

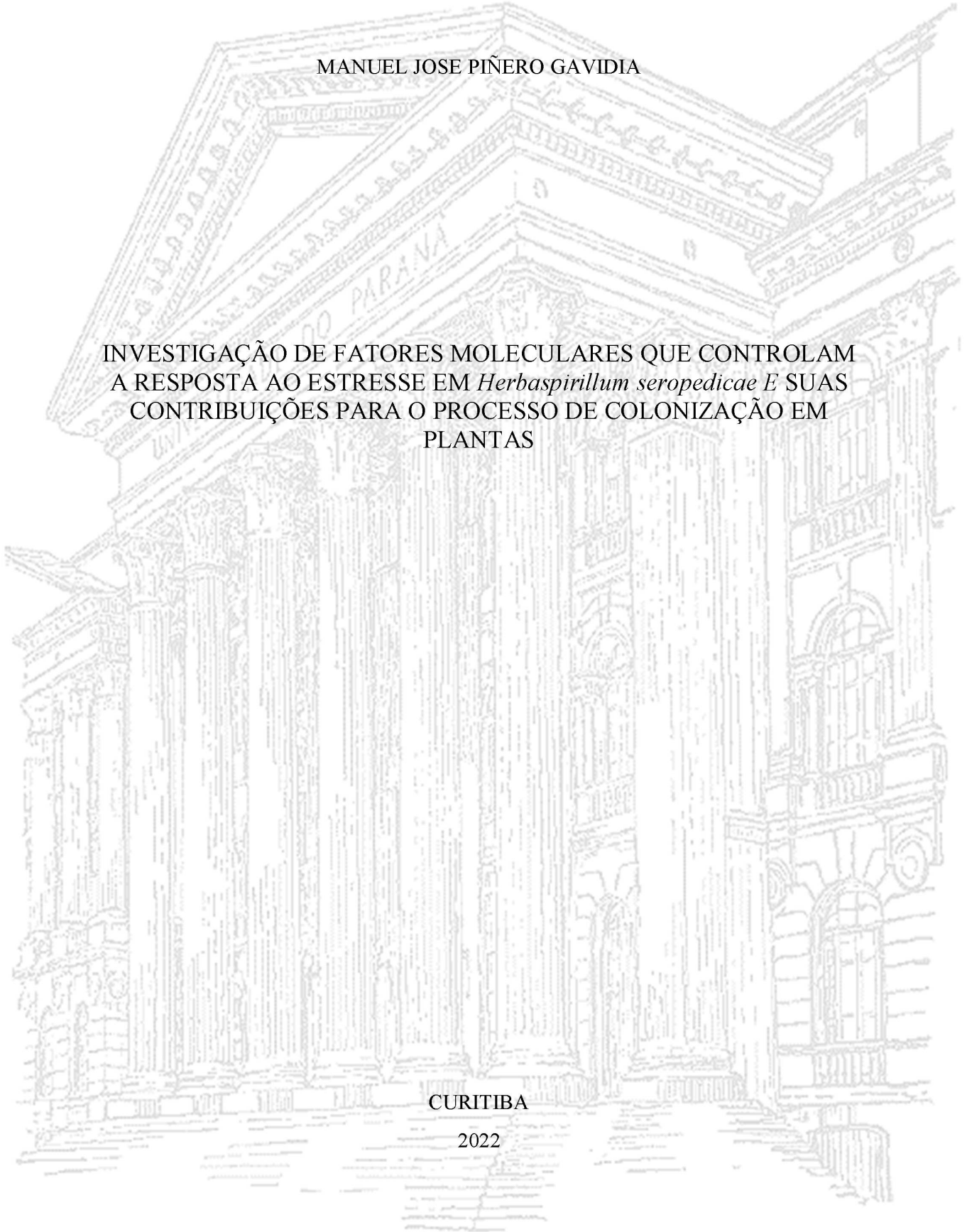
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MANUEL JOSE PIÑERO GAVIDIA

INVESTIGAÇÃO DE FATORES MOLECULARES QUE CONTROLAM
A RESPOSTA AO ESTRESSE EM *Herbaspirillum seropedicae* E SUAS
CONTRIBUIÇÕES PARA O PROCESSO DE COLONIZAÇÃO EM
PLANTAS

CURITIBA

2022



MANUEL JOSE PIÑERO GAVIDIA

INVESTIGAÇÃO DE FATORES MOLECULARES QUE CONTROLAM
A RESPOSTA AO ESTRESSE EM *Herbaspirillum seropedicae* E SUAS
CONTRIBUIÇÕES PARA O PROCESSO DE COLONIZAÇÃO EM
PLANTAS

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção de título de Doutor em Ciências
(Bioquímica) pelo programa de Pós-graduação em
Ciências (Bioquímica) do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Paraná

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

Matrícula: 3 de junho de 2017

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Piñero Gavidia, Manuel Jose

Investigação de fatores moleculares que controlam a resposta ao estresse *Herbaspirillum seropedicae* e suas contribuições para o processo de colonização em plantas / Manuel Jose Piñero Gavidia. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

1. Herbaspirillum. 2. Interações entre hospedeiro e microrganismos. 3. Estresse fisiológico. 4. Proteínas de bactérias. I. Santos, Marcelo Müller dos. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MANUEL JOSE PINERO GAVIDIA** intitulada: **Investigação de fatores moleculares que controlam a resposta ao estresse em *Herbaspirillum seropedicae* e suas contribuições para o processo de colonização de plantas**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO MÜLLER DOS SANTOS, que após terem inquirido o aluno e realizada 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, 13 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica
24/01/2023 13:09:39.0
MARCELO MÜLLER DOS SANTOS
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
24/01/2023 15:19:58.0
LUIS PAULO SILVEIRA ALVES
Avaliador Externo (55001149)

Assinatura Eletrônica
24/01/2023 15:57:41.0
LEONARDO MAGALHÃES CRUZ
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
25/01/2023 10:26:28.0
MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Ricardo G3amez-Hoyos
&
Maria Berenice Reynaud Steffens
(In memoriam)

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica, endofítica, promotora de crescimento vegetal, considerada um modelo de endófito destacável pela sua capacidade de colonizar espécies de interesse econômico como sorgo, milho, arroz e cana-de-açúcar. *H. seropedicae* coloniza tecidos internos da raiz de plantas e promove seu crescimento através da fixação biológica de nitrogênio, da produção de fitohormônios, entre outros mecanismos utilizados pelas bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR). A capacidade que um microrganismo tem de se associar às plantas e realizar a promoção de crescimento requer uma série de elementos genéticos que em conjunto são denominados de “traços de colonização”. Durante o processo inicial, respostas rápidas a partir de uma modulação gênica eficaz são extremamente importantes pois as PGPR estão submetidas a diferentes tipos de estresse bióticos e abióticos no solo e nas plantas. Nesse sentido, o fator sigma RpoS tem se mostrado importante pelo seu papel na regulação de genes associados à resposta ao estresse. Neste trabalho demonstrou-se que o mutante $\Delta rpoS$ de *H. seropedicae* é sensível à exposição a 42°C. A análise comparativa do perfil transcriptômico entre o mutante $\Delta rpoS$ e a estirpe parental SmR1 durante a fase estacionária e quando submetidos a choque térmico mostrou que a deleção do gene *rpoS* provocou alterações no nível de expressão de genes envolvidos na motilidade, quimiotaxia, mecanismos de reparação do DNA, fosforilação oxidativa e capacidade de utilizar fontes de carbono alternativas que explicariam o fenótipo sensível ao calor. Adicionalmente, visando realizar a avaliação do desempenho desse e de outros mutantes de *H. seropedicae* SmR1 em ensaios de colonização e competição em plantas, foram construídos plasmídeos para a integração genômica direcionada contendo genes repórteres que expressam as proteínas fluorescentes superfolder GFP e dsRED. Os estudos preliminares mostraram a estabilidade das construções em condições não seletivas, poucas alterações no perfil metabólico das estirpes e a capacidade de serem utilizadas também durante ensaios *in vitro* e *in vivo*. Portanto, os plasmídeos construídos servem como ferramenta para a marcação fluorescente direcionada de *H. seropedicae*.

Palavras-chave: Interação planta-bactéria, regulação do estresse, RpoS, marcação de bactérias, proteínas de fluorescência.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic, endophytic, plant-growth promoting bacteria considered a distinctive endophytic model by its ability to colonize economically important crops such as sorghum, corn, rice, and sugar cane. *H. seropedicae* colonizes the internal tissues of these plants and promotes their growth through biological nitrogen fixation, phytohormone production and many other mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria (PGPR). The ability of bacteria to associate symbiotically and promote plant growth demands the presence of several genetic elements known as “colonization traits”. During the first stages of colonization, bacteria execute quick responses throughout a genetically efficient modulation to overcome the effect of several biotic and abiotic stress conditions in the soil and inside plants. Therefore, studies on the RpoS sigma factor in bacteria are interesting because of its role as the “master regulator of the general stress response”. In this work, we demonstrated that the $\Delta rpoS$ mutant of *H. seropedicae* SmR1 is sensitive upon exposure to 42°C thermal shock. The comparative transcriptomic profile between $\Delta rpoS$ mutant and parental strain SmR1 at the onset of the stationary phase and during thermal shock revealed that deletion of the *rpoS* gene led to changes in the expression profile of several genes involved in motility, chemotaxis, DNA repair mechanisms, oxidative phosphorylation, and the ability to metabolize alternative carbon source; these alterations combined can explain the heat-sensitive phenotype of the mutant strain. Also, aiming to study this and several other mutants of the SmR1 strain on colonization and competition assays, we developed a plasmid tool for site-directed genomic integration containing fluorescent proteins superfolder GFP or dsRED. Preliminary results showed that these constructions were highly stable upon no selective pressure, have few alterations on the metabolic profile of the strains and can be employed for in vitro and in vivo assays. Therefore, the constructed plasmids constitute a promising tool for directed fluorescent tagging of *H. seropedicae*.

Keywords: Bacteria-plant interactions, stress regulation, RpoS, bacteria tagging, fluorescence, fluorescent proteins.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|--|----|
| Figura 1. Timeline dos enfoques moleculares aplicados a bactérias rizosféricas..... | 28 |
|--|----|

MANUSCRITO 1

| | |
|--|----|
| Figure 1. Heatmap of differentially expressed genes for gene categories. A) chaperones, B) Oxidative phosphorylation, and C) metabolism in different environments | 61 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figure 2. Soft agar motility profile of <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 (A), $\Delta rpoS$ (B) and $\Delta fliA$ (C) on semi-solid media after 48h of growing..... | 65 |
|--|----|

MANUSCRITO 2

| | |
|---|----|
| Figure 1. SBOL representation of biobrick constructions..... | 70 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figure 2. Plasmid stability of parental strain SmR1 tagged with both plasmids..... | 71 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figure 3. Growth curves of strain SmR1 and mutant $\Delta rpoN$ containing either plasmid pCH03 or pCH04 and its respective fluorescent variant..... | 72 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figure 4. Competition assay under Nitrogen limitation. | 73 |
|--|----|

APÊNDICE

| | |
|--|----|
| Figura 1. Perfil de crescimento das estirpes SmR1 e mutantes isogênicos ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaR$ e $\Delta phaZ1,2$) de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1..... | 95 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 2. Avaliação do perfil de crescimento da estirpe SmR1 e mutante $\Delta rpoN$ em diferentes concentrações de NH_4Cl (2mM; 5mM; 10mM; 15mM e 20mM)..... | 96 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 3. Perfil de crescimento da estirpe SmR1 e os mutantes $\Delta fliA$, $\Delta rpoN$ e $\Delta phaR$ de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em meio NFbHPN-malato com adição de metilviologênio..... | 97 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 4. Perfil de crescimento da estirpe SmR1 e os mutantes ($\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1,2$) de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em meio NFbHPN-malato com adição de MV..... | 98 |
|--|----|

| | |
|---|-----|
| Figura 5. Porcentagem de diminuição das taxas de crescimento das estirpes SmR1 e mutantes ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaR$ e $\Delta phaZ1,2$) após adição de concentrações de 1 e 2mM de metilviologênio..... | 100 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| Figura 6. Avaliação da sobrevivência por contagem de colônias das estirpes SmR1, $\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$ ao choque térmico..... | 101 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Figura 7. Avaliação da sobrevivência por contagem de colônias das estirpes $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1,2$ ao choque térmico..... | 102 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Figura 8. Mapa do plasmídeo pCH03..... | 103 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Figura 9. Mapa do plasmídeo pCH04..... | 103 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Figura 10. Fotografia de microscopia confocal de fluorescência da estirpe SmR1 transformada com os plasmídeos..... | 106 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| Figura 11. Perfil de crescimento das estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> com plasmídeos de fluorescência..... | 107 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Figura 12. Ensaio de motilidade das estirpes $\Delta rpoS$ e SmR1 com fluorescência..... | 108 |
|---|-----|

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

| | |
|--|----|
| Table I. Par-comparing between all different set combinations and number of significant genes expressed or repressed..... | 54 |
| Table II List of genes differentially expressed at both conditions. The table shows the Log ₂ of differentially expressed genes for comparisons between the SmR1 and mutant $\Delta rpoS$ before and after the thermal shock (45°C)..... | 55 |

MANUSCRITO 2

| | |
|--|----|
| Table II: Biobrick parts employed for the construction of fluorescent plasmid derived from pCH03 and pCH04..... | 69 |
|--|----|

APÊNDICE

| | |
|--|-----|
| Tabela III. Descrição de cada um dos elementos (partes biobrick) utilizados nas construções com fluorescência..... | 104 |
| Tabela IV. perfil transcriptômico comparativo da estirpe $\Delta rpoS$ e parental SmR1 de <i>H. seropedicae</i> em condições de choque térmico..... | 105 |
| Tabela V. Genes implicados no metabolismo de lipídeos..... | 110 |
| Tabela VI. Genes envolvidos no metabolismo de nucleotídeos..... | 110 |
| Tabela VII. Genes envolvidos no metabolismo de cofatores..... | 111 |
| Tabela VIII. Genes envolvidos na síntese de metabolitos secundários..... | 111 |
| Tabela IX. Genes envolvidos no sistema de secreção bacteriana..... | 112 |
| Tabela X. Genes envolvidos no sistema de dois componentes..... | 112 |

LISTA DE ABREVIATURAS

PGPR: Bactérias promotoras de crescimento vegetal

GFP: Proteína de Fluorescência Verde

AFPs: Proteínas de autofluorescência

ACC: (1-aminociclopropano-1-carboxilato)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SAR: Resistência Sistêmica Induzida

NADH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleotido

IAA: Ácido Indolacético

T3SS: Sistema de Secreção de Tipo 3

MCPs: Proteínas de Quimiotaxia aceitadoras de Metila

PHB: Polihidroxibutirato

NGS: Sequenciamento de Nova Geração

PLT: Piroluteonina

PRT: Pirrolnitrina

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO..... | 11 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 1. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA..... | 15 |
| 1.1 Colonização endofítica por PGPR..... | 16 |
| 1.2 Benefícios das bactérias promotoras de crescimento vegetal..... | 18 |
| 1.3 Modelos experimentais de PGPR..... | 23 |
| 2. Estudo dos mecanismos da interação planta-bactéria..... | 28 |
| 2.1 Deleção genômica e mutagênese aleatória..... | 28 |
| 2.2 Estudo de promotores associados a proteína repórter..... | 30 |
| 2.3 Avaliação de traços genéticos das PGPR utilizando técnicas ômicas..... | 31 |
| 2.4 Análises proteômicas no estudo de PGPR e interação planta-bactéria..... | 34 |
| 3. Influência dos fatores sigma na interação planta-bactéria..... | 36 |
| 3.1 Fator RpoN e a resposta a limitação de nitrogênio..... | 37 |
| 3.2 Fator RpoH e a resposta ao choque térmico..... | 38 |
| 3.3 FliA, regulador da síntese do flagelo e da motilidade..... | 39 |
| 3.4 RpoS regulador mestre da resposta ao estresse..... | 40 |
| 4. Metabolismo do PHB e a sobrevivência ao estresse..... | 42 |
| 5. Técnicas de marcação genética para avaliar o desempenho de diferentes estirpes bacterianas <i>ex planta</i> e <i>in planta</i>..... | 45 |
| 6. Técnicas de marcação de fluorescência em <i>H. seropedicae</i>..... | 47 |
| MANUSCRITO 1..... | 50 |
| 1. ABSTRACT..... | 50 |
| 2. INTRODUCTION..... | 50 |
| 3. MATERIALS AND METHODS..... | 52 |
| 3.1 Bacterial strains and growing conditions..... | 52 |
| 3.2 Thermal shock, RNA purification, library construction and sequencing..... | 52 |
| 3.3 Transcriptomic libraries data analysis..... | 53 |
| 3.4 Motility assay..... | 53 |
| 4. RESULTS AND DISCUSSION..... | 54 |
| 4.1 Carbohydrate metabolism:..... | 56 |
| 4.2 Nitrogen metabolism..... | 57 |
| 4.3 DNA repair/modification..... | 58 |
| 4.4 Flagella and chemotaxis..... | 59 |
| 4.5 Chaperones..... | 62 |

| | | |
|-----------------------------------|---|-----|
| 4.6 | Oxidative phosphorylation | 63 |
| 4.7 | Metabolism under different environments | 64 |
| MANUSCRITO 2 | | 67 |
| 1. | ABSTRACT..... | 67 |
| 2. | INTRODUCTION..... | 67 |
| 3. | MATERIALS AND METHODS | 68 |
| 3.1 | Strains and Growth Conditions..... | 68 |
| 3.2 | Plasmid cloning and bacterial conjugation:..... | 69 |
| 3.3 | Growing curves and plasmid stability..... | 70 |
| 3.4 | <i>In vitro</i> competition | 71 |
| 3.5 | Statistical analysis..... | 72 |
| 4. | RESULTS AND DISCUSSION | 72 |
| CONCLUSÕES | | 76 |
| PERSPECTIVAS FUTURAS | | 77 |
| REFERÊNCIAS: | | 78 |
| APÊNDICE | | 94 |
| 1. | Comparação do perfil de crescimento das estirpes mutantes ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1.2$) com a estirpe parental SmR1 em meio NFbHPN-malato. .. | 94 |
| 2. | Avaliação do perfil de crescimento da estirpe selvagem SmR1 e o mutante $\Delta rpoN$ de <i>H. seropedicae</i> em condições de limitação de amônio. | 96 |
| 3. | Avaliação da resistência ao estresse oxidativo das estirpes SmR1 e mutantes por adição de metilviologênio. | 98 |
| 4. | Avaliação da resposta de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1 e os mutantes isogênicos ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, e $\Delta phaZ1.2$) ao choque térmico. | 100 |
| 5. | Construção dos plasmídeos de pCH03 e pCH04 com proteínas de fluorescência. | 102 |
| 6. | Análise transcriptômica comparativa da estirpe mutante $\Delta rpoS$ e parental SmR1 na fase estacionaria e em condições de choque térmico | 109 |

INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (BNF) e a promoção de crescimento vegetal por bactérias que colonizam plantas constitui uma área de pesquisa de grande importância para a agricultura mundial. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na colonização de plantas por esses microrganismos benéficos que estão presentes no solo e na rizosfera, pode contribuir para o aumento da produtividade de espécies vegetais de interesse econômico. Ao mesmo tempo, o sucesso do emprego de bactérias como biofertilizantes é uma alternativa para a diminuição do uso de fertilizantes químicos na agricultura, que provocam a acidificação dos solos, contaminação de aquíferos por eutrofização e a emissão de gases de efeito estufa (Bhardwaj *et al.*, 2014; Chisholm *et al.*, 2014; Farrar *et al.*, 2014; Fischer, 1994).

