the Genome Sequence of the Soil Bacterium *Cellvibrio japonicus*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5455–5463, 2008.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibactergracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacterlanceolatus* comb. nov., *Curvibacterdelicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.54, p.2223-2230, 2004.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia, Rio de Janeiro**, v.1, p.261-272,1958.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.44, n.5, p.310-313, 1992.

DOBRIŤSA, A. P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense* and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **IJSEM Papers in Press**. 2010.

DÖRR, J.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Type IV pili are involved in plant–microbe and fungus–microbe interactions. **Molecular Microbiology**, v. 30, n .1, p. 7–17, 1998.

GENIN, S. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. **New Phytologist**, v. 187, p. 920–928, 2010.

GILTNER, C. L.; HABASH, M.; BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV Pili. **Journal of Molecular Biology**, v. 398, n. 3, p. 444–461, 2010.

GOLD, V. A.; SALZER, R.; AVERHOFF, B.; KÜHLBRANDT, W. Structure of a type IV pilus machinery in the open and closed state. **eLife**, v. 4, p. 1–12, 2015.

GROOT, A.; HEIJNEN, I.; COCK, H.; FILLOUX, A.; TOMMASSEN, J. Characterization of type IV pilus genes in plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. **J Bacteriol.**, v. 176, p. 642-650, 1994.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M.; LADHA, J. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.

HALE, C. N. & WILKE, J. P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. **N. Z. J. Agric. Res.** 15, 448–456, 1972.

HAN, J.; CHOI, H.; LEE, S.; et al. Complete Genome Sequence of the Metabolically Versatile Plant Growth-Promoting Endophyte *Variovorax paradoxus* S110. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 5, p. 1183–1190, 2011.

HAN, X.; KENNAN, R.M.; PARKER, D.; DAVIES, J.K.; ROOD, J.I. Type IV fimbrial biogenesis is required for protease secretion and natural transformation in *Dichelobacter nodosus*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 5022–5033, 2007.

HENRICHSEN, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriol. Rev.**, v. 36, p. 478–503, 1972.

HENRICHSEN, J. The occurrence of twitching motility among Gram-negative bacteria. **Acta Pathol Microbiol Scand Sect B**, v. 83, p. 171–178, 1975.

HENRICHSEN, J. Twitching motility. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 81–93, 1983.

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

JAKOVLJEVIC, V.; LEONARDY, S.; HOPPERT, M.; SOGAARD-ANDERSEN, L. PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pili function in *Myxococcus xanthus*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2411–2421, 2008.

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

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

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promotion Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

KAISER, D. Bacterial motility: How do pili pull? **Curr. Biol.**, v. 10, p. 777– 780, 2000.

KANG, Y.; LIU, H.; GENIN, S.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 46, p. 427- 437, 2002.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634–644, 2010.

KILMURY, S. L. N.; BURROWS, L. L. The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR Two-Component System Regulates Both Twitching and Swimming Motilities. **mBio**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2018.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem.** v.29, n.5/6, p.853-862, 1997.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.157-168, 2001.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. **Can J Microbiol.**, v.43, p.841-846, 1997.

KLOEPPER, J.W., RODRIGUEZ-KÁBANA, R., McINROY, J.A. & YOUNG R.W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, v.139, p.74-84, 1992.

KOO, J.; TAMMAM; S.; KU, S.Y.; SAMPALEANU, L.M.; BURROWS, L.L.; HOWELL, P.L. PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 6961–6969, 2008.

LAGIER, J. C.; GIMENEZ, G.; ROBERT, C.; RAOULT, D.; FOURNIER, P.-E. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Herbaspirillum massiliense* sp. nov. **Standards in Genomic Sciences**. v.7, p. 200-209, 2012.

LAPOINTE, C.F., TAYLOR, R.K. The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p.1502–1510, 2000.