A análise da comunidade de bactérias e de outros microrganismos associados à rizosfera está baseada em um conjunto de técnicas clássicas como: isolamento de estirpes por métodos de cultura, caracterização de mutantes, marcação das bactérias para o estudo de competição e descrição das etapas do processo de colonização (Benizri, E., Baudoin e Guckert, 2001). Assim como também ferramentas mais modernas como é o caso das técnicas ômicas (transcriptômica, proteômica, metagenômica e metabolômica) as quais têm facilitado as investigações das bases moleculares que controlam todo o processo de estabelecimento e adaptação de microrganismos benéficos nas interações planta-bactéria.

Técnicas de marcação são muito importantes pois elas permitem correlacionar o comportamento de um microrganismo em condições de laboratório com o que ele apresenta no seu ambiente natural (Gamalero *et al.*, 2009). Isso é relevante já que permite que muitos dos aspectos da regulação gênica e da fisiologia determinados em laboratório, possam ser avaliados em condições de campo. A marcação pode ser incorporada por meio de um plasmídeo ou utilizando uma integração genômica. Através do estudo com genes repórter tem sido possível identificar microrganismos de interesse e acompanhar a expressão de genes *in planta*. Dessa forma, as bactérias podem ser marcadas com um gene que expresse GFP constitutivamente e ser monitoradas no seu ambiente natural (Lugtenberg e Kamilova, 2009).

Existem várias técnicas para a detecção dos microrganismos marcados, porém a mais utilizada no estudo de interação-planta bactéria é a microscopia confocal. A combinação da marcação com uma proteína de fluorescência, por exemplo GFP, de uma

bactéria na raiz e o uso de microscopia confocal permite a análise das interações espaciais em tempo real sem requerer pré-processamento das amostras. Além disso, graças à identificação de novas proteínas auto fluorescentes (AFPs), assim como o desenvolvimento de proteínas fluorescentes melhoradas, tem sido possível incrementar o número de aplicações, por exemplo, experimentos de marcação dupla ou com mais proteínas num mesmo sistema, sendo avaliado em paralelo graças aos seus diferentes espectros de absorção e emissão (Kiely *et al.*, 2006).

Por outro lado, uma das ferramentas mais versáteis dentro do estudo das ômicas, é a análise de transcriptoma. Um transcriptoma é um sistema dinâmico que compreende todos os mRNAs transcritos dentro de uma célula, permitindo assim estudar com detalhe todas as mudanças no perfil de expressão de genes para dessa forma se adaptar às condições ambientais.

As bactérias endofíticas são de interesse particular pela presença de ‘traços’ de colonização, genes e vias metabólicas que conferem os benefícios às plantas hospedeiras e pelas suas adaptações ao estilo de vida endofítico que permitem sobreviver no interior dos tecidos sem provocar doenças ou inclusive sucumbir diante do sistema imune da planta.

Durante a colonização, as bactérias endofíticas podem ser submetidas a diferentes tipos de estresse do ambiente externo, da competição com outros organismos presentes na rizosfera, e da própria planta através da sua resposta imune nos estágios iniciais da infecção. Sendo assim, as bactérias precisam responder rapidamente a essas condições ativando ou reprimindo a expressão de genes e vias metabólicas essenciais para sua adaptação (Knief, Delmotte e Vorholt, 2011).

Bactérias são capazes de modular rapidamente a expressão dos seus genes por meio de diferentes mecanismos, entre eles, o uso de diferentes fatores sigma. Os fatores sigma são subunidades acessórias da RNA polimerase capazes de se ligar na enzima *core* (RNA polimerase). A ligação dos fatores sigma com a enzima *core* dá origem a diferentes holoenzimas com a capacidade de reconhecer e iniciar a transcrição de diversos promotores (Peano *et al.*, 2015).

O conjunto de genes reconhecidos por uma mesma proteína reguladora é denominado regulon. Portanto, cada fator sigma e o conjunto de genes modulados por ele constituem regulons específicos. O número de fatores de transcrição existentes no

genoma varia entre as diferentes espécies de bactérias e alguns deles estão envolvidos na regulação homeostática como o caso do fator RpoD (σ^{70}). Outros, pelo contrário, respondem a diferentes condições de estresse, entre eles podemos mencionar RpoH (σ^{32} , envolvido com a resposta ao choque térmico), RpoS (σ^{38} ou σ^S , regulador mestre da resposta ao estresse), RpoN (σ^{54} ou σ^N , regulador da resposta à limitação de nitrogênio) e FliA (σ^{28} ou σ^F , envolvido na síntese do flagelo e na motilidade).

A ativação do regulador mestre da resposta ao estresse RpoS pode fazer com que as bactérias sejam capazes de se adaptar a condições de limitação de nutrientes e diferentes tipos de estresse ao mesmo tempo. Essa resistência cruzada sugere que muitos dos genes dependentes de RpoS ativados diante de uma determinada situação podem funcionar em outra. Por exemplo, a limitação por fontes de carbono pode deixar as bactérias resistentes a mudanças no pH, estresse oxidativo, altas ou baixas temperaturas e choque osmótico. Portanto, se a resistência a uma determinada condição está ligada a grupos de genes diferentes, podemos dizer que existe um “núcleo” de genes que pode ser induzido independentemente do estresse que a bactéria receba (Battesti, Majdalani e Gottesman, 2011a).

Herbaspirillum seropedicae é uma betaproteobacteria endofítica, diazotrófica, que tem sido encontrada em associação com plantas de interesse econômico como arroz, cana-de-açúcar, milho e trigo (Roncato *et al.*, 2003). Esse tipo de associação tem sido demonstrada como benéfica, pois as plantas dependem muito da microbiota presente no solo para ter uma boa disponibilidade de nutrientes, promoção do crescimento e supressão de doenças (Farrar, Bryant e Cope-Selby, 2014).

H. seropedicae constitui um organismo modelo de endófito que tem sido estudado ativamente já que promove a fixação de nitrogênio em plantas, além disso possui outros mecanismos importantes na interação planta-bactéria, entre eles, a produção de fitohormônios como giberelinas e ácido indolacético (AIA). Adicionalmente, foi demonstrado que espécies de *Herbaspirillum* tem um papel importante na proteção contra patógenos como *Fusarium oxysporum* (Ting, Mah e Tee, 2011), e também na assimilação de fosfatos (Bastián *et al.*, 1998; Roncato *et al.*, 2003; Young, 1998).

O genoma de *H. seropedicae* encontra-se completamente sequenciado e anotado (Pedrosa *et al.*, 2011), o que facilita os estudos moleculares envolvidos no metabolismo da fixação de nitrogênio e da interação com plantas. Já foram realizados vários estudos

que identificaram genes e vias metabólicas que são reguladas durante a colonização e a interação de *H. seropedicae* com diferentes hospedeiros vegetais de importância econômica (Balsanelli *et al.*, 2010; Balsanelli *et al.*, 2016a; Pankiewicz *et al.*, 2016b). Os dados de sequenciamento genômico também tem permitido o avanço na caracterização dos mecanismos envolvidos na produção e mobilização de polihidroxibutirato (PHB) (Alves *et al.*, 2016; Catalán *et al.*, 2007; Tirapelle *et al.*, 2013).

Este trabalho teve como objetivos realizar o estudo transcriptômico comparativo entre o mutante $\Delta rpoS$ e a estirpe parental SmR1 em condições de choque térmico, visando assim desvendar alguns dos genes que fazem parte do regulon σ^S em *H. seropedicae*. Além disso, propusemos a elaboração de plasmídeos para marcação cromossômica direcionada de *H. seropedicae*, utilizando regiões de integração genômica conhecidas; cada plasmídeo contendo um tipo diferente de proteína fluorescente. Os resultados desse trabalho demonstram que essa ferramenta pode ser aplicada em ensaios de competição e colonização de diferentes estirpes *in vitro* e *in planta*. Os resultados obtidos permitirão ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos moleculares que fazem de *H. seropedicae* um modelo de endófito ao mesmo tempo que permitirá o desenvolvimento de novas estirpes mais eficientes na capacidade de colonização e promoção de crescimento vegetal.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

As práticas convencionais de agricultura estão baseadas na utilização massiva de fertilizantes e pesticidas o que representa altíssimos custos de produção, riscos à saúde e problemas no meio ambiente pois, além da contaminação de aquíferos pelo escoamento, o uso descontrolado também provoca o empobrecimento dos solos e, portanto, perdas nas áreas cultiváveis. Deste modo, nos últimos anos se desenvolveu um grande interesse pela busca de alternativas com enfoque biológico, que prezam pela conservação dos ambientes; dentre essas, destaca-se a utilização de microrganismos do solo chamados rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) (Barret *et al.*, 2011).

Todos os microrganismos presentes no solo são extremamente essenciais durante todas as fases do processo agrícola, a intervenção desses microrganismos na fertilidade do solo, as interações que são capazes de estabelecer com plantas e a sua capacidade como agentes de controle biológico e biorremediação foi justamente o que levou a pensar que poderiam ser explorados na agricultura. As PGPR, através da fixação biológica de nitrogênio (BNF) entre outros benefícios oferecidos às plantas, podem substituir os métodos clássicos de agricultura reduzindo os efeitos nocivos derivados do uso excessivo de fertilização química e controle de pragas sem sacrificar os ganhos em produtividade (Dall'Asta *et al.*, 2019).

A rizosfera é a região onde acontecem as interações entre o solo, microrganismos e as plantas. Esta zona pode se dividir em três partes: a ectorizosfera (solo aderido) que se define como o solo que fica adjacente às raízes da planta; o rizoplano ou superfície da raiz; e finalmente, a área interna que compreende a rizoderme e as células corticais. A rizosfera é uma região com uma intensa atividade microbiana em grande parte devido à presença dos exsudatos das plantas. Bactérias benéficas de vida livre (ou também bactérias associativas) estão nesse ambiente junto com outros microrganismos deletérios ou neutros para as plantas (Mercado-Blanco e Bakker, 2007).

Dentro desse grupo amplo de microrganismos encontram-se as PGPR, as quais podem estabelecer associações muito próximas com as raízes, colonizando-as seja de forma epifítica (fora da raiz) e endofítica (interior dos tecidos) sem provocar uma resposta

de defesa na própria planta. Essas bactérias, quando associadas às plantas são capazes de promover um melhor crescimento e aumento de produtividade a partir de mudanças na arquitetura das raízes, aumento da tolerância ao estresse, a produção de fitohormônios, o aumento da biodisponibilidade de nutrientes, e também são capazes de ajudar no processo de defesa da planta contra patógenos através de diferentes mecanismos diretos ou indiretos (Miliute *et al.*, 2015).

As bactérias endofíticas são consideradas uma subclasse que compreende um grupo altamente especializado de microrganismos os quais tem adquirido a capacidade de invadir as plantas hospedeiras. A colonização endofítica do hospedeiro por PGPR é determinada por uma série de traços genéticos que o microrganismo deve possuir. Em conjunto, todas essas características são chamadas de “traços de colonização” e regulam o processo inteiramente (Compant, Clément e Sessitsch, 2010).

1.1 Colonização endofítica por PGPR

O processo se inicia com a resposta quimiotáxica positiva das bactérias provocada pelos exsudatos excretados na raiz da planta; para isso, as bactérias devem possuir sistemas de quimiotaxia que permitam a detecção desses compostos e sistemas de motilidade que lhe permitam chegar até a fonte do estímulo químico, o processo de adesão é mediado por polissacarídeos e adesinas bacterianas. Uma vez na superfície da raiz, bactérias são capazes de encontrar pontos de entrada como feridas e pontos de emergência lateral, utilizando sua motilidade. O processo de colonização dos tecidos internos pode ser realizado de forma ativa ou passiva (*crack entry*) (Carvalho *et al.*, 2016).

Na forma ativa do processo, as bactérias utilizam uma maquinaria celular que compreende várias enzimas capazes de degradar a parede celular da planta, envolvendo também a presença de polissacarídeos, flagelos, pili, motilidade espasmódica e quórum sensing. Apesar de não ter sido provado de forma experimental, tem sido proposto que bactérias endofíticas produzem níveis muito baixos de enzimas degradadoras da parede celular quando comparadas com as suas contrapartes patogênicas, que produzem altos níveis o que leva à ativação da resposta imunológica da planta (Elbeltagy *et al.*, 2001).

Na colonização passiva, as bactérias ingressam aos tecidos internos especificamente aqueles pontos onde ocorrem feridas naturais como resultado do

crescimento da planta, ou através dos pelos da raiz ou junções epidérmicas. As feridas servem como ponto de entrada e, além disso, são sítios de vazamento de exsudatos que servem como fonte de nutrientes para as bactérias (Lodewyckx *et al.*, 2002).

Durante a colonização, as plantas exercem um papel muito importante pois graças aos exsudatos da raiz, elas são capazes de modelar as comunidades de microrganismos que fazem parte da rizosfera, permitindo assim a colonização daqueles com os quais se tem uma associação mais benéfica (Canarini *et al.*, 2019).

Apesar dos chamados “traços de colonização” que as bactérias possuem, é importante ressaltar que como uma forma de evitar a resposta imunológica da planta, bactérias costumam ter densidades muito baixas quando colonizando os tecidos da planta. Geralmente, as maiores densidades bacterianas estão associadas diretamente à raiz da planta e a partir disso a quantidade de microrganismos começa diminuir entre o tronco e as folhas (Amaral *et al.*, 2020).

O fato de bactérias serem capazes de colonizar os tecidos internos das plantas pode conferir uma certa vantagem frente a outras bactérias que somente colonizam de forma epifítica, pois os tecidos internos podem proporcionar um ambiente mais uniforme e protetor onde a exposição a condições ambientais extremas como variação de temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta, são os principais fatores limitantes para a sobrevivência das bactérias a longo prazo (Farrar, Bryant e Cope-Selby, 2014).

As bactérias presentes no solo estão submetidas a constante estresse abiótico, entre eles, variações na composição do tipo de solo e da temperatura. Esses dois são fatores extremamente importantes pois eles podem modular a forma como os organismos interagem com as partículas de solo (processo conhecido como absorção) e que depende de fatores do solo como pH, a proporção de matéria orgânica, o conteúdo de argila, e de cátions polivalentes (Benizri, Baudoin e Guckert, 2001).

A temperatura por sua parte, também a afeta a viabilidade e eficiência da colonização. Em temperaturas mais altas, as bactérias tem uma diminuição da eficiência nas camadas superiores do solo, mas o oposto acontece para camadas inferiores (Bowers e Parke, 1993).

1.2 Benefícios das bactérias promotoras de crescimento vegetal

Os efeitos benéficos que as bactérias promotoras de crescimento vegetal podem trazer às plantas podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos diretos derivam da promoção do crescimento a partir da síntese de compostos pela bactéria que são utilizados pela planta ou também por mecanismos que facilitem a captura e a assimilação de determinados nutrientes (Ma *et al.*, 2016). Entre os efeitos indiretos tem-se a diminuição ou prevenção dos efeitos deletérios causados por patógenos (Miliute *et al.*, 2015).

1.2.1 Fixação biológica de nitrogênio

O principal efeito direto e o mais importante é a fixação biológica de nitrogênio, pois as PRPG são, em boa parte, bactérias diazotróficas (Vessey, 2003). Neste sentido, bactérias endofíticas possuem uma vantagem no processo de fixação quando comparadas com as epifíticas pois, ao colonizar os tecidos internos da planta encontram sítios para explorar os substratos de carbono que, além da baixa disponibilidade de oxigênio são extremamente importante para a expressão dos genes da nitrogenase e de seus produtos (Hurek e Reinhold-Hurek, 2003).

Alguns estudos em campo com espécies de grama selvagem têm estimado que a BNF é responsável de 30% ou mais do nitrogênio utilizado pelas plantas (Boddey *et al.*, 1995; Morais, de *et al.*, 2012). Porém, poucos haviam focado em demonstrar a incorporação nas plantas do nitrogênio fixado pelas bactérias. O estudo desenvolvido por Pankiewicz *et al.* (2015) aborda essa questão a partir da avaliação do decaimento de isótopos radiativos de ^{13}N e ^{11}C na porção aérea e raízes de *Setaria viridis* inoculadas com as bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense* (FP2 e HM053) e *H. seropedicae* (RAM4). A partir dessas análises, os autores demonstraram a incorporação de uma porção significativa do nitrogênio fixado na planta hospedeira; especialmente aquelas inoculadas com a estirpe HM053 (super excretor de amônio) de *A. brasilense*, assim como o transporte desses isótopos de nitrogênio às partes aéreas da planta. Adicionalmente, reportaram a existência de uma correlação positiva entre a quantidade de isótopo de ^{11}C incorporado e os níveis de BNF, tal incremento no aumento da fixação de carbono

contribui também na promoção do crescimento em plantas inoculadas com as PGPR (Pankiewicz *et al.*, 2015).

1.2.2 *Solubilização de fosfatos*

Depois do nitrogênio, o fósforo é o segundo elemento mais importante para muitas das reações enzimáticas. Apesar de ser um composto abundante no solo, está disponível numa forma que as plantas são incapazes de assimilar ou inclusive, no caso do fornecimento através de fertilização química, ele acaba sendo sequestrado em uma forma insolúvel. Nesse sentido, bactérias promotoras de crescimento vegetal são capazes de incrementar a disponibilidade de fósforo através da solubilização por meio de mecanismos como a acidificação, quelação, intercâmbio com ferro e produção de compostos orgânicos (Chabot, Antoun e Cescas, 1996).

1.2.3 *Disponibilização do ferro*

O ferro é um mineral importante na vida de muitos organismos e está envolvido em vários dos processos fisiológicos das plantas. Ele está geralmente presente na forma de íons Fe^{3+} o que dificulta sua absorção pelas plantas. As bactérias endofíticas são capazes de produzir agentes quelantes de ferro chamados sideróforos que podem se ligar aos íons de ferro e tais compostos ligados podem ser assimilados pelas plantas (Miliute *et al.*, 2015).

1.2.4 *Produção e modulação de fitohormônios*

As bactérias promotoras de crescimento vegetal também podem sintetizar fitohormônios que podem ajudar em vários estágios do desenvolvimento das plantas. Reguladores do desenvolvimento de plantas como etileno, auxinas e citocininas são também produzidos por várias espécies de bactérias, entre elas, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Azotobacter* e *Azospirillum* (Elbeltagy *et al.*, 2001; Germaine *et al.*, 2004; Pankiewicz *et al.*, 2015). Graças à produção desses compostos, bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de facilitar o aumento da raiz das plantas às

quais se associa, o que permite uma melhor captação de nutrientes, tal efeito tem sido atribuído diretamente à produção de auxinas (Coniglio *et al.*, 2019).

Outra enzima encontrada em microrganismos endofíticos que atualmente é estudada pelo seu envolvimento no processo de promoção de crescimento vegetal é a 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase). Esta enzima, cuja função era desconhecida em bactérias, é a responsável pela estimulação do crescimento via modulação dos níveis de etileno nas plantas. O etileno é muito importante para o controle da resposta da planta ao estresse biótico e abiótico. Além disso, o etileno controla vários processos no desenvolvimento da raiz, senescência das folhas, nodulação nas raízes, abscisão, crescimento celular, transporte de auxinas e amadurecimento dos frutos (Sun, Wang e Li, 2016).

1.2.5 Efeitos indiretos da promoção de crescimento vegetal

Sobre os efeitos indiretos na promoção do crescimento vegetal proporcionada por PGPR, um dos mais importante é a capacidade que as bactérias possuem de impedir as plantas de sofrerem os efeitos deletérios por parte de microrganismos patogênicos. Por exemplo, a inoculação em plantas de milho com a bactéria *Burkholderia cepacia* isolada da rizosfera de milho levou à supressão de doenças e promoção de crescimento vegetal (Mitter *et al.*, 2013).

Os mesmos efeitos foram observados no combate de *Fusarium moniliforme*, fungo patogênico também presente no milho, pela bactéria *Burkholderia cepacia* (Ting, Mah e Tee, 2011). Como mecanismos que as PGPR possuem para combater organismos patogênicos podemos mencionar:

1.2.5.1 Produção de sideróforos e competição por nichos

Bactérias promotoras de crescimento podem ter também um efeito antagonista e impedir o desenvolvimento de patógenos pela produção de sideróforos com afinidade elevada por íons ferro (Fe^{+3}) que constitui uma das formas mais disponíveis de ferro na

rizosfera. A partir da captura desses íons, as bactérias limitam o desenvolvimento de outros microrganismos (Mercado-Blanco e Bakker, 2007).

A competição entre os microrganismos da rizosfera pela disponibilidade de nutrientes e espaços na raiz da planta previne o desenvolvimento de bactérias patogênicas causadoras de doenças. A área ao redor da raiz constitui um sumidouro de carbono e portanto, ao redor de toda a zona da rizosfera existem vários nichos ricos em nutrientes que atraem uma ampla diversidade de microrganismos, incluindo patógenos. A competição das PGPR contra esses outros organismos deletérios é extremamente importante na proteção da planta. Os exsudatos da raiz também podem controlar a colonização, pois ao mesmo tempo que servem como elementos para atração das bactérias, eles possuem uma série de compostos com atividade antimicrobiana que dá uma vantagem ecológica a aqueles microrganismos que tem capacidade para degradar e eliminar esses compostos. Portanto, pode-se afirmar que a capacidade das bactérias promotoras de crescimento vegetal de colonizar de forma eficiente depende da sua habilidade de tomar vantagem do ambiente específico e da sua capacidade de se adaptar as variações nesse mesmo ambiente (Compant, Clément e Sessitsch, 2010).

A biossíntese de sideróforos está regulada fortemente pelas proteínas sensíveis ao ferro tais como: Fur, o regulador global GacS, GacA, o fator sigma RpoS, PvdS e FpvI, indutores de *quorum sensing* como N-acyl homoserina lactona e recombinases específicas. Apesar disso, resultados preliminares têm mostrado que RpoS não tem um efeito significativo sobre a produção de sideróforos, e que pelo contrário, uma miríade de fatores além dos genes mencionados anteriormente poderia estar envolvida no processo tais como: o pH, a quantidade e a forma de ferro disponível no solo, a presença de outros elementos traços. O suprimento adequado de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo (Compant *et al.*, 2005).

1.2.5.2 Produção de substâncias aleloquímicas

Outro mecanismo de proteção compreende a produção de substâncias com atividade biológica como antibióticos, metabolitos e enzimas degradativas que são nocivas para o desenvolvimento de outros microrganismos. A atividade antimicrobiana

de algumas bactérias contra fungos é o resultado da produção de certas enzimas como quitinases, proteases e glucanases (Zarei *et al.*, 2011).

A base dos mecanismos de antibiose por PGPR apenas começou a ser entendida nos últimos anos, isso tem levado à identificação de um conjunto de compostos antibióticos como anfisina, 2,4-di-acetilfloroglucinol (DAPG), cianeto de hidrogênio, oomicina A, fenazina, piroluteorina, pirrolnitrina, tensina, tropolona e lipopeptídeos cíclicos produzidos por *Pseudomonas*. Muitos desses antibióticos estão sendo estudados também como possíveis fármacos experimentais visando melhorar o repertório de compostos para lidar com bactérias multirresistentes. As cascatas regulatórias que controlam a síntese desses compostos são reguladas pelos sistemas GacA/GacS, GrrA/GrrS, RpoD, RpoS, homoserino-lactonas, a síntese de antibióticos está fortemente controlada pelo estado metabólico das bactérias que por sua vez é controlado pela disponibilidade de nutrientes e os estímulos ambientais (Compant *et al.*, 2005).

1.2.5.3 Produção de enzimas líticas

Muitas das PGPR estudadas possuem uma atividade antifúngica muito forte contra patógenos de plantas conhecidos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium miriodylum*, *Gaeumannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum*, e existem também evidências de biocontrole de organismos como insetos e nematódeos (Lodewyckx *et al.*, 2002).

Elas produzem substâncias que tem um papel antagônico contra patógenos tais como antibióticos, toxinas, sideróforos, enzimas hidrolíticas, e compostos orgânicos voláteis com atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana derivada de fungos resulta da produção de enzimas degradativas da parede celular como quitinases, proteases e glucanases (Afzal *et al.*, 2019).

1.2.5.4 Resistência sistêmica induzida

PGPR também são capazes de induzir respostas na planta que podem prepará-las para futuras infecções ou condições de estresse. Por exemplo, a invasão de bactérias endofíticas no hospedeiro pode levar à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Esse aumento pode ser neutralizado pela produção de compostos antioxidantes por parte das plantas, mitigando assim, a condição de estresse derivada da resposta imunológica e que poderiam ser utilizados para protegê-la em alguma outra condição que provoque o aumento de ROS. A colonização de *Lulium perenne* pelo fungo endofítico *Neotyphodium lolii* mostrou um aumento significativo nos níveis de compostos fenólicos com potencial antioxidante na planta, esses compostos tem um efeito benéfico na sobrevivência à seca e tolerância ao estresse osmótico (Rasmussen, Parsons e Newman, 2009).

Na resistência sistêmica induzida, as PRPG podem provocar uma resposta de defesa leve que ajudaria à planta a lidar com futuras infecções por organismos patogênicos. Por exemplo, a resistência sistêmica adquirida (SAR) da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, é ativada por patógenos como parte da resposta hipersensitiva ou como consequência aos sintomas da doença, levando à ativação da via de etileno/ácido jasmônico. Não obstante, a ativação desses mecanismos de forma leve permite modular de forma mais eficiente a resposta nas próximas infecções (Duijff *et al.*, 1998).

1.3 Modelos experimentais de PGPR

Desde 1990 tem aumentado expressivamente a utilização de bactérias diazotróficas endofíticas como biofertilizantes na agricultura, os principais organismos pertencem aos gêneros: *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, e *Herbaspirillum* como PGPR (Monteiro *et al.*, 2012).

1.3.1 *Pseudomonas* como modelo de PGPR

O grupo de espécies do gênero *Pseudomonas* compreende bactérias aeróbicas gram-negativas, heterotróficas, móveis e com forma de haste. As *Pseudomonas* são um grupo muito abundante presente no solo e adaptado a uma ampla variedade de nichos. Alguns dos seus membros são patógenos de humanos; outros, pelo contrário, tem sido reconhecido pela sua capacidade de colonizar plantas como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, podendo também atuar como agentes de biocontrole. Como a ampla maioria das bactérias promotoras do crescimento vegetal, as bactérias do gênero *Pseudomonas* que se associam às plantas possuem muito dos traços

necessários para o processo da colonização; entre eles a quimiotaxia e a motilidade que têm sido apontados como elementos importantes durante os estágios iniciais do processo de colonização da raiz (Turnbull *et al.*, 2006; Weert *et al.*, 2002; Weger *et al.*, 1987).

Também, outros traços particulares como a produção do antígeno O, a capacidade da síntese de vitamina B e secreção de NADH desidrogenase, são apontados como fatores que contribuem na colonização da raiz de plantas (Simons *et al.*, 1996).

Muitas das espécies benéficas de *Pseudomonas* controlam a expressão de genes envolvidos na colonização graças aos sistemas de *quorum sensing*, que tem sido identificado em muitos grupos de bactérias. Esses sistemas são capazes de controlar processos como a biossíntese de antibióticos, a formação de biofilme, bioluminescência, esporulação e inclusive a expressão de fatores de virulências em outras espécies do gênero (Bassler, 2002; Levy *et al.*, 2018; Miller e Bassler, 2001).

Os mecanismos pelos quais as *Pseudomonas* promovem o crescimento das plantas são muito diversos e podem ser a consequência direta do fornecimento de micronutrientes minerais e fitohormônios à planta. Por exemplo, a promoção do crescimento de duas variedades de soja tem sido associada à produção de ácido indolacético (IAA) e a solubilização mineral de fosfatos por bactérias endofíticas, onde se incluem espécies do gênero *Pseudomonas* (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal envolvem o controle de fitopatógenos; pois entre as estirpes de *Pseudomonas* sabe-se que várias são capazes de agir como biocontroladores. *Pseudomonas fluorescens* é um excelente controlador do fungo *Rhizoctonia solani*, agente patogênico do tomate e o alface (Zarei *et al.*, 2011).

A supressão de doenças por *Pseudomonas* é mediada pelos efeitos diretos antagonistas no patógeno ou também pelos mecanismos de resistência sistêmica induzida, a competição por nutrientes, especialmente microelementos como Fe^{3+} , a antibiose também pode ser exercida sem nenhuma interação com a planta (Loper e Henkels, 1999; Notz *et al.*, 2001; Séveno, Morgan e Wellington, 2001; Wang *et al.*, 2013).

1.3.2 *Azospirillum* como modelo de PGPR

Azospirillum é um dos gêneros mais estudados de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) devido à capacidade que tem de colonizar diversos tipos de

plantas (Philippot *et al.*, 2013). A inoculação de espécies de plantas de interesse econômico com *Azospirillum sp.* induz o alongamento da raiz primária, melhorando assim o seu crescimento e aumentando a produtividade. Um dos representantes mais importantes do gênero é *Azospirillum brasilense* (Coniglio *et al.*, 2019).

A bactéria diazotrófica, de vida livre *Azospirillum brasilense* é capaz de colonizar solo, rizosfera, e os tecidos internos de numerosas plantas, incrementando o crescimento, desenvolvimento e produtividade em condições agronômicas controladas. Vários trabalhos na literatura tem demonstrado que bactérias promotoras de crescimento vegetal pertencentes ao gênero *Azospirillum* podem aumentar o crescimento das plantas por mecanismos diretos e indiretos (Klassen *et al.*, 2003).

A capacidade de *Azospirillum* promover o crescimento vegetal está ligada diretamente à sua capacidade de produzir fitohormônios (ácido indolacético, citocininas e giberelinas) e óxido nítrico (Okon, 1985). Porém alguns mutantes como a estirpe HM053 de *Azospirillum brasilense*, uma estirpe super excretora de amônio, quando inoculada em *Setaria viridis* se mostrou extremamente eficiente na fixação biológica de nitrogênio, ao ser capaz de fixar a quantidade de nitrogênio molecular suficiente para os requerimentos da planta (Pankievicz *et al.*, 2015).

Os mecanismos indiretos na promoção do crescimento vegetal incluem a indução de dois fatores importantes como são: o aumento da tolerância da planta aos diferentes tipos de estresses abióticos e a proteção contra patógenos. Apesar de que inicialmente foi apontada que a fixação biológica de nitrogênio é um dos mecanismos mais importantes na promoção do crescimento, atualmente sabe-se que o mecanismo de promoção envolve todo o conjunto de fatores mencionados anteriormente, algo que os autores tem denominado de “hipótese aditiva” (Coniglio *et al.*, 2019).

Os efeitos positivos de *Azospirillum* em plantas atraíram a atenção de muitos pesquisadores devido à necessidade da redução no uso de químicos na agricultura e a troca por um enfoque mais sustentável. Graças a isso, hoje em dia inoculantes baseados em *Azospirillum* tem sido comercializado em países como Argentina, Brasil, México, Itália, Índia, França, entre outros. Os preparados biológicos contendo *Azospirillum* são aplicados principalmente em cultivos de milho e trigo, seguido do sorgo, girassol, soja, gramíneas, arroz, cevada, algodão, aveia, cana de açúcar e tabaco, resultando assim em um importante componente da agricultura sustentável pois por um lado, os inoculantes

geram um impacto econômico positivo pelo incremento na produtividade de cultivos agrícolas e por outro, representam uma contribuição importante devido ao uso de microrganismos do solo (Coniglio *et al.*, 2019).

Numerosos estudos baseados na caracterização de mutantes *Azospirillum* têm demonstrado a importância dos traços genéticos durante o processo de colonização. Por exemplo: Milcamps *et al.* (1996) realizaram a caracterização funcional do mutante *rpoN* de *Azospirillum brasilense* e os seus resultados apontaram que o gene é essencial para o processo de fixação de nitrogênio, assimilação de nitratos e de amônio. Além disso, o estudo mostrou que os mutantes *rpoN* não tinham motilidade, sugerindo assim que RpoN também poderia estar envolvido no processo de síntese e montagem do flagelo.

O estudo de Broek *et al.* (1998) demonstrou a importância da motilidade e da quimiotaxia como traços essenciais para o processo de colonização de *Azospirillum brasilense*. Dessa forma, através da avaliação de várias estirpes mutantes defectivas na motilidade ou quimiotaxia e marcadas com o gene reporter *gusA*, os autores demonstraram como tais mutações levaram a uma diminuição significativa na capacidade das estirpes de colonizar raízes de trigo.

1.3.3 *Herbaspirillum seropedicae* como modelo de PGPR

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria promotora de crescimento vegetal capaz de colonizar os tecidos internos de várias espécies de plantas de interesse comercial, entre elas: gramíneas como milho, sorgo, arroz, trigo etc. tendo sido encontrada também em outras monocotiledôneas como banana e abacaxi. A estirpe *H. seropedicae* SmR1 é a espécie mais estudada do gênero e foi a primeira espécie que teve o genoma inteiramente sequenciado (Pedrosa *et al.*, 2011).

Muitas características presentes em *H. seropedicae* fazem dele um modelo de endófito importante, dentre elas: é capaz de prover nitrogênio quando inoculado em plantas de interesse comercial através da fixação biológica, é geneticamente rastreável, possui outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal além da fixação de nitrogênio, possui uma ampla variedade de plantas hospedeiras, bactérias cultiváveis são isoladas unicamente do interior das raízes e não do solo, seu genoma já foi sequenciado e está disponível publicamente (Rosconi *et al.*, 2016).

Rizobactérias capazes de realizar colonização endofítica são capazes de expressar os genes necessários para adesão, penetração e colonização da planta, o que permite a sua sobrevivência dentro dos tecidos da planta. Dentro dos traços que estão envolvidos no processo de colonização por endófitos pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, temos: genes homólogos ao sistema de secreção de tipo 3 (T3SS), pili de tipo IV, adesinas/hemaglutininas e genes envolvidos na síntese de lipopolissacarídeos e exopolissacarídeos, os quais foram identificados no genoma de *H. seropedicae* (Balsanelli *et al.*, 2016).

Numerosos estudos envolvendo *H. seropedicae* e plantas de interesse comercial tem contribuído a desvendar os diferentes mecanismos moleculares envolvidos no processo de interação planta-bactéria. A análise transcriptômica de *H. seropedicae* em associação com raízes de trigo comparada com bactérias em condições planctônicas, permitiu observar um aumento da expressão de genes envolvidos na fixação biológica de nitrogênio, metabolismo de polihidroxi-butarato, modelagem da parede celular e expressão de adesinas, sugerindo assim modificações específicas que tem sido detectadas em bactérias adaptadas ao estilo de vida rizosférico/endofítico (Pankievicz *et al.*, 2016).