LAUTROP, H. *Bacterium anitratum* transferred to the genus *Cytophaga*. **Int. Bull. Bacteriol. Nomencl.** v. 11, p. 107–108, 1961.

LI, B.; WANG, Y.; FANG, Y.; et al. Role of type IV secretion system genes in virulence of rice bacterial brown stripe pathogen *Acidovorax oryzae* strain RS-2. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 343–350, 2018.

LI, Y.; HAO, G.; GALVANI, C. D.; et al. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. **Microbiology**, v. 153, p. 719–726, 2007.

LIU, H.; KANG, Y.; GENIN, S.; SCHELL, M. A.; T. P. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. **Microbiology**, v.147, p. 3215-3229, 2001.

LORY, S.; STROM, M.S. Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of *Pseudomonas aeruginosa* – a review. **Gene**, v. 192, p. 117– 121, 1997.

MAKAROVA, K.; KOONIN, E. V; ALBERS, S. Diversity and evolution of type iv pili systems in archaea. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–16, 2016.

MARKO, V. A.; KILMURY, S. L. N.; MACNEIL, L. T.; BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* type IV minor pilins and PilY1 regulate virulence by modulating FimS-AlgR activity. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 5, 2018.

MATTICK, J.S., BILLS, M.M., ANDERSON. B.J., DALRYMPLE. B., MOTL. M.R.; EGERTON, J.R. Morphogenetic expression of *Bacteroides nodosus* fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol.**, v.169, p. 33-41, 1987.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annu. Rev. Microbiol**, n. 56, p.289–314, 2002.

MELVILLE, S.; CRAIG, L. Type IV Pili in Gram-Positive Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 323–341, 2013.

MENG, Y.; LI, Y.; GALVANI, C.D.; HAO, G.; TURNER, J.N.; BURR, T.J.; HOCH, H.C. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. **J Bacteriol.**, v. 187, p. 5560-5567, 2005.

MERZ, A.J.; SO, M.; SHEETZ, M.P. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. **Nature**, v. 407, p.98– 102, 2000.

MIGNOT, T. The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 64, p. 2733–2745, 2007.

MONTEIRO, R. A.; SCHMIDT, M. A.; BAURA, V. A. DE; et al. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae). **Microscopy**, v. 937, p. 932–937, 2008.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; SCHMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA F. O.; SOUZA, E.M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**. v: 356, n: 175–196, 2012a.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; TULESKI, T. FAORO, CRUZ, L. M. H. WASSEM, R.; BAURA, V. A.; TADRA-SFEIR, M.; WEISS, V.; DAROCHA, W.D. Z; MULLER-SANTO, M. CHUBATSU, L. S, A. M.; HUERGO, L.; O.; SOUZA, E.M.; PEDROSA F. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. **FEMS Microbiol Ecol**. p. 441–451. 2012b.

MORAND, P.C.; BILLE, E.; MORELLE, S.; EUGENE, E.; BERETTI, J.L.; WOLFGANG, M.; MEYER, T.F.; KOOMEY, M.; NASSIF, X. Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by the PilC proteins. **EMBO**, v. 23, p. 2009–2017, 2004.

MURRAY, T. S. & KAZMIERCZAK, B. I. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2700–2708, 2008.

NGUYEN, Y.; SUGIMAN-MARANGOS, S.; HARVEY, H.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* Minor Pilins Prime Type IVa Pilus Assembly and Promote Surface Display of the PilY1 Adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 1, p. 601–611, 2014.

NØRHOLM, M. H.H. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. **BMC Biotechnology**. v.10, n. 21. 2010.

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

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

PANKIEVICZ, V. C.; CAMILIOS-NETO, D.; BONATO, P.; BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M.Z.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. S.; DONATTI, L.; WAJNBERG, G.; PASSETTI, F.; MONTEIRO, R. A. ; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant Molecular Biology*. v. 90, ed. 6, p. 589–603, 2016.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; AYUB; R.A; et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet*, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2011.