A comparação do perfil transcriptômico de *H. seropedicae* cultivada em condições planctônicas versus a bactéria colonizando raízes de milho (1 e 3 dias após inoculação) mostrou que o conjunto de genes mais expressos durante o início da colonização corresponde aos associados com metabolismo de nitrogênio, e a mobilização de polihidroxi-butarato. Durante os estágios mais tardios, bactérias epifíticas mostraram a ativação de genes associados à síntese de polissacarídeos, peptidoglicano e de biossíntese da membrana externa, sugerindo também uma reorganização dos componentes da parede celular. Sistemas de quimiotaxia também mostraram uma expressão aumentada durante o início da colonização. A mutação de um dos genes identificado como parte do sistema de proteínas de quimiotaxia aceptoras de metila (MCPs) levou a um fenótipo que apresentou redução em duas vezes, na performance durante a colonização, indicando assim a importância desse traço genético durante o processo (Balsanelli *et al.*, 2016).

A produção de polihidroxi-butarato (PHB) tem sido apontada também como uma característica importante dentro do processo de colonização e promoção de crescimento vegetal pois geralmente o PHB é acumulado em condições de baixo amônio ou fosfato e alto carbono. As bactérias armazenam o polímero na forma de grânulos até as condições ficarem favoráveis novamente; com isso, elas são capazes de sobreviver a ambientes

competitivos como o solo ou a rizosfera de plantas, usando a sua reserva de energia na forma de PHB quando enfrentam condições de crescimento desfavoráveis. Portanto, a presença de um ciclo de PHB funcional é muito importante para os organismos competirem, reconhecerem e colonizarem os seus hospedeiros (Alves *et al.*, 2019).

2. Estudo dos mecanismos da interação planta-bactéria

A identificação dos traços de colonização em bactérias capazes de se associar às plantas têm sido feita utilizando uma combinação de diferentes enfoques moleculares. Esses enfoques foram resumidos por Barret *et al.*, (2011) na sua revisão da análise genômica funcional dos traços de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal envolvidos na competição na rizosfera. A Figura 1 apresenta os diferentes enfoques que têm sido aplicados para decifrar os mecanismos dos traços moleculares envolvidos na competência das bactérias na rizosfera.

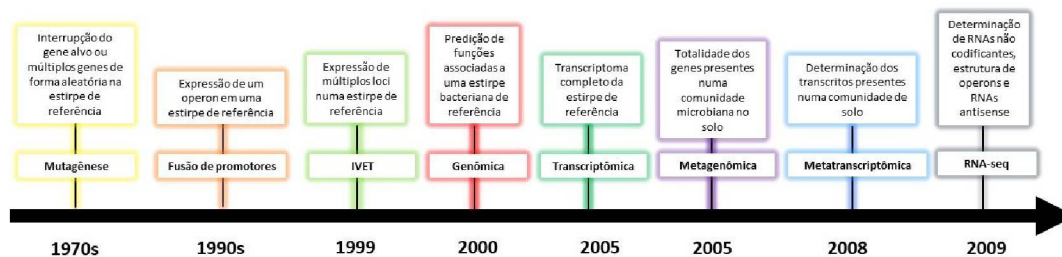


Figura 1. Timeline dos enfoques moleculares aplicados as bactérias rizosféricas. Adaptado de Barret *et al.*, 2011.

2.1 Deleção genômica e mutagenese aleatória

A importância que um determinado traço genético tem durante o processo de colonização e promoção de crescimento vegetal pode ser avaliada através de estudos de mutantes. Esses mutantes podem ser gerados de maneira aleatória ou podem ser

mutações/deleções dirigidas quando o gene avaliado já mostrou previamente um papel fundamental durante qualquer uma das etapas do processo.

Por exemplo, para avaliar um determinado traço de colonização em bactérias é feita a comparação da capacidade de colonização dos mutantes em relação à estirpe parental, esta metodologia provê duas alternativas, na primeira, as tentativas de definir quais traços estão envolvidos no processo de colonização, e depois a identificação e o isolamento desses mutantes (Benizri, E., Baudoin e Guckert, 2001).

De fato, as primeiras análises sobre quais são os traços genéticos mais importantes para o processo de colonização são baseadas neste enfoque. Por exemplo, o estudo da eficiência na colonização de mutantes espontâneos da bactéria *Rhizobium meliloti* deficientes na motilidade e quimiotaxia. Cada um desses mutantes foi comparado com a estirpe parental e determinada a sua capacidade de realizar a nodulação em plantas de alfafa (*Medicago sativa*), a partir dos resultados foi demonstrado que eles tinham a capacidade de gerar nódulos, porém, com desenvolvimento tardio. Quando em competição com a estirpe parental, os mutantes precisavam que a sua concentração fosse em torno de 20 a 30 vezes maior do que a estirpe parental para alcançar a mesma eficiência de nodulação, indicando assim que tais traços são extremamente importantes na colonização e capacidade de competir eficientemente das bactérias (Caetano-Anollés *et al.*, 1988).

Esses primeiros estudos de mutagênese foram realizados em estirpes que previamente haviam sido identificadas como bactérias promotoras de crescimento vegetal. Porém, durante os primeiros anos de pesquisa de PGPR em solo, muitos dos trabalhos eram baseados também no isolamento e identificação de estirpes com potencial PGPR a partir de amostras de tecido da raiz ou da rizosfera em torno das plantas. Com as ferramentas disponíveis na época, muitos desses estudos encontraram limitações associadas ao estado metabólico das bactérias que impediam a sua identificação.

Comunidades bacterianas endofíticas eram estudadas através de métodos baseados em cultura. Para isso, as bactérias eram isoladas em condições de laboratório utilizando meios de cultura seletivos para bactérias diazotróficas. Eles deviam ser suficientemente sensíveis para recuperar a grande parte das bactérias endofíticas cultiváveis e, ao mesmo tempo, seletivos para eliminar microrganismos deletérios e bactérias contaminantes que deriva do processamento dos tecidos (Barac *et al.*, 2004).

Portanto, uma das limitações mais importantes era justamente subestimar o número e a diversidade de microrganismos presentes na planta, uma vez que bactérias cultiváveis representam apenas entre 0,001 e 1% do total de organismos endofíticos. Isso provocou nos últimos anos, que métodos cultivo-dependentes fossem substituídos por métodos cultivo-independentes que costumam ser menos tendenciosos na determinação da composição real das comunidades endofíticas.

Esses métodos são baseados principalmente no sequenciamento do genoma das bactérias que se encontram colonizando a raiz da planta sejam epifíticas ou endofíticas. Nesse sentido, um dos marcadores mais utilizados para identificação é o sequenciamento do gene 16S rRNA (Garbeva *et al.*, 2001).

Tais métodos tiveram um crescimento exponencial graças às técnicas de sequenciamento de última geração (NGS) que permitiram o barateamento dos custos e aumentou na capacidade e sensibilidade dos sequenciamentos. Porém, é importante mencionar que métodos cultivo-independentes ainda possuem algumas limitações, pois a sua eficiência está diretamente ligada à quantidade e qualidade das sequências de DNA de uma população de microrganismos dentro da comunidade, assim para uma bactéria ser identificada numa amostra de solo a quantidade do seu DNA deve ser de pelo menos 1% do DNA total extraído (Smalla, 2014). Adicionalmente, a identificação dos microrganismos depende diretamente da disponibilidade das sequências previamente caracterizadas e armazenadas em bases de dados, o que impede assim a identificação de novos microrganismos (Ding e Melcher, 2016).

2.2 Estudo de promotores associados a proteína repórter

A disponibilidade de tecnologias de fusão de promotores tem permitido aos pesquisadores testar a contribuição dos traços de colonização das bactérias na sua competência na rizosfera com base à expressão gênica. Precisamente, essa tecnologia tem sido empregada para monitorar os genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários e a sua associação com o processo de antibiose. Por exemplo, Notz *et al.*, 2001 estudaram a produção do 2,4-diacetil-floroglucinol (DAPG), um fator chave na atividade de biocontrole por *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Para isso foi inserida uma fusão transcricional contendo o promotor *phlA-lacZ*, onde *phlA* é o primeiro gene que

faz parte do cluster de produção desse composto. A expressão do gene repórter coincidiu perfeitamente com as quantidades de DAPG produzidas *in vitro* e *in planta*, sendo que as diferenças eram determinadas pelo tipo de substrato avaliado e do tipo de planta que era utilizada, desse modo, os maiores níveis de DAPG *in planta* foram encontradas na rizosfera de milho e trigo (monocotiledôneas) e em menor quantidade na rizosfera de feijão e pepino (dicotiledôneas).

2.3 Avaliação de traços genéticos das PGPR utilizando técnicas ômicas

O surgimento de tecnologias de sequenciamento de última geração (NGS) e outras ferramentas moleculares como sequenciamento completo do genoma, estudos de metagenômica, transcriptômica e a marcação de bactérias com proteínas de fluorescência ou anticorpos tem sido muito importante nos últimos anos para o estudos da localização e elucidação das funções biológicas e os benefícios das interações planta-bactérias (Barret, Morrissey e O'Gara, 2011).

As informações recolhidas a partir de ciências ômicas como: análise transcriptômica, proteômica e metabolômica são valiosas para a modelagem de redes e fluxos metabólicos. Dessa forma, hoje muitos dos estudos de interações entre plantas e bactérias ou plantas e fungos têm sido analisados sob o enfoque de estudos de genoma amplo e tudo isso tem sido possível graças à presença de bases de dados que crescem cada dia mais contendo as informações de genoma, suas anotações e o advento de técnicas mais avançadas e sensíveis de sequenciamento e identificação de proteínas (Imam, Singh e Shukla, 2016).

2.3.1 Avaliação Transcriptômica para o estudo de PGPR

O modelo de endófito *Azoarcus sp.*, é uma bactéria gram-negativa isolada de gramíneas, sendo amplamente conhecida pela sua capacidade de colonizar raízes do hospedeiro e promover o crescimento a partir da fixação biológica de nitrogênio. A bactéria é capaz de colonizar espécies de interesse econômico como o arroz, tanto em

condições de campo quanto em estudos de laboratório. Visando estudar os traços genéticos envolvidos no processo de colonização, foi realizada a avaliação do transcriptoma da estirpe frente a exsudatos de arroz (*Oriza sativa*) variedade Nipponbare. Os resultados obtidos mostraram que vários traços de colonização comuns entre outras PGPR como quórum sensing, motilidade, sistemas de secreção são essenciais nesse processo. É interessante destacar a rapidez com que essa resposta acontece (vista na forma de alteração dos níveis de transcrição), pois em apenas 1h após a exposição das bactérias aos exsudatos já foi possível observar alterações no nível de transcrição de genes envolvidos na colonização (Shidore *et al.*, 2012).

2.3.2 Análises de mutagênese aleatória utilizando Tn-seq

A geração de mutantes para avaliação dos traços de colonização também pode ser feita utilizando a técnica de sequenciamento de alta eficiência aplicado à mutagênese aleatória com transposons (Tn-seq). Essa tecnologia assume a inserção de numerosas mutações aleatórias no genoma, o pool de bactérias é então submetido a uma determinada pressão de seleção e, as bactérias que sobrevivem ou são recuperadas acabam sendo sequenciadas e mapeadas no genoma para identificar qual é o gene essencial ou não naquela condição.

Agtuca *et al.* (2020) avaliaram as PGPR *H. seropedicae* e *Azoarcus oleaurius* em condições de colonização na planta modelo *Setaria viridis*. Usando a técnica de Tn-Seq demonstraram como cada uma das espécies requer funções e traços únicos para o processo de colonização, porém existe um “core” de funções críticas que devem estar presentes para uma colonização efetiva independente do microrganismo. Assim, um gene é considerado como essencial pela sua importância em manter um fitness competitivo sob uma condição de interesse. Seguindo essa lógica, o estudo permitiu a identificação de vários genes que quando mutados trazem efeitos prejudiciais no processo de colonização, alguns deles já conhecidos: genes relacionados a motilidade e quimiotaxia; inclusive novos candidatos como: genes envolvidos na degradação de PHB trazem uma vantagem durante o processo de colonização, essa última categoria foi confirmada previamente nos resultados obtidos por Alves *et al.* (2019) em *H. seropedicae*.

Graças a esses trabalhos foi possível o descobrimento de novos traços, entre eles: a produção de NADH, enzimas envolvidas no arranjo do DNA e a manutenção do pH interno. É importante ressaltar que a descoberta desses novos elementos não indica necessariamente que o gene esteja realmente envolvido no processo, mas sim que faz parte de uma complexa rede epistática de interação (Benizri, Baudoin e Guckert, 2001).

Outro estudo transcriptômico realizado em *Pseudomonas putida* colonizando raízes de milho permitiu a identificação de traços importantes envolvidos no metabolismo central de carbono e estresse oxidativo, confirmando assim que, apesar de se tratar de uma associação benéfica, as plantas podem responder criando microambientes estressantes para os quais as bactérias precisam estar preparadas (Matilla *et al.*, 2007).

2.3.3 Estudos metagenômicos para *screening* de PGPR em plantas

Apesar das limitações mencionadas sobre métodos cultivo-independentes, os estudos metagenômicos vem adquirindo um papel muito importante na identificação e estudo de comunidades de bactérias associadas a plantas. Esses métodos são baseados no isolamento do DNA total de uma comunidade associada à raiz seguido de sequenciamento de última geração, que pode compreender todo o DNA presente, que depois é montado e anotado, ou pode ser feito a partir de um marcador molecular específico, como o gene 16S para identificação e classificação dos membros da comunidade.

Por exemplo, o estudo metagenômico para caracterização funcional da comunidade endofítica de bactérias que colonizam as raízes de arroz realizado por Sessitsch *et al.* (2012) analisou as sequências metagenômicas obtidas a partir de células endofíticas encontradas na raiz de plantas cultivadas em campo. A análise das sequências foi realizada pela comparação dos domínios proteicos ou análise de similaridade de fragmentos de gene que codificam alguma proteína. Dessa forma, foi possível identificar aqueles genes e vias metabólicas essenciais para o estilo de vida endofítico, confirmando assim que a região interna dos tecidos na raiz constitui um nicho muito rigoroso que precisa de bactérias adaptadas para poder colonizar tais espaços. As características mais proeminentes para uma colonização eficiente foram novamente: síntese de flagelos, enzimas degradativas de polímeros de plantas, sistemas de secreção, aquisição e armazenamento de ferro, *quorum sensing* e detoxificação de espécies reativas de

oxigênio. Além disso, os autores demonstraram que bactérias endofíticas podem estar envolvidas em todas as etapas do processo do ciclo de nitrogênio, pois numerosos domínios estavam envolvidos em processos de fixação, desnitrificação e nitrificação.

Lundberg *et al.* (2012) estudaram o microbioma central de *Arabidopsis thaliana* utilizando mais de 600 plantas cultivadas em dois tipos de solo: Mason Farm (Chapel Hill, North Carolina, USA) e Clayton (Central Crops Research Station, North Carolina, USA). Utilizando a técnica de pirosequenciamento do gene bacteriano do RNA ribossomal 16S, os autores visavam testar a hipótese de que a composição das microbiotas endofítica e rizosférica crescidas em condições controladas e utilizando solos naturais, dependem diretamente do hospedeiro e não do tipo de solo. Surpreendentemente, foi demonstrado que a comunidade de bactérias na rizosfera é extremamente influenciada pelo tipo de solo, e que a colonização endofítica mostrou uma abundância muito pequena de gêneros e uma baixa complexidade quando comparada com a comunidade rizosférica, estando representadas principalmente por actinobactérias.

2.4 Análises proteômicas no estudo de PGPR e interação planta-bactéria

O estudo das interações planta- bactéria a partir de análises proteômicas possibilita o acompanhamento das mudanças que acontecem no perfil proteico de plantas hospedeiras e os seus organismos associados durante a colonização e promoção de crescimento vegetal. Por exemplo, o estudo da análise proteômica da bactéria promotora de crescimento *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonizando duas variedades de cana de açúcar: SP70-1143 (responsiva) e Chunne (não responsiva). Estudos prévios realizados na mesma bactéria já tinham demonstrado a ativação de vias metabólicas envolvidas na promoção de crescimento vegetal e o metabolismo de nitrogênio (Lery *et al.*, 2008). A avaliação do proteoma de ambos (hospedeiro e bactéria) revelou informações muito importantes sobre os mecanismo de adaptação para uma associação endofítica (Lery *et al.*, 2011a).

Além disso, Lery *et al.* (2011b) realizaram a otimização dos protocolos disponíveis para avaliação do perfil de expressão proteômico de *G. diazotrophicus* co-cultivado em cana-de-açúcar, combinando técnicas de marcação com $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, eletroforese em gel unidimensional, marcação metabólica de proteínas e técnicas de

cromatografia líquida acopladas a um analisador de massas por captura de íons acoplado à ESI (ESI-Q-TOF). A partir disso, foi possível separar e caracterizar eficientemente os perfis de expressão de proteínas de cada uma das partes e identificar várias proteínas envolvidas no metabolismo central de *G. diazotrophicus* correspondentes às categorias: metabolismo de carboidratos, metabolismo de nitrogênio, nucleotídeos, modificação e reparo de DNA, e outras proteínas envolvidas na divisão celular, indicando, dessa forma que as bactérias colonizadoras estavam metabolicamente ativas. Também foi possível detectar que várias proteínas envolvidas com a resposta ao estresse já estavam sendo expressas em apenas 24h após o início do experimento de interação das bactérias com a variedade SP70-1143 de cana-de-açúcar (Lery *et al.*, 2011a).

Muitas das proteínas estavam relacionadas ao estresse, como por exemplo DnaK, a chaperona GroEL e fatores de alongamento de tradução. A assistência no enovelamento de proteínas está fortemente envolvida com a resposta ao estresse já que numerosos agentes causadores desses processos são capazes de interferir diretamente com o enovelamento de proteínas. Portanto, o incremento na expressão de chaperonas é esperado para um bom funcionamento celular durante o processo de adaptação sob tais condições. A ativação dessas proteínas demonstra que a interação entre as plantas hospedeiras e microrganismos endofíticos pode ser entendida como um tipo de estresse biótico para ambos os organismos e, portanto, demonstra que a bactéria já se prepara para o contato com a planta e as condições que enfrentará durante a colonização endofítica.

Outras alterações como aquelas envolvidas em mudanças da arquitetura das membranas celulares também foram detectadas durante a interação *G. diazotrophicus*-SP70-1143, especificamente receptores TonB e lipoproteínas da membrana externa. Ambos funcionam no transporte de nutrientes às células. Proteínas associadas à defesa ao estresse oxidativo também tiveram a sua expressão aumentada, entre elas uma álcool-desidrogenase e a 2-oxoglutarato-desidrogenase, que já tinham sido demonstradas por Echave *et al.*, (2003) como essenciais no processo de defesa contra o estresse oxidativo provocado pela colonização. Além disso, foi observado o aumento de expressão da proteína KdpE. Em *E. coli* essa proteína é um ativador transcricional do operon *kdp* ABC que codifica para um sistema de assimilação de potássio de alta afinidade ativado em resposta à altas concentrações de sais (Altendorf, Voelkner e Puppe, 1994). Indicando assim, adaptações da bactéria ao estresse osmótico, uma vez que para poder sobreviver

no interior dos tecidos de cana-de-açúcar as bactérias devem estar adaptadas à alta concentração de sacarose.

3. Influência dos fatores sigma na interação planta-bactéria

Todos os organismos dependem da sua capacidade de responder de forma apropriada às mudanças no seu ambiente ou às variações temporárias das fontes de nutrientes. Tão importante quanto a resposta é a capacidade de reverter estas adaptações. Nesse sentido, as bactérias são um excelente exemplo de como as células realizam tais adaptações (Jaishankar e Srivastava, 2017).

Os fatores sigma são subunidades da enzima RNA polimerase que determinam sua especificidade frente a promotores específicos. Existem vários tipos de fatores sigma em bactérias que podem estar envolvidos na transcrição de genes essenciais (expressão constitutiva), e genes que são regulados sob condições específicas (expressão induzida). Dentre estes destacam-se duas famílias de fatores sigma: a família de fatores Sigma 70 que contém numerosos membros e família Sigma 54 que contém apenas 1 membro (RpoN) (Milcamps *et al.*, 1996).

A família Sigma 70 está dividida em três grupos diferentes que estão funcional e estruturalmente relacionados. O grupo 1 está formado por fatores sigma primários responsáveis pela transcrição da maioria dos genes expressos durante a fase exponencial do crescimento bacteriano os quais são essenciais para a sobrevivência celular, neles se encontram σ^{70} , RpoD, SigA (*Bacillus*). O grupo 2 compreende fatores sigma que são muito similares aos fatores sigma primários enquanto à sequência de aminoácidos, mas não são essenciais para o crescimento, nele se encontram os fatores da fase estacionária: RpoS, σ^{38} . O grupo 3 da família sigma 70 compreende os chamados fatores sigma alternativos. Esse grupo difere significativamente enquanto à sequência de aminoácidos dos fatores primários e controlam a transcrição de regulons específicos. Neste grupo encontram-se: fatores sigma envolvidos na síntese do flagelo (σ^{28} ou FliA, SigD) fatores de resposta ao choque térmico (σ^{32} ou RpoH, σ^B , SigB) e fatores relacionados a esporulação (σ^H ou SpoOH) também em *Bacillus*.

3.1 Fator RpoN e a resposta a limitação de nitrogênio

Em bactérias gram-negativas, o fator RpoN (σ^{54}), trabalhando em conjunto com ativadores transcricionais da superfamília NtrC, ativa uma variedade de genes que são regulados em resposta a estímulos externos. RpoN é necessário para a expressão das vias enzimáticas responsáveis pela assimilação e utilização de nitrogênio, fixação de nitrogênio, transporte de dicarboxilato, degradação de xileno e expressão de hidrogenases (Black e Maier, 1995; Kessler e Witholt, 2001; Macaluso, Best e Bender, 1990).

Alguns estudos já investigaram o papel de RpoN no processo de interação planta-bactéria. Por exemplo, espécies de rizóbios dos gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* possuem um ou mais fatores sigma RpoN e já foi observado que mutantes defectivos na expressão deste são incapazes de fixar nitrogênio na sua forma livre e em associação com plantas (Dombrecht *et al.*, 2002).

A importância do fator RpoN na associação com plantas é ainda mais evidente na bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, um simbiote fixador de nitrogênio que se associa com a soja, e cujo genoma possui duas cópias do fator sigma RpoN. A clonagem e inserção desses genes conseguiram complementar o mutante *rpoN* de *Rhizobium meliloti*, além disso, quando em simbiose cada um dos dois genes era capaz de substituir o outro, e foi demonstrado que o duplo mutante promovia a formação de nódulos, entretanto nenhum deles era capaz de fixar nitrogênio (Kullik *et al.*, 1991).

Na bactéria de vida livre *Azospirillum brasilense* a mutação em *rpoN* aboliu a capacidade de fixar nitrogênio, de assimilar nitrato e amônio; assim como a motilidade (Milcamps *et al.*, 1996).

Por ser um processo que demanda um alto gasto energético, a expressão de genes envolvidos na fixação de nitrogênio é fortemente regulada. Em *H. seropedicae*, a regulação transcricional dos genes *nif* envolve a proteína ativadora de transcrição NifA (Souza, 1991) e o sistema regulador geral de nitrogênio Ntr. A expressão do promotor *nifA* mostrou ser dependente de NtrC e RpoN (σ^{54}) em *H. seropedicae* (Monteiro *et al.*, 2001).

O mutante $\Delta rpoN$ de *Herbaspirillum seropedicae* apresentou uma diminuição na assimilação e fixação de nitrogênio (Gusso *et al.*, 2008). Entretanto, ainda não foi avaliado o transcriptoma desse mutante e o seu desempenho na colonização de plantas.

3.2 Fator RpoH e a resposta ao choque térmico

No meio ambiente flutuações de temperatura são muito comuns, portanto, as bactérias devem responder expressando proteínas chaperonas e proteínas HSP (do inglês *heat shock proteins*) que impedem a desnaturação proteica e auxiliam na adaptação. Em *Escherichia coli*, a expressão dessas proteínas é positivamente regulada pelo fator σ^{32} da RNA polimerase codificado pelo gene *rpoH* (Bukau, 1993).

Alguns dos trabalhos sobre a resposta ao estresse por choque térmico já foram realizados em *H. seropedicae* e organismos que são filogeneticamente próximos, porém mutantes do fator sigma *rpoH* ainda não foram avaliados. Nesse sentido, foi avaliado o proteoma de *H. seropedicae* SmR1 após o choque térmico a 42°C por 30 min (Silveira, 2009). A análise de eletroforese em gel bidimensional revelou 11 spots proteicos com maior abundância nas bactérias submetidas ao choque térmico, os quais se encaixam dentro de 4 proteínas bem definidas: GroEL, GroES, IbpA e GrpE. Essas proteínas atuam no processo de proteção das proteínas e enzimas, evitando a sua desnaturação térmica.

Outro estudo que serve como modelo experimental na avaliação do fator RpoH em *H. seropedicae* foi o realizado por Gunsekere *et al.*, (2006) o qual teve como objetivo identificar genes envolvidos no regulon RpoH na betaproteobactéria *Neisseria gonorrhoeae* a partir de dados transcriptômicos. Para isso, foi realizada a superexpressão, de uma cópia do gene *rpoH* na fase exponencial de crescimento a 37°C. Foi avaliada a resposta ao estresse da bactéria quando submetida a uma temperatura de 42°C por 10 min. A comparação dos perfis transcriptômicos em ambas as condições revelou que a superexpressão de RpoH levou a um aumento na expressão de genes que codificam para chaperonas e proteases envolvidas na homeostase proteica (12 genes). Porém, a comparação do perfil transcriptômico da estirpe selvagem na condição de crescimento padrão versus a mesma estirpe submetida a choque térmico, apontou uma quantidade de genes diferencialmente expressos significativamente maior (24 genes superexpressos e 13 genes reprimidos), o que revela a presença de outros mecanismos de regulação que

podem ser atribuídos a outros fatores de transcrição ou vias de regulação ainda não descritas.

3.3 FliA, regulador da síntese do flagelo e da motilidade

Muitas bactérias possuem motilidade graças à presença de uma estrutura externa denominada flagelo a qual é capaz de dirigi-la na direção dos diferentes sinais ambientais que elas reconhecem. A biossíntese do flagelo precisa da expressão regulada e temporária de um conjunto de genes em uma cascata acoplada aos diferentes sinais externos. Parte de tal regulação se dá pela atividade do fator sigma alternativo FliA (σ^{28} ou σ^F) que se associa a RNA polimerase e transcreve genes que codificam a flagelina e demais proteínas associadas ao flagelo (Eichelberg e Gala, 2000; Helmann, 1991).

O papel da motilidade na colonização de raízes de tomate foi estudado por Misaghi et al., (1992) utilizando estirpes de mutantes não flagelados de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus sp.* Os resultados mostraram uma clara diminuição na capacidade desses mutantes de colonizar o ápice das raízes.

Existem evidências de que a motilidade e a resposta quimiotáxica conferem uma vantagem significativa durante a infecção e a nodulação por rizobactérias. Um estudo comparativo entre mutantes que não apresentavam motilidade e quimiotaxia e a estirpe parental da bactéria *Rhizobium meliloti* mostrou que a nodulação foi mais lenta nos mutantes. Também houve redução da colonização dos mutantes em zonas da raiz que são mais susceptíveis a infecção. Quando as estirpes parental e mutante foram inoculadas juntas, o nódulo apresentava maior quantidade de bactérias parentais do que mutantes defectivos em motilidade e quimiotaxia (Caetano-Anollés et al., 1988).

Estudos sobre colonização em gramíneas de interesse econômico visando a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo foram realizados com *H. seropedicae*. A comparação do transcriptoma de *H. seropedicae* crescendo de forma planctônica e endofítica em raízes de trigo mostrou uma diminuição na expressão dos genes envolvidos na motilidade flagelar nas bactérias colonizando a planta. Essa diminuição provavelmente faça parte da adaptação de um estilo de vida livre ao endofítico. Porém, também foi observado um aumento na transcrição de genes envolvidos na resposta quimiotática, especificamente, genes que codificam para proteínas de

quimiotaxia aceitadoras de metila (MCPs, do inglês *methyl-accepting chemotaxis protein*) (Pankiewicz *et al.*, 2016).

Esse mesmo comportamento na resposta quimiotática foi observado em um outro estudo que comparou o transcriptoma de *H. seropedicae* colonizando milho. As bactérias epifíticas tiveram uma ativação na transcrição de genes da resposta quimiotática quando comparadas com as bactérias planctônicas. Ressalta-se a ativação do gene Hsero_3720 que codifica para uma proteína de quimiotaxia aceitadora de metila (MCP) que parece ser essencial para sensoriar o ambiente ao redor da planta (Pankiewicz, *et al.*, 2016).

Para aprofundar os conhecimentos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na colonização de raízes de milho, outro estudo avaliou os mutantes *fliC Ω nptI* (gene que codifica para a proteína flagelina) e Hsero_3720 Ω nptI comparando as suas eficiências de colonização e capacidade de quimiotaxia. O mutante *fliC Ω nptI* teve motilidade reduzida e somente conseguiu colonizar as raízes quando em agitação. Além disso, a mutação no gene Hsero_3720 levou a uma diminuição na resposta quimiotática provocada por sementes de milho e em direção a fontes de carbono como DL-malato ou D-glucose, (Balsanelli *et al.*, 2016). Porém, não foi demonstrado se a expressão desses genes poderia ser modulada pelo fator sigma FliA, ou se existem mecanismos alternativos que permitam a ativação quando a bactéria se encontra colonizando as raízes de plantas.

3.4 RpoS regulador mestre da resposta ao estresse

RpoS é um fator sigma alternativo que está envolvido na resposta a vários tipos de estresse. O gene *rpoS* que codifica para esse fator de transcrição é expresso durante a fase estacionária e sabe-se que regula ao redor de 360 genes que respondem, por exemplo, as limitações nutricionais, ao estresse por espécies reativas de oxigênio (ROS) e variações de pH (Chiang e Schellhorn, 2010).

Em bactérias, a concentração do fator σ^S permanece relativamente baixa durante a fase de crescimento, aumentando durante a fase estacionária ou quando a célula se encontra em condições de estresse ou inanição. O papel deste é contribuir na sobrevivência e aumentar a resistência a tais condições. Assim, a indução do σ^S ocorre em condições de baixo pH, frio ou calor, danificações ao DNA induzida por luz UV,

limitação de nutrientes, alta densidade celular e alta osmolaridade (Hengge-Aronis, 2002).

Quando submetida a altas temperaturas uma bactéria é capaz de responder com um aumento expressivo na produção de proteases e chaperonas que permitem lidar com as proteínas desnaturadas ou agregadas como consequência do choque térmico, essa resposta é mediada também pelo regulador sigma RpoS (Tanaka *et al.*, 1995).

Num ambiente natural como o dos solos, os organismos se encontram quase sempre em condições de limitação de nutrientes, além de outros tipos de estresse químicos e físicos que resultam num desbalanço do crescimento. Todos esses fatores resultam numa série de mudanças a nível molecular e que podem ser comparadas com as condições encontradas em uma bactéria que se encontra em fase estacionária observada nos perfis de crescimento das bactérias em laboratórios. Numerosos estudos têm demonstrado também a importância do fator sigma RpoS em bactérias promotoras de crescimento vegetal (Mercado-Blanco e Bakker, 2007).

Na bactéria diazotrófica *Azotobacter vinelandii*, a deleção do gene *rpoS* levou a uma diminuição na sobrevivência e a resposta ao estresse gerado por ROS. Também foi demonstrado que a expressão de RpoS pode ser influenciada por mudanças nas fontes de carbono e nitrogênio no meio (Sandercock e Page, 2008).

A resposta ao estresse das bactérias também pode estar envolvida na produção de compostos que promovem o crescimento vegetal. Na bactéria *Pseudomonas putida* GR12-2, foi demonstrado que o fator RpoS e L-triptofano são essenciais para a produção de AIA na fase estacionária de crescimento (Patten e Glick, 2002). Em *A. brasilense*, demonstrou-se a produção de ácido 3-indolacético (AIA) em condições de estresse nutricional e flutuações ambientais, condições nas quais as bactérias estão expostas no solo. Nessa bactéria, o acúmulo de AIA ocorreu no início da fase estacionária e se manteve até a fase de morte, um comportamento observado em outras bactérias promotoras de crescimento vegetal. Porém, *A. brasilense* não possui o fator sigma RpoS e tal atividade foi atribuída, possivelmente, ao fator de transcrição RpoN (Malhotra e Srivastava, 2009).

Em virtude disso, a análise do regulador transcricional RpoS de *H. seropedicae* e o seu papel no processo de resistência ao estresse térmico poderia trazer informações muito importantes sobre como esse regulador ajuda na resistência da bactéria a tal

condição, especificamente, oferecendo uma informação detalhada sobre quais genes estão sob seu controle e como a ausência na modulação desses genes pode influenciar a colonização das plantas por *H. seropedicae*.

4. Metabolismo do PHB e a sobrevivência ao estresse

Rizobactérias estão submetidas a mudanças abruptas das condições ambientais que podem afetar o seu crescimento, precisando assim de mecanismos para se adaptar rapidamente. Além disso, o incremento da concentração ou degradação de um determinado metabólito armazenado pode proteger às bactérias de condições agressivas que levam à desnaturação das proteínas e danos na membrana celular (Silveira *et al.*, 2019), proteger em condições de estresse oxidativo (Okon e Itzigsohn, 1992), e permitir o crescimento celular ainda em condições de limitação de nutrientes (Handrick, Reinhardt e Jendrossek, 2000). Igualmente, a capacidade dos microrganismos de acumular compostos de armazenamento como glicogênio, polifosfatos ou polihidroxialcanoatos (PHA) permite a sobrevivência em ambientes com uma baixa disponibilidade de nutrientes (Kadouri, Jurkevitch e Okon, 2003a).

Os polihidroxialcanoatos são uma família de poliésteres lineares compostos por monómeros de ácidos graxos 3-hidroxi com um tamanho de 4 a 16 carbonos. Esses compostos são acumulados no interior das células na forma de grânulos como uma fonte de reserva em condições de excesso de carbono com limitação de algum outro elemento essencial (Alves *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2004). A proporção de C/N na rizosfera do solo é de ao redor de 20 vezes, o que indica condições ideais para a produção de PHB que pode ser utilizada posteriormente sob condições de limitação de carbono ou alívio do estresse durante a colonização.

Na maioria das rizobactérias, a produção de PHB é realizada através de uma via metabólica de três passos que se inicia com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA realizada pela primeira enzima da via, a acetil-CoA cetotiolase (PhaA) o produto da reação é uma molécula de acetoacetil-CoA que continua o processo para uma redução realizada pela acetoacetil-CoA reductase (PhaB) dando como produto o monômero de 3-hidroxibutiril-CoA que é rapidamente incorporado no polímero em formação pela atividade da PHB sintase (PhaC) (Escapa *et al.*, 2012).

Vários estudos em bactérias promotoras de crescimento vegetal têm apontado o papel fundamental da síntese e degradação de PHB na sobrevivência a diferentes tipos de estresse durante a colonização. Tais estudos são baseados na análise fenotípica de mutantes deficientes na síntese/degradação de PHA. Porém, a complexidade na rede de interação planta-bactéria sugere que mais estudos sejam feitos para conseguir uma análise mais integradora do mecanismo geral da resposta ao estresse e a sua importância durante a colonização em plantas. É sabido que acúmulo, degradação e utilização dos PHAs por bactérias sob tais condições constitui um mecanismo que auxilia no estabelecimento, proliferação, sobrevivência e competição dos organismos num ambiente como o solo onde as fontes de carbono são limitadas (Kadouri, Jurkevitch e Okon, 2003b).