PELICIC, V. Micro Review Type IV pili: e pluribus unum? **Molecular Microbiology**, v. 68, p. 827–837, 2008.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** v. 29, 2001.

PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil** 137, 61-5, 1991.

PLANET, P. J.; KACHLANY, S. C.; DESALLE, R.; FIGURSKI, D. H. Phylogeny of genes for secretion NTPases: Identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. **PNAS**, v. 98, n. 5, p. 2503–2508, 2001.

PUJOL, C.; EUGENE, E.; MARCEAU, M.; NASSIF, X. The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 4017–22, 1999.

RADWAN, T. E.-S. E.-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 987–994, 2004.

REGUERA, G.; MCCARTHY, K.D.; MEHTA, T.; NICOLL, J.S.; TUOMINEN, M.T.; LOVLEY, D.R. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. **Nature**, v. 435, p. 1098–1101, 2005.

REINHOLD-HUREK, B.; MAES, T.; GEMMER, S.; VAN MONTAGU, M.; HUREK T. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. BH72. **Mol Plant–Microbe Interact.**, v. 19, p. 181-188, 2006.

RIVERA, A. K. G.; FOREST, K. T. Shearing and Enrichment of Extracellular Type IV Pili. **Bacterial Protein Secretion Systems: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1615, p. 311–320, 2017.

RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.41, n.2, p.275-284, 2006.

ROINE, E.; RAINERI, D. M.; ROMANTSCHUK, M.; WILSON, M.; NUNN, D. N. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 11, p. 1048-1056, 1998.

ROMANTSCHUK, M.; BAMFORD, D. H. The causal agent of halo blight in bean, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, attaches to stomata via its pili. **Microb. Pathog.**, v.1, p. 139-148, 1986.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R. AND SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 39-47, 2003.

ROSCONI, F.; VRIES, S. P. W. DE; BAIG, A.; FABIANO, E.; GRANT, A. J. Essential Genes for In Vitro Growth of the Endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 as Revealed by Transposon Insertion Site Sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n.22, 2016.

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

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

SAMPALEANU, L. M.; BURLEY, S. K.; BONANNO, J. B.; et al. Periplasmic Domains of *Pseudomonas aeruginosa* PilN and PilO Form a Stable Heterodimeric Complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 1, p. 143–159, 2009.

SATYSHUR, K. A.; WORZALLA, G. A.; MEYER, L. S.; HEINIGER, E. K.; AUKEMA, K. G.; MISIC, A. M.; FOREST, K. T. Crystal structures of the pilus retraction motor PilT

suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. **Structure**, v. 15, p. 363–376, 2007.

SCHÄFER, A.; TAUCH, A.; JÄGER, W.; KALINOWSKI, J.; THIERBACH, G.; PIHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**. v. 145, p. 69-73, 1994.

SCHMIDT, M.A.; BALSANELLI, E.; FAORO, H.; CRUZ, L.M.; WASSEM, R.; BAURA, V.A.; WEISS, V.; YATES, M.G.; MADEIRA, H.M.F.; PEREIRA-FERRARI, L.; FUNGARO, M.H.P.; PAULA, F.M.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L.G.E.; OLIVARES, F.L.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and *Poaceae*. **BMC Microbiology**, v.12, n.98, p 1-10, 2012.

SEMMLER, A. B. T.; WHITCHURCH, C. B.; MATTICK, J. S. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 145, p. 2863–2873, 1999.

SHARMA, G.; BURROWS, L. L.; SINGER, M. Diversity and evolution of myxobacterial type IV pilus systems. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

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

SHIKATA, M.; HAYASHI, N.; FUJIMOTO, A.; et al. The pilT gene contributes to type III ExoS effector injection into epithelial cells in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 4, p. 216–220, 2015.

SHROUT, J. D.; CHOPP, D. L.; JUST, C. L.; et al. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. **Molecular Microbiology**, v. 62, p. 1264–1277, 2006.