Em *Azospirillum brasilense*, a exposição da estirpe selvagem Sp7 e mutante Δ phaBC a condições de estresse térmico levou a uma diminuição severa da sobrevivência, esse comportamento se repetiu sob estresse por luz UV, choque osmótico por glicerol, dessecação e oxidativo. O mutante também apresentou um fenótipo com maior motilidade do que a estirpe selvagem, mas com uma redução da quimiotaxia aos compostos atraentes obtidos a partir do extrato de sementes de milho (Kadouri, Jurkevitch e Okon, 2003b). Nesse mesmo estudo, os autores também testaram a viabilidade e sobrevivência de bactérias em carregadores de inoculantes, sendo que nos mutantes deficientes no acúmulo de PHB houve uma diminuição da viabilidade quando comparado com a estirpe parental, assim mesmo, os tempos de geração da estirpe Sp7 foram menores que o mutante, o que indica uma melhor utilização de fontes de carbono por parte da estirpe.

Em sistemas heterólogos com *Escherichia coli*, na qual foram incorporadas construções contendo os genes para síntese e degradação de PHB, a modificação genética também levou a um incremento na sobrevivência das bactérias ao choque térmico, radiação UV, pH ácido e pressão osmótica (Kadouri, Jurkevitch e Okon, 2003a).

Em *H. seropedicae*, foi demonstrado que as bactérias quando incubadas em condições de choque térmico (45°C) induzem a degradação dos grânulos de PHB incrementando a concentração de 3-hidroxi-butarato como um mecanismo de defesa para mitigar a desnaturação de proteínas (Alves *et al.*, 2020). Assim, mutantes incapazes de produzir e degradar PHB tiveram uma diminuição significativa na sobrevivência quando comparadas com a estirpe parental SmR1. Os autores também demonstraram que a síntese de PHB por si não é suficiente para ter um efeito protetor no choque térmico, sendo que

o duplo mutante $\Delta phaZ1.2$, impedido de mobilizar o PHB teve a mesma sensibilidade do que o mutante deficiente na produção de PHB.

Outro estudo realizado pelos mesmos autores demonstrou também a importância do acúmulo de PHB no *H. seropedicae* durante a colonização. Revelando que tanto o mutante $\Delta phaC1$, quanto o $\Delta phaP1$, ambos com uma capacidade reduzida de armazenar o polímero, tiveram dificuldades na promoção do crescimento vegetal. Sendo que as raízes de plantas inoculadas com os mutantes tiveram uma diminuição de 20 e 23% do peso seco quando comparadas com raízes de plantas inoculadas com a estirpe SmR1. Apesar dos autores não apontarem diferenças no nível de colonização das raízes, é importante destacar que tais ensaios são realizados em condições controladas e utilizando solo estéril, cabe ainda realizar estudos da avaliação desses mutantes em condições mais parecidas ao ambiente do solo e sob competição com outros microrganismos.

Em *Methylobacterium extorquens*, foi identificado que a mobilização de PHB era essencial para a sobrevivência ao estresse oxidativo durante os primeiros estágios da colonização nas raízes de *Pinus sylvestris* L. graças à ativação da expressão do gene *phaZ* da PHA depolimerase observada mediante ensaios de expressão utilizando proteínas de fluorescência acopladas à promotores de depolimerases e microscopia confocal. Além disso, foi demonstrado que a bactéria é capaz de promover a germinação de sementes e permitir a preservação de tecidos de explantes vegetais em condições *in vitro* graças à produção de compostos de 3-hidroxi-butirato que possuem atividade antioxidante (Koskimäki *et al.*, 2016).

Resultados similares foram reportados em outros trabalhos realizados com *A. brasilense* (Kadouri, Jurkevitch e Okon, 2003b) e *Pseudomonas oleovorans* (Ruiz *et al.*, 2001) onde ambos autores demonstraram que perturbações na produção e degradação de PHB conduziram a um aumento na susceptibilidade a diferentes tipos de estresse incluindo radiação UV, limitação de carbono, choque osmótico e estresse oxidativo.

É aceito então que a presença de PHB em bactérias tem diversos efeitos fisiológicos que agem de forma sinérgica para incrementar a resistência ao estresse nas células, por exemplo, já foi reportado que a hidrólise de PHB ativa a expressão de RpoS, que ativa a expressão de outros genes relacionados ao mecanismos de mitigação do estresse e resposta SOS (Han *et al.*, 2007).

5. Técnicas de marcação genética para avaliar o desempenho de diferentes estirpes bacterianas *ex planta* e *in planta*

Visando desvendar os mecanismos de ação de como as bactérias são capazes de se associar de forma eficiente com as plantas hospedeiras, tem-se observado o aumento do interesse pelo uso de biossensores e ferramentas de marcação que permitam monitorar, manipular e entender detalhes da comunidade de microrganismos presentes no solo (Piccolo, Lo *et al.*, 2010).

Genes repórteres têm sido amplamente utilizados no estudo das interações planta-bactéria, especificamente, aqueles que envolvem a produção de proteínas fluorescentes como GFP pois permitem a visualização rápida e em tempo real das bactérias de interesse, ao mesmo tempo que permitem distingui-lo do restante da comunidade de microrganismos associados à planta. A proteína fluorescente GFP foi isolada da medusa *Aequorea victoria*, e tem sido uma das proteínas de marcação mais revolucionárias desde que sua aplicação como marcador foi publicada (Chalfie *et al.*, 1994). A maior vantagem no uso de GFP e de outras proteínas de autofluorescência como repórter vem do fato de se poder realizar uma análise não invasiva das raízes ou tecidos internos e da ausência de algum substrato, fonte de energia ou tratamento químico prévio para poder realizar as observações. A proteína GFP pode permitir a identificação de células individuais em uma amostra (Bloemberg *et al.*, 2000).

Santos *et al.*, (2017) realizaram a marcação do *A. brasilense* FP2 (estirpe selvagem), e a estirpe HM053 (super excretora de amônio) demonstrando que associações entre genes repórteres e promotores é sumamente importante na determinação e expressão dos traços de colonização em bactérias de interesse. Nesse estudo, foi construído um sistema repórter contendo *gusA* e o gene de resistência a canamicina associado diretamente ao promotor *nifH*, gene que codifica para uma dinitrogenase redutase. Dessa forma, foi possível realizar observações da bactéria durante os diferentes estágios de colonização em plantas e a expressão dos genes da nitrogenase, essenciais para o processo de fixação biológica de nitrogênio em cevada. Os resultados demonstraram que tanto as estirpes FP2 e HM053 eram capazes de colonizar as raízes e o interior dos pelos radiculares das raízes de cevada e ajudar no desenvolvimento a partir da fixação biológica de nitrogênio.

Um outro estudo também com o *Azospirillum brasilense* reportou a introdução de genes de autofluorescência *eGFP* e *mCherry*, a partir de dois plasmídeos com integração genômica nas estirpes Sp245, Sp7 e M40 e no mutante isogênico *hkkB* (histidina quinase) e a sua estabilidade em ensaios de colonização em raízes de trigo. Os resultados foram avaliados utilizando microscopia confocal, e permitiram claramente observar a colonização das diferentes estirpes *in situ* formando microcolônias e biofilmes (Ramirez-Mata *et al.*, 2018).

Os autores foram pioneiros em realizar a construção de uma ferramenta genética em *Azospirillum* sendo que, por se tratar de uma inserção cromossômica, as bactérias puderam ser estudadas *in planta* sem a necessidade de utilizar uma pressão seletiva (antibiótico) o que permitiu também avaliar a eficiência de colonização frente a outras bactérias da rizosfera (Ramirez-Mata *et al.*, 2018).

Outros estudos utilizam as propriedades das proteínas de autofluorescência acopladas a promotores específicos para o estudo de perfil de expressão de um gene da mesma forma que era realizado com as fusões *lacZ*, com a diferença de que é possível observar a expressão em tempo real sem nenhum tratamento prévio. Um exemplo utilizando essa ferramenta foi em *P. fluorescens* CHA0, modelo de endófito com capacidade de produzir compostos com atividade antifúngica como 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), piroluteorina (PLT) e pirrolnitrina (PRN), visando caracterizar a ativação das vias metabólicas envolvidas na síntese destes compostos. Os autores desenvolveram uma série de construções repórter baseadas em variantes fluorescentes estáveis e instáveis de GFP que permitiram acompanhar a síntese a partir da análise de promotores de genes intermediários das vias de síntese de cada um. Dessa forma, descobriram que a síntese de DAPG e PLT é controlada por circuitos de autoindução e que tal mecanismo parece não controlar a produção de PRN (Baehler *et al.*, 2005).

A proteína de fluorescência GFP também tem sido utilizada para avaliar a colonização e formação de nódulos em rizobactérias, assim como a caracterização do perfil de expressão dos genes envolvidos nesse processo (Stuurman *et al.*, 2000). Incluindo estudos combinatórios, onde diferentes estirpes são marcadas com proteínas fluorescentes com diferentes espectros de excitação/emissão permitindo assim identificar de forma separada cada uma delas. Por exemplo, duas estirpes de rizobia (*Rizobium* sp. NGR 234 e *Shinorhizobium fredii* HH103) marcadas com as proteínas eCFP e eYFP

respectivamente, puderam ser avaliadas em condições de competição em nódulos de planta, utilizando microscopia confocal laser. Como cada uma das proteínas tem espectros de excitação e emissão diferentes é possível distinguir as duas comunidades na mesma amostra mesmo que elas estejam ocupando os mesmos espaços (Stuurman *et al.*, 2000).

É importante destacar que para que uma determinada construção fluorescente, ou qualquer outro tipo de marcação, seja utilizada em condições de competição, é necessário determinar se tal adição (seja plasmídeo ou integração genômica) terá ou não um efeito significativo no fenótipo da estirpe. Para isto, geralmente é estudado o perfil de crescimento ou, como demonstrado por Stuurman *et al.* (2000), a capacidade das estirpes marcadas ou não de formar nódulos e as densidades celulares entre a estirpe marcada e não marcada.

6. Técnicas de marcação de fluorescência em *H. seropedicae*

A utilização de marcação de estirpes de *H. seropedicae* para identificar as diferentes etapas do processo de colonização em plantas de interesse comercial já foi reportada. Dessa forma, Schmidt *et al.* (2011) realizaram a avaliação da capacidade de colonização de *H. seropedicae* em plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) utilizando a estirpe RAM4, derivada de *H. seropedicae* SmR1 e marcada com o gene dsRED. Os autores puderam confirmar a colonização de raízes de feijão utilizando microscopia confocal de fluorescência, sendo possível observar bactérias aderidas na raiz após 15 min de contato das raízes com solução de bactérias. As bactérias foram detectadas no interior dos tecidos em até 24h. Os efeitos da inoculação se mostraram negativos nas plantas uma vez que houve diminuição do peso seco da raiz.

A estirpe RAM4 de *H. seropedicae* foi obtida de outro estudo realizado por Monteiro *et al.* (2008) a partir da transformação da estirpe SmR1 com o plasmídeo suicida pUKTandsRED que carrega um transposon mini-Tn5 contendo o gene da proteína de fluorescência vermelha de *Discosoma* sp. (dsRED), expresso de forma constitutiva junto com o gene de resistência a canamicina. Esse estudo permitiu a identificação rápida e eficiente das bactérias marcadas em raízes de milho utilizando microscopia confocal, se

mostrando como uma técnica interessante para a marcação e desenho de experimentos de competição ou o estudo das interações planta-bactéria em outros organismos hospedeiros.

Outro estudo realizado por Balsanelli *et al.* (2014) procurava determinar a importância de exopolissacarídeos no processo de adesão à raiz e outras superfícies. A estirpe selvagem SmR1 e mutante *epsB*⁻ foram marcadas com a proteína GFP por meio de conjugação com *E. coli* S17-1 carregando o plasmídeo pHC60 (Tc^R), sob controle de um promotor constitutivo. Os autores avaliaram a capacidade de adesão às raízes de milho de ambas as estirpes marcadas com GFP, utilizando microscopia confocal fluorescente, mostrando que ambas eram capazes de aderir às epidermes da raiz em números similares sete dias após a inoculação.

Apesar desses trabalhos terem sido pioneiros na utilização de marcação de *H. seropedicae* com proteínas autofluorescentes, cada um deles possui algumas limitações derivadas da técnica empregada. No caso da construção com dsRED associada a um mini-transposon, sabe-se que tal integração acontece de forma aleatória no genoma, portanto pode levar a interrupção de genes importantes para a condição a se avaliar, por exemplo, um traço de colonização. Por outro lado, a expressão em plasmídeo tem a desvantagem de que plasmídeos podem não ser estáveis dentro da bactéria, especialmente na ausência de uma pressão seletiva (antibiótico) o que limita assim, a capacidade de realizar estudos de competição com outros membros da rizosfera ou organismos patogênicos.

Portanto, visando o desenvolvimento de uma técnica de marcação padronizada e com inserção controlada, este estudo propõe a criação de plasmídeos com genes que expressem proteínas fluorescentes e capazes de se inserirem em sítios específicos do genoma. Ao mesmo tempo, a partir da avaliação de diferentes mutantes transformados com variantes desses plasmídeos queremos demonstrar que tais inserções genômica não representam uma carga metabólica desvantajosa para a bactéria durante a sua avaliação em ensaios de colonização. Por se tratar de uma integração genômica estável, a nossa ferramenta poderia ser utilizada também para realizar ensaios em campo já que não é preciso manter a pressão seletiva de um antibiótico para manter a fluorescência.

Neste trabalho, foi realizada a análise transcriptômica comparativa do mutante $\Delta rpoS$ e a estirpe parental SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* em condições de choque térmico (Manuscrito 1). No capítulo referente ao manuscrito 01 da tese, são reveladas as categorias mais importantes de genes diferencialmente expressos entre ambas estirpes em

choque térmico e durante a fase estacionária. O objetivo é entender como mudanças no perfil transcricional entre ambas as estirpes quando submetidas a choque térmico influenciam negativamente na sobrevivência do mutante $\Delta rpoS$ e as implicações disso durante o processo de colonização em plantas. Em seguida, descrevemos a elaboração de uma ferramenta para marcação genômica de *H. seropedicae* com proteínas de fluorescência (Manuscrito 2) mostrando a estabilidade da ferramenta e o perfil de crescimento de diferentes estirpes transformadas com os plasmídeos.

MANUSCRITO 1

Transcriptomic analysis of the $\Delta rpoS$ mutant of *Herbaspirillum seropedicae* in thermal shock: identification of the “core” regulon and its implications in the plant colonization process.

1. ABSTRACT

Efficient plant colonization by plant growth-promoting bacteria (PGPR) requires a rapid and efficient response from bacteria to compete with other microorganisms and adapt to the stressful conditions in the soil and inside plant tissues. Sigma factors are essential for this modulation since they can rapidly activate or repress groups of genes key to responding to a specific condition. The sigma factor RpoS is considered the master regulator of the general stress response in bacteria. The $\Delta rpoS$ mutant of the endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 is sensitive to thermal shock. The comparative transcriptomic profile of the $\Delta rpoS$ mutant against parental strain SmR1 at the onset of the stationary phase and during thermal shock showed an impairment of several genes involved in the DNA repair mechanisms, carbohydrate metabolism, nitrogen-related redox proteins, flagella, chemotaxis, chaperones, and oxidative stress that elucidates the sensitivity phenotype of the mutant strain. Some of the genes inside each category had proven to be essential for efficient plant colonization in other PGPR. Therefore, additional studies will be required to establish the competence phenotype of the $\Delta rpoS$ mutant strain while colonizing plant roots.

2. INTRODUCTION

The ability to respond and adapt to changing environmental conditions is crucial for the growth and survival of bacteria in their natural habitats. One mechanism whereby bacteria respond to these changes is to rewire the transcriptional apparatus by transcribing or “turning on” genes necessary to cope with that condition while repressing or “turning off” genes no longer needed. Among several factors, what determines the transcription or repression of those genes are sigma factors, subunits of the RNA polymerase complex

that confers promoter specificity to RNA polymerase during the early stages of transcription (Núñez *et al.*, 2006).

On bacteria, sigma factors act as positive regulators of gene transcription by controlling RNA polymerase specificity throughout direct binding to a known promoter sequence and the latter formation of the core RNA polymerase complex. Besides the well-known "housekeeping" or vegetative sigma factor σ_{70} , bacteria have many alternative factors that control the transcription of a particular subset of genes involved in the physiological response to a specific condition (Schuster *et al.*, 2004).

In *Escherichia coli* and other proteobacteria, the general stress response is supported by RpoS, an alternative sigma factor of RNA polymerase that plays a central role in responding to heat shock, oxidative stress, pH fluctuations, nutritional limitation, and many other stress conditions. The expression of RpoS is under strict control at transcriptional and post-transcriptional levels (Dong e Schellhorn, 2009a).

RpoS activation allows the cell to become resistant to several stress conditions and starvation. Cross-resistance suggests that many RpoS-dependent genes are transcribed in response to different stress conditions. C-starvation, for example, can lead to protection from pH fluctuations, oxidative stress, high temperature, and osmotic shock. If resistance to each of these stressful conditions depends on overlapping output genes, we can propose the existence of a "core" of induced resistance genes without further specific input (Vijayakumar *et al.*, 2004).

In *E. coli*, the scope of resistance mediated by RpoS is shown when the gene is mutated. For instance, *rpoS* mutants are sensitive to starvation, exposure to hydrogen peroxide, survival at high or low temperatures, low pH, and osmotic stress. Mutant cells change their ability to grow on limiting levels of different carbon sources, fail to accumulate glycogen, and change their ability to form biofilms (Gottesman, 2019).

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic bacteria able to colonize various plants of economic interest and promote plant growth (James *et al.*, 1997). These bacteria possess several genes that determine the endophytic capabilities for effective host colonization. These so-called "colonization traits" regulate the entire process from chemotaxis to effective root entrance and stress resistance (Afzal *et al.*, 2019). Interaction between endophytic bacteria and their hosts causes biotic stress for both parts. Therefore,

bacteria must overcome and adapt to the specific conditions inside the plant tissues (Lery *et al.*, 2011a).

This study aims to unveil the role of the sigma factor RpoS of *H. seropedicae* SmR1 at the onset of the stationary phase and during thermal shock. Information will be valuable for understanding the central core of RpoS-regulated genes and their involvement in the competence during plant colonization.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 **Bacterial strains and growing conditions**

Individual colonies from fresh plates containing *H. seropedicae* SmR1 and the *ΔrpoS* mutant were grown in a 10 mL flask containing 3 mL of liquid NFbHPN-malate medium, containing 37 mM DL-malic acid, 50 mM phosphate solution (KH₂PO₄, K₂HPO₄), 20 mM NH₄Cl and streptomycin (80 μg/mL) at 30°C and 120 rpm. After 48h of growth and two media transfers, saturated cultures were diluted into 60 mL glass flasks containing 10 mL of NFbHPN-malate medium to OD₆₀₀ of 0.05. Biological triplicates of each strain were grown until reaching OD₆₀₀ of 1.2.

3.2 **Thermal shock, RNA purification, library construction and sequencing**

After reaching the expected OD₆₀₀ of 1,2; 5 mL of culture from triplicates were separated for RNA extraction. Samples were labelled as "control condition" kept at 30°C (SmR130 and rpoS30). The remaining volume of the culture was transferred to a 45°C water bath and incubated for 15 minutes (SmR145 and rpoS45). After this, each culture was centrifugated (13,100 x g for 20 s at room temperature), then cells were resuspended in a lysis solution buffer and treated with Trizol® (Thermo Fisher Scientific®) for RNA extraction. According to manufacturer instructions, RNA fractions were treated with DNaseI (Thermo Fisher Scientific®) to eliminate any DNA debris, and rRNA was depleted with Microbe Express Kit (Thermo Fisher Scientific®) before library preparation. Libraries were prepared using Kit Ion Total RNAseq V2 (Thermo Fisher

Scientific®) and sequenced using Ion Proton® Platform (Thermo Fisher Scientific®). Data was storage as FASTQ files.

3.3 Transcriptomic libraries data analysis

All 12 FASTQ files (triplicates of SmR1 and $\Delta rpoS$ before and after thermal shock) were analyzed using the CLC Genomic Workbench v.7.1 software. The following parameters were employed for trimming and mapping each library: sequences with more than 40 bp were considered, each having 90% of alignment to the reference genome and 80% identity to the reference sequence. Differential expression analysis was performed with CLC, and the data exported in .csv format for further analysis.

Differential gene expression analyses were performed using DESeq and EdgeR (Bioconductor Packages for R). Genes considered for further analysis were those with a Log_2 fold change value ≥ 1 and a p-value ≤ 0.05 . Those conditions need to be fulfilled for both packages. Differential analyses were made by comparing the parental and mutant strains at control temperature (SmR1 and $\Delta rpoS$ incubated at 30°C) and after thermal shock (45°C). The list of differentially expressed genes was further divided into categories using the KEGG Mapper - Search Pathway and then classified and presented on tables and heatmaps.

3.4 Motility assay

All strains were grown in NFbHPN-malate medium using the conditions and protocols previously described. After 48 h of growth, 5 μL of saturated cultures from each strain (at approximately OD_{600} of 1.2) were pipetted at the center of plates containing NFbHPN-malate with 0.25% (m/v) agar, and streptomycin (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The plates were incubated for 48 h at 30°C and photographed periodically to follow the formation of halos.

4. RESULTS AND DISCUSSION

We decided to study all possible combinations between strains and conditions of curated libraries, thus, generating different profiles of up- and down-regulated genes. These results are shown in Table 1, where we set each comparisons par and the number of differentially expressed genes that fulfilled statistical significance. These comparisons comprehend different and more specific viewpoints about the whole physiological changes resulting from the lack of *rpoS* sigma factor.

Table 1. Par-comparing between all different set combinations and number of significant genes expressed or repressed.

| Profile comparison | DESeq2 | | Edge R | |
|-------------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
| | Up-regulated | Down-regulated | Up-regulated | Down-regulated |
| RpoS vs SmR1 | 354 | 256 | 404 | 293 |
| RpoS45 vs SmR145 | 269 | 312 | 334 | 369 |
| SmR145 vs SmR1 | 1038 | 797 | 1097 | 838 |
| RpoS45 vs RpoS | 867 | 782 | 1059 | 910 |

In this analysis we will be focusing on the comparison profile among strains before and after heat shock to point out possible gene anomalies related to the *rpoS* deletion aiming to unveil new groups of genes that can be involved in the cross-response of both, the stationary phase adaptation and the heat-shock response. These results are resumed in Table 2, where genes are grouped by their involvement in carbohydrate and nitrogen metabolism, DNA repair mechanisms and flagella/chemotaxis response.

Table 2. List of genes differentially expressed at control condition and heat shock The table shows the Log_2 of differentially expressed genes between SmR1 and $\Delta rpoS$ before and after the thermal shock (45°C).

Genes involved in carbohydrate metabolism.

| <i>Gene</i> ID/old tag | RpoS vs SmR1 | RpoS45 vs SmR145 | Annotation |
|---|----------------------------------|--------------------------------------|---|
| HSERO_RS04830 <i>adhA</i> | 4.99 | 3.84 | alcohol dehydrogenase* |
| HSERO_RS07295 <i>folD</i> | 1.98 | 0.00 | tetrahydrofolate interconversion protein |
| HSERO_RS12510 <i>glgB</i> | -2.20 | 0.00 | 1,4-alpha-glucan branching enzyme |
| HSERO_RS12505 <i>glgX</i> | 0.00 | 1.09 | glycogen debranching enzyme |
| HSERO_RS12030 <i>Hsero_2407</i> | 1.80 | 1.40 | phosphate acetyl/butaryl transferase |
| HSERO_RS20090 <i>Hsero_4020</i> | 0.00 | -1.45 | gluconolactonase |
| HSERO_RS10430 <i>pmrF</i> | -1.30 | 0.00 | glycosyltransferase transmembrane |
| HSERO_RS05545 <i>tktC</i> | 0.00 | 1.12 | transketolase, C-terminal subunit* |
| HSERO_RS08805 <i>tpiA</i> | -1.27 | 0.00 | triosephosphate isomerase |
| HSERO_RS12500 <i>treZ</i> | 0.00 | 1.44 | malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase |
| HSERO_RS18390 <i>ugd</i> | 1.20 | 1.14 | UDP-glucose 6- dehydrogenase |

Genes involved in nitrogen metabolism

| <i>Gene</i> ID/old tag | RpoS vs SmR1 | RpoS45 vs SmR145 | Annotation |
|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|
| HSERO_RS08655 <i>ilvH</i> | -1.06 | 0.0 | acetolactate synthase isozyme III |
| HSERO_RS02805 <i>metE</i> | 0.0 | 1.64 | methionine synthase |
| HSERO_RS18155 <i>narK1</i> | -4.8 | 0.0 | nitrite/nitrate transporter* |
| HSERO_RS18160 <i>narU</i> | -2.6 | 0.0 | nitrite/nitrate transporter* |
| HSERO_RS19570 <i>prsA</i> | -1.9 | -2.19 | phosphoribosylpyrophosphate synthetase |
| HSERO_RS00265 <i>tdcB</i> | -1.3 | 0.0 | threonine dehydratase |
| HSERO_RS10460 <i>thrA</i> | -1.4 | 0.0 | homoserine dehydrogenase |

Genes involved in DNA repair/modifications

| <i>Gene</i> Annotation/old tag | RpoS vs SmR1 | RpoS45 vs SmR145 | Annotation |
|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|
| HSERO_RS12200 <i>polB</i> | 0.00 | -1.08 | DNA polymerase II |
| HSERO_RS18370 <i>dnaX</i> | | -1.04 | DNA polymerase III |
| HSERO_RS00700 <i>rpoA</i> | -1.60 | -2.00 | DNA-directed RNA polymerase alpha chain |

| | | | |
|-------------------------------------|-------|-----|--|
| HSERO_RS13965 <i>recJ</i> | -1.74 | 0.0 | single-stranded-DNA-specific exonuclease |
| HSERO_RS03075 <i>dnaK</i> | 1.67 | | molecular chaperone |

Genes involved in flagella assembly/chemotaxis response

| <i>Gene</i> ID/old tag | RpoS vs SmR1 | RpoS45 vs SmR145 | Annotation |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|--|
| HSERO_RS10180 <i>flgB</i> | -2.79 | 0.0 | Flagellar basal-body rod FlgB |
| HSERO_RS14975 <i>motA</i> | -1.33 | 0.0 | flagellar motor component |
| HSERO_RS10160 <i>fliA</i> | -1.50 | -1.19 | RNA polymerase sigma factor for flagellar operon |
| S/A <i>Hsero_1706</i> | 0.0 | 1.87 | methyl-accepting chemotaxis protein |
| HSERO_RS09765 <i>Hsero_1957</i> | 1.60 | 2.04 | chemotaxis signal transduction protein |
| HSERO_RS10170 <i>Hsero_2031</i> | -2.21 | -1.28 | negative regulator of flagellin synthesis FlgM |
| HSERO_RS10310 <i>Hsero_2059</i> | -1.64 | 0.0 | flagellar M-ring protein FlIF |

4.1 Carbohydrate metabolism:

The gene *adhA* codifies for an alcohol dehydrogenase whose expression was upregulated in the $\Delta rpoS$ mutant at the onset of the stationary phase and after thermal shock. The increased transcription of the *adhA* gene suggests a possible mechanism for bacteria to overcome adverse conditions. Also, we can address that this gene is under negative control by the RpoS sigma factor in *H. seropedicae*. Contrary to the stated by Weber et al. (2005), whose results determined that expression of alcohol dehydrogenase in *Escherichia coli* is positively regulated by RpoS and described this gene as part of the “core” stress response. As a mechanism for stress endurance, activation of alcohol dehydrogenase is fundamental during the stationary phase, where bacteria begin to experience oxidative stress. Correspondingly, Echave et al., 2003 reported that alcohol dehydrogenase *adhE* in *Escherichia coli* is involved in anaerobic glucose degradation. The author also addressed the importance of this enzyme in survival to stress since mutants defective in its expression were susceptible to ROS and showed division defects.

Genes *glgB* and *glgX* are part of the glycogen metabolism in bacteria, transcriptome analyses revealed a mixed behavior of both genes. First, we observed a decreased expression of the 1,4-alpha-glucan branching enzyme codified by the gene *glgB* in the $\Delta rpoS$ mutant at the stationary phase. Then, an increase of the glycogen debranching enzyme codified by *glgX* in the same mutant exposed to thermal shock. The synthesis of glycogen is vital for bacteria since it works as a mechanism to overcome carbon limitation. For instance, *E. coli* accumulate glycogen which acts as a carbon reserve during starvation. Glycogen accumulation requires the stationary sigma factor RpoS (Dong e Schellhorn, 2009a; Sharma *et al.*, 2010).

Although, we cannot address exactly the role of *tktC* (codes for the transketolase C terminal unit) since its expression only appeared augmented at the mutant *rpoS* facing thermal shock. In general, transketolases catalyze the transfer of the glycolaldehyde moiety from a ketose or its phosphate to an aldose or its phosphate. The enzyme is found in animals, plants, and bacteria and is involved in the pentose phosphate pathway responsible for NADPH production and several sugar phosphate intermediates such as ribose-5 phosphate, erythrose 4-phosphate, and sedoheptulose-7-phosphate (Iida, Teshiba e Mizobuchi, 1993). Several studies showed that genes involved in the pentose phosphate seem to be positively controlled by RpoS (Dong e Schellhorn, 2009b; Weber *et al.*, 2005). Comparisons of the transcriptomic profile of *Escherichia coli* K-12 and its $\Delta rpoS$ mutant growing in minimal media showed several pathways upregulated on the parental strain, including the pentose phosphate pathway represented by the genes *tktB* and *talA*.

Overall, σ^S seems to influence the energy metabolism and appears as a crucial element in the transition from growth to maintenance metabolism in stressed or stationary cells. Such genes involved in glycolysis, fermentation, anaerobic respiration, electron transport and the pentose phosphate shunt seem to be under positive control by RpoS (Weber *et al.*, 2005). Also, intermediates of the pentose phosphate pathway serve as precursors for the biosynthesis of aromatic amino acids and heptoses found in lipopolysaccharides (Vijayakumar *et al.*, 2004).

4.2 Nitrogen metabolism

In *H. seropedicae*, the *nark/narU* genes encode the nitrate/nitrite antiporter elements from the major facilitator superfamily. This superfamily is essential for nitrate assimilation, representing an alternative mechanism for nitrogen scavenging, a terminal electron acceptor, or reducing equivalents. The last feature might be the most important since *H. seropedicae* cannot grow anaerobically using nitrate as an electron acceptor (Bonato *et al.*, 2016).

Several studies showed that expression of nitrate and nitrite reductases are positively regulated by σ^S , and they have an essential role in the dissipation of redox power (Chang *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2005). Previous studies on *H. seropedicae* colonizing maize roots showed the expression of these genes in roots as an unexpected feature that the authors later confirmed because of $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ released by the plant. Indeed, in acidic environments or presence of ammonium, plant nitrate efflux can be higher than influx (Balsanelli *et al.*, 2016). Therefore, impairment of this system might limit the ability of bacteria to colonize roots efficiently.

Genes *ilvH*, *tdcB* and *thrA* were downregulated in the $\Delta rpoS$ mutant at the onset of the stationary phase. These genes are involved in the synthesis of amino acids. The *ilvH* is involved in valine, leucine, and isoleucine biosynthesis, while *tdcB* and *thrA* are involved in the glycine, serine, and threonine biosynthesis. It has been suggested that cells continue to produce proteins at stationary phase by reusing amino acids from degraded proteins. Therefore, these metabolic pathways were shown to be active in the stationary phase (Jaishankar e Srivastava, 2017). Some of the genes involved in the amino acid biosynthetic pathway such as *argH* and *aroM* have been identified as RpoS-regulated genes in *E. coli* using random *lacZ* fusion mutagenesis (Vijayakumar *et al.*, 2004).

4.3 DNA repair/modification

In *E. coli*, *dnaX* codify for a subunit of the DNA polymerase III, a prerequisite for core dimerizing and binding of the Υ -complex (Zou e Dybvig, 2002), while *polB* codifies for a DNA polymerase essential for DNA repair and mutagenesis caused by stress. Both elements were confirmed by several studies to be part of the SOS response of bacteria and to be under the control of the RpoS sigma factor (Battesti, Majdalani e Gottesman, 2011b; Chiang e Schellhorn, 2010). The study of the SOS response induction in *E. coli*

by mitomycin C showed that RpoS is essential for the activation of *polB* (Dapa *et al.*, 2017). Therefore, both genes have a decrease in the expression, indicating that mutant $\Delta rpoS$ has an impairment of its SOS response, which explains the limitations of survival under thermal shock.

4.4 Flagella and chemotaxis

Transcriptome analysis of the mutant $\Delta rpoS$ showed a mixed response on elements involved in motility and chemotaxis. Genes involved in motility *flgB*, *motA*, and *fliA* presented a decreasing in expression during the stationary phase and thermal shock. While chemotaxis genes *Hsero_RS09765*, *Hsero_RS08450*, and *Hsero_RS21115* were overexpressed under both conditions (see complementary information).

The *fliA* gene encodes for the sigma factor σ^{28} , considered the master regulator of motility and flagellar synthesis. Overall, studies in the literature show that RpoS regulates negatively the expression of genes involved in chemotaxis and flagellum synthesis, with mutants showing an increase in expression of these genes as a result of the deletion of the sigma factor (Li *et al.* 2015; Peano *et al.* 2015; Weber, *et al.* 2005). To unveil the exact phenotype of the $\Delta rpoS$ of *H. seropedicae*, we performed a motility assay comparing the growth of strains SmR1, $\Delta rpoS$ and the motility-defective mutant $\Delta fliA$ in semisolid media (Figure 2). The results showed that $\Delta rpoS$ mutant did not exhibit impaired motility abilities; on the contrary, *rpoS* mutation leads to an augmented motility phenotype.

Motility is one of the most extensively studied cellular events conducted by bacteria, including *E. coli*. A motility agar plate assay showed that deletion of the *rpoS* gene enhanced the apparent motility of the *E. coli* BW25113 strain, which inherently had negligible motility compared to wild-type *E. coli* strains, such as MG1655; and this mutation does not affect cell growth. This enhancement of motility was the consequence of a drastic up-regulation of genes involved in the formation and rotation of flagella. In agreement with this finding, enhanced motility in a soft agar plate assay was observed after deleting the *rpoS* in *E. coli* MG1655 (Ojima *et al.*, 2012).

Tn-seq analysis of *H. seropedicae* colonizing *Setaria viridis* roots revealed that genes related to motility/chemotaxis such as *flgB*, *motA* and **Hsero_2059** brought a colonization advantage. Others, such as *recJ* proved to be essentials for efficient

colonization (Do Amaral *et al.*, 2020). In our analysis, genes related to flagella biosynthesis and motility such as *fliA* showed a decrease expression in the RpoS mutant; even though this strain showed an augmented motility when compared to wild type SmR1. Also, in the $\Delta rpoS$ mutant the gene *recJ* showed a two-fold decrease in expression at the stationary phase, raising the hypothesis that its expression might be partially dependent on RpoS.

Previous work in *H. seropedicae* showed that mutant *fliA* cannot colonize *Setaria viridis* plant endophytically. This mutant is non-motile and produces 20% less PHB than SmR1 strain (Alves et al. 2019).

Likewise, chemotaxis response has proven to be an important trait in efficient colonization, the presence and expression of diverse MCPs during maize root colonization by *H. seropedicae* SmR1 suggest the possibility of an adaptation for motility towards the host plant in response to different signals such as: carbon sources, oxygen, and pH gradients (Balsanelli et al. 2016b).

For the second part of the analysis, genes are grouped in three categories: 1) chaperones, 2) oxidative phosphorylation, and 3) adaptation to different environments. Results are shown as heatmaps (**Figure 1**) with all four combinations of transcriptomic comparisons: SmR1 with and without thermal shock (S45 vs. S30), $\Delta rpoS$ with and without thermal shock (R45 vs. R30), $\Delta rpoS$ mutant and parental strain SmR1 on thermal shock (R45 vs. S45) and finally SmR1 and $\Delta rpoS$ at the stationary phase (R30 vs. S30). The selection of these categories was because these new candidates represent genes involved in heat shock endurance that also proved essential for colonization in plant roots. For the complete list of differentially expressed genes, please go to the complementary information of this article.