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

SKERKER, J. M.; BERG, H. C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 6901–6904, 2001.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

STRAUB, D.; ROTHBALLER, M.; HARTMANN, A.; LUDEWIG, U. The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. **Frontiers in Microbiology**, p. 1-10, 2013.

STROM, M. S.; NUNN, D.; LORY, S. Multiple roles of the pilus biogenesis protein PilD: involvement of PilD in excretion of enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1175–1180, 1991.

STROM, M. S.; LORY, S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. **Annual review of microbiology**, v. 47, p. 565–596, 1993.

SUN, H.; D. R. ZUSMAN; SHI, W. Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. **Curr. Biol.**, v. 10, p. 1143–1146, 2000.

SZABO, Z.; STAHL, A. O.; ALBERS, S.-V.; KISSINGER, J. C.; DRIESSEN, A. J. M.; POHLSCHRO, M. Identification of Diverse Archaeal Proteins with Class III Signal Peptides Cleaved by Distinct Archaeal Prepilin Peptidase. **Journal of Bacteriology**. v. 189, n. 3., p. 772–778, 2007.

TAGHAVI, S.; LELIE, D. VAN DER; HOFFMAN, A.; ZHANG, Y.; WALLA, M. D. Genome Sequence of the Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Enterobacter* sp. 638. **Plos Genetics**, v. 6, n. 5, 2010.

TAGUCHI, V.; ICHINOSE, Y. Role of Type IV Pili in Virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: Correlation of Motility, Multidrug Resistance, and HR-Inducing Activity on a Nonhost Plant. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 9, p. 1001–1011, 2011.

TAMMAM, S.; SAMPALLEANU, L. M.; KOO, J.; et al. PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 10, p. 2126–2135, 2013.

TAN, Z.Q.; MEN, R.; ZHANG, R.Y.; HUANG, Z. First Report of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* Causing Mottled Stripe Disease on Sugarcane in China. **The American Phytopathological Society**, v. 94, p. 379, 2010.

TULESKI, T. R.; BAURA, V. A. DE; DONATTI, L.; et al. Cellulose production increases sorghum colonization and the pathogenic potential of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4041, 2019.

VIEIRA, J.; MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. **Gene**, v. 19, n. 3, p. 259–268, 1982.

WALL, D.; KAISER, D. Type IV pili and cell motility. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 1–10, 1999.

WANG, L.; MAKINO, S.; SUBEDEE, A.; BOGDANOVA, A. J. Novel candidate virulence factors in rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as revealed by mutational analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 8023–8027, 2007.

WHITCHURCH, C. B.; HOBBS, M.; LIVINGSTON, S. P.; KRISHNAPILLAI, V.; MATTICK, J. S. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialized protein export system widespread in eubacteria. **Gene**, v. 101, p. 33–44, 1991.

WOLFGANG, M.; PARK, H. S.; HAYES, S. F.; VAN PUTTEN, J. P. M.; KOOMEY, M. Suppression of an absolute defect in type IV pilus biogenesis by loss-of-function mutations in pilT, a twitching motility gene in *Neisseria gonorrhoeae*. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 95, p. 14973–14978, 1998.

WOLFGANG, M.; PUTTEN, J.P.; HAYES, S.F.; DORWARD, D.; KOOMEY, M. Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. **Embo J.**, v. 19, p. 6408–6418, 2000.

YASUKAWA, K.; MARTIN, P.; TINSLEY, C. R.; NASSIF, X. Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis* is negatively controlled by the pilus-retraction machinery. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 579–589, 2006.

YE, W.; YE, S.; LIU, J.; et al. Genome sequence of the pathogenic *Herbaspirillum seropedicae* strain Os34, isolated from rice roots. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6993–4, 2012.

ZHU, B.; YE, S.; CHANG, S.; et al. Genome sequence of the pathogenic *Herbaspirillum seropedicae* strain Os45, isolated from rice roots. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6995–6, 2012.