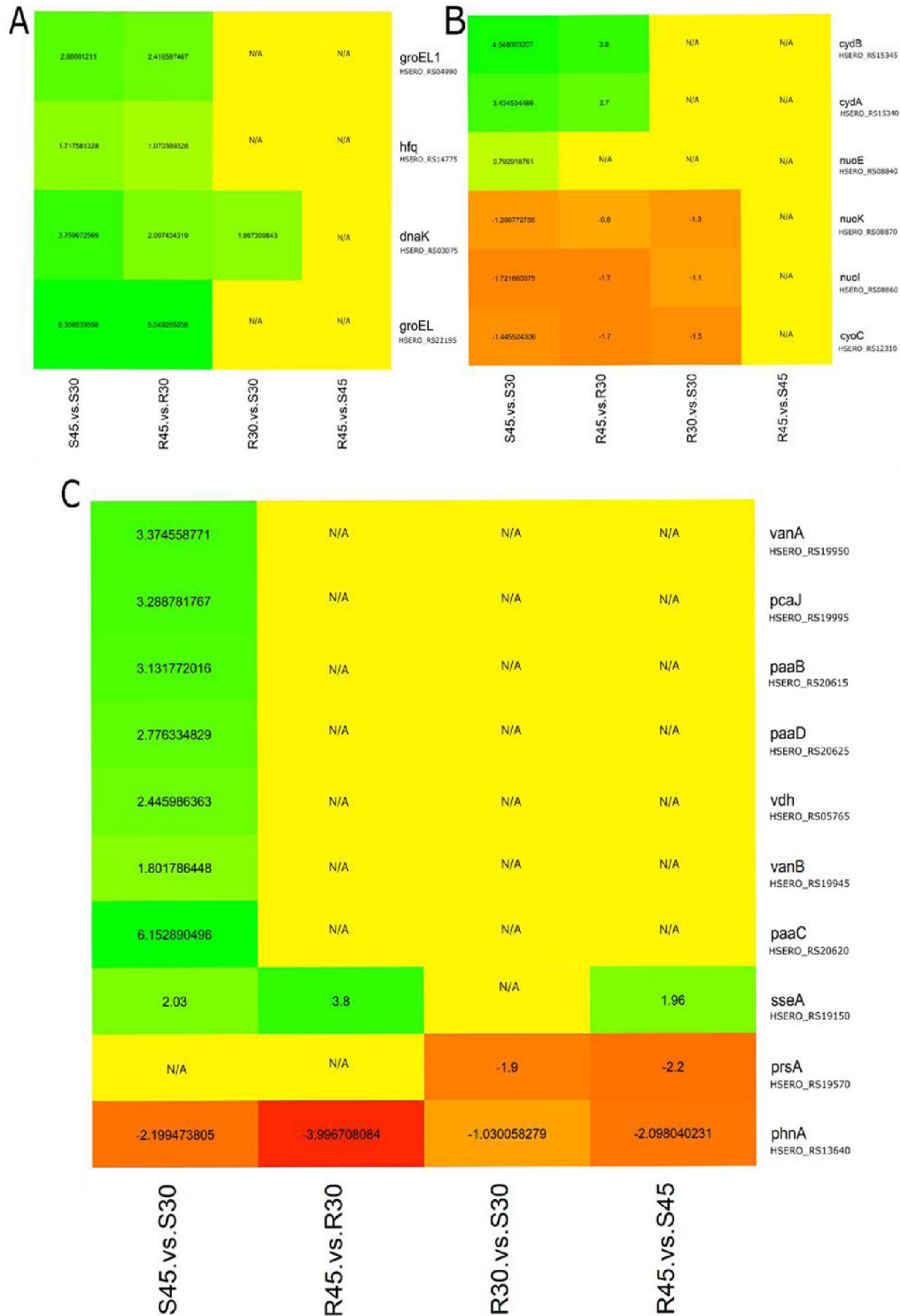


Figure 1. Heatmap of differentially expressed genes for gene categories. A) chaperones, B) Oxidative phosphorylation, and C) metabolism in different environments. S30 represents SmR1 at 30°C, R30 the mutant $\Delta rpoS$ at 30°C, S45 SmR1 at 45°C and R45 $\Delta rpoS$ at 45°C In this case, all combinations of transcriptome comparisons are being evaluated to show the importance of some genes directly or indirectly affected by the RpoS absence.

4.5 Chaperones

All chaperones (*groEL1*, *hfq*, *dnaK*, and *groEL*) had their expression levels upregulated in both parental strain and the $\Delta rpoS$ mutant when subject to thermal shock. Although it was possible to notice minor differences in the levels of expression between wild type and mutant, that way revealing that RpoS is only one of the members among several other factors or activation proteins involved in the response to heat shock and that all these elements act in a synergistically way to help bacteria survive. The role and significance of these chaperones and their importance will be explained further.

Hfq is a protein involved in post-transcriptional gene regulation in many bacteria species. Inactivation of the *hfq* gene in *E. coli* led to a pleiotropic phenotype, indicating that this protein is involved in the expression control of several aspects of bacterial metabolisms, such as RNA silencing mediated by sRNA (small RNA) in prokaryotes. Hfq regulates gene expression by several mechanisms, such as favoring the interaction between regulatory sRNA and its target mRNA, promoting either mRNA stability or degradation depending on the specific target, changing the accessibility of target RNA to RNAses, binding and promoting base pairing between the regulatory sRNA and the target mRNA, which can cause repression and activation of the mRNA (Kadowaki *et al.*, 2012).

Mutation of the *hfq* gene caused pronounced pleiotropic phenotypes in *E. coli* K-12, including decreased growth rates and yields, decreased negative supercoiling of plasmids in the stationary phase, increased cell size, osmosensitivity, increased oxidation of carbon sources and increased sensitivity to ultraviolet light (Tsui, Leung e Winkler, 1994).

The transcription level of *dnaK* appeared upregulated in the *rpoS* mutant of *E. coli* grown in minimal medium during the stationary phase. Many genes involved in protein synthesis, modification and proper folding were also expressed higher in the wild type (Dong e Schellhorn, 2009a). Also, in *E. coli*, DnaK is involved in the post-transcriptional regulation of σ^S by interfering with the degradation of this sigma factor during heat shock response. Therefore, DnaK increases the level of RpoS and favors transcription of other stress-related genes (Muffler *et al.*, 1997).

The roles of DnaK and RpoS were assayed in *E. coli* by evaluating deleted mutants of *rpoS* and *dnaK* in starvation-induced thermotolerance studies. Examination of the

thermotolerance on each of these strains indicates that DnaK and RpoS play distinct roles in starvation-induced resistance to heating. For example, in bacteria under carbon starvation, DnaK deficiency reduced RpoS levels threefold, while DnaK excess increased RpoS levels nearly twofold. Elimination of either *dnaK* or *rpoS* in otherwise isogenic strains, results in the severe thermal killing of glucose-starved cells. However, wild-type cells exhibited only slight reductions in viable counts after the 45°C heat-shock treatment (Rockabrand *et al.*, 1998).

The higher expression of chaperones and proteases in bacteria at the onset of the stationary phase is required to ensure the proper assembling of stationary phase proteins and to recycle unfolded proteins as nutrients. An attenuated ability to express chaperones and proteases in the $\Delta rpoS$ mutant may be responsible for the reported increased cell death during the late exponential phase (Dong e Schellhorn, 2009a).

Studies in the literature report differences between the influence of RpoS on the level of expression of chaperones. In some cases, bacteria showed an increased expression of these proteins at the stationary phase or when subjected to other stressful conditions. While other studies showed that deletion of RpoS did not affect significantly the expression of *groEL*, whose expression levels were up-regulated at the onset of thermal-shock (Weber *et al.* 2005), another study showed that deletion of the RpoS sigma factor in *Burkholderia pseudomallei* significantly affected the expression of chaperone *groES* (Osiriphun *et al.*, 2009).

4.6 Oxidative phosphorylation

Genes *nuoE*, *nuoI* and *nuoK* are all members of an operon that codifies the components of the NADH-dehydrogenase complex in bacteria. The expression of these genes appeared downregulated in both $\Delta rpoS$ mutant and parental strain *SmR1* at thermal shock; although, we observed a mild effect of repression in the $\Delta rpoS$ mutant in some of these genes. In *E. coli*, 14 genes constitute the *nuo* operon encoding the subunits of the enzyme NADH : ubiquinone oxidoreductase or NADH dehydrogenase (Zambrano e Kolter, 1993). They also show homology to the eukaryotic mitochondrial complex (Calhoun *et al.*, 1993). Previous studies on NADH dehydrogenases in *E. coli* show that

two distinct, membrane-bound NADH dehydrogenases are present (Anraku e Gennis, 1987).

Both NADH dehydrogenases are part of the respiratory chain of *E. coli*, and Nuo is involved in the generation of the proton motive force. This proton motive force is employed for ATP synthesis, supporting the active transport of nutrients and ATP-dependent rotation of the flagella.

The role of the *nuo* genes as a colonization trait was mentioned by Dekkers *et al.* (1998) while studying the colonization efficient of several Tn5-mutants of *P. fluorescens* WCS365 in a gnotobiotic system in tomato roots. One of the mutants identified as PCL1201 carried a mutation that matched the Nuo4 protein in *E. coli*, and it was defective in root tip colonization in competition with the parental strain not only in the gnotobiotic system but also in soil. Also, the growth of mutant PCL1201 while competing with *P. fluorescens* WCS365 (wild type) in oxygen-poor King B liquid medium appeared reduced. The authors hypothesized that this limitation for growing in low-oxygen environments could lead to the low rhizosphere fitness of mutant PCL1201, considering that bacteria at the root tip grow under oxygen limitation (Dekkers *et al.*, 1998).

Genes *cydA* and *cydB* encode for subunits 1 and 2 of the cytochrome bd-type quinol oxidase, a respiratory chain branch that transfers the electrons to oxygen. This branch of the respiratory electron chain is less efficient when compared to the *bc₁/aa3* branch but has proven to be important for respiration under hypoxia conditions in the pathogenic bacterium *Mycobacterium tuberculosis* (Forte *et al.*, 2013). Cytochrome bd can also play a role in the protection against different types of stress. In *E. coli*, exposure to exogenous hydrogen peroxide and nitric oxide induced the expression of cytochrome bd, and strains lacking these genes were hypersensitive to both stressors (Borisov *et al.*, 2013; Forte *et al.*, 2013; Giuffrè *et al.*, 2012).

4.7 Metabolism under different environments

Genes *vanA* and *vanB* are members of an operon involved in the metabolism of vanillate, one of the soluble phenolic lignin monomers; both genes had an incremented expression only in the wild-type strain SmR1 in response to thermal shock. So far, there is no information available regarding the role of these genes in heat shock endurance or

other types of stresses in bacteria. Although, degradation of vallinate as a carbon source is essential for most soil-dwelling organisms. *Bradyrhizobium japonicum* is a symbiotic nitrogen-fixing soil bacterium able to metabolize low concentrations of aromatic compounds such as vanillate aerobically, and contains the genes *vanA1B* and *pcaG1H1*. Disruption of both genes in *B. japonicum* led to an impairment of growth in minimal media containing vanillate as the sole carbon source (Sudtachat *et al.*, 2009).

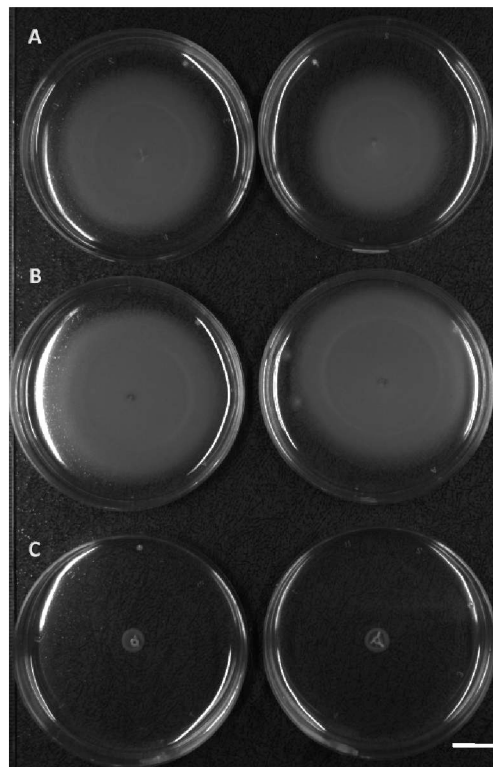


Figure 2. Soft agar motility profile of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (A), $\Delta rpoS$ (B) and $\Delta fliA$ (C) on semi-solid media after 48h of growing. Five μL of previously grown culture were inoculated in the center of plates containing NFbHPN-malate and agar (0.25 m/v). Biological duplicates were tested for each strain, plates were incubated at 30°C for 48h.

Several studies have already established the importance of the RpoS sigma factor as a colonization trait. Stockwell and Loper studied the role of sigma RpoS in *P. fluorescent* Pf-5 survival in the rhizosphere of soybean. This study established that the sigma factor RpoS as a key determinant in the fitness of *P. fluorescens* in the rhizosphere of plants in the field. Furthermore, *rpoS* proved an essential role in the survival of bacterial cells exposed to starvation, freezing, desiccation, and UV irradiation. Therefore

it is not surprising that *rpoS* is required for optimal survival of Pf-5 strain on surfaces of seeds (Stockwell and Loper, 2005).

All the information here discussed may indicate that the RpoS sigma factor of *H. seropedicae* controls several genes involved in the SOS response of bacteria, and most of the genes involved are prevalent among other species. To validate these results, we repeated the experiment using the same conditions and extracted new RNA samples that will be used for validation via RT-qPCR using twelve genes (six repressed and six overexpressed) from the previous analysis. The analysis is still under execution; if confirmed, results on differentially expressed genes during heat shock might extend to the defense of other types of stress such as oxidative, osmotic, and other abiotic or biotic stresses. Some of the genes discovered in the analysis, particularly those involved in chemotaxis, chaperones, DNA repair mechanism, nitrite/nitrate metabolism, and carbon metabolism, seem important for *H. seropedicae* competence during the colonization of plants. To confirm this, we suggest evaluating the performance of $\Delta rpoS$ colonizing a plant model to determine its relevance.

MANUSCRITO 2

Development of a fluorescence-labelling tool for site-directed integration and identification of different strains of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.

1. ABSTRACT

The study of bacteria-plant interactions can be assayed using several methods. One of them involves mutating and tagging several microorganisms and evaluating its ability to colonize roots and other tissues inside the host plant efficiently. Recognition of a specific strain either alone or during competition requires a rapid and efficient method of bacteria tagging that allows separating that organism from the rest of the community and simplifies its observation using microscopic techniques. Here, we describe a rapid and efficient tagging method based on an integrative plasmid containing a fluorescent label with proteins super folder GFP and dsRED for *Herbaspirillum seropedicae*. The results showed that the plasmids were inserted into the expected sites in the chromosome and were stable during several generations. The plasmids insertions had no interference on *H. seropedicae* growth and did not cause a burden due to reporter expression.

2. INTRODUCTION

Plants rely on beneficial interactions with their microbiota for nutrient availability, growth promotion and suppression of diseases. The plant interior, referred to as the endosphere, has been shown to contain a distinct microbiome that is less diverse than those from the rhizoplane (the root surface) and the rhizosphere (the narrow zone of soil subject to the influence of living roots). Microorganisms that colonize the endosphere are referred to as endophytes. These include all organisms that colonize internal plant tissues for all or part of their lifetimes (Persello-Cartieaux, Nussaume e Robaglia, 2003).

Several features make *Herbaspirillum seropedicae* a suitable model endophyte: i.e. (i) as a diazotrophic bacteria can fixate nitrogen and can be later assimilated by the

plant, (ii) is genetically tractable, (iii) has a mechanism of plant growth promotion other than nitrogen fixation, (iv) it has a wide range of plant host, (v) culturable bacteria are only present inside the plant, (vi) its genome is publicly available (Rosconi *et al.*, 2016).

Endophytic colonization by *H. seropedicae* begins with the attachment of bacteria to the root surface, followed by colonization at the emergence points of lateral roots through discontinuities of the epidermis (Schmidt *et al.*, 2011). To describe and efficiently understand the details of this process is essential to develop tools that allow observing in situ colonization without affecting the structure of the root tissues (Ramirez-Mata *et al.*, 2018).

The tagging of *H. seropedicae* with autofluorescent proteins has allowed the visualization of the colonization steps in several plants, such as common bean (Schmidt *et al.*, 2011) and maize (Balsanelli *et al.*, 2014) through confocal microscopy. Both studies employed different tagging strategies that involved either random insertion by a transposon or a fluorescent protein gene-carrying plasmid.

Therefore, we aim to describe a new and efficient tool for bacteria tagging containing different autofluorescence proteins based on a specific-targeted genetic insertion plasmid. This method can be helpful to perform colonization assays using different strains of *H. seropedicae* or evaluate the competition of bacteria in a non-sterile environment against other members of the soil rhizosphere.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 Strains and Growth Conditions

All *Escherichia coli* strains were grown in lysogenic broth (LB) at 37°C and 120 rpm. *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 and its mutants were all grown in NFb-HPN medium containing 37 mM DL-malic acid, 50 mM phosphate solution, 20 mM NH₄Cl and streptomycin (80 µg/mL), on a rotatory shaker at 30°C and 120 rpm.

3.2 Plasmid cloning and bacterial conjugation:

Plasmid pCH03 and pCH04 derived from pBluescript KS (+) after insertion of a Kanamycin/Neomycin cassette and a target sequence from *H. seropedicae* SmR1 genome. These target sequences were selected for site-specific integration via homologous recombination once the plasmid is conjugated into *H. seropedicae*.

For pCH03 plasmid, the target sequence was a 500 bp fragment derived from the *rhaS*, encoding for a rhamnose transporter (HSERO_RS22225) essential for incorporation and metabolization of rhamnose. The fragment was cloned and inserted between the *XhoI* and *KpnI* sites in the plasmid. Whereas the pCH04 plasmid contained a 500pb fragment of the *gp18* gene (an inactive prophage, HSERO_RS01070) cloned with the same restriction sites and inserted in the same region instead.

Each plasmid contains only one of the fluorescent protein constructions (sfGFP or dsRED) inserted between the *EcoRI-PstI* sites. Each protein construct contains a promoter, a RBS, the ORF of the fluorescent protein, and a double terminator. These elements were obtained from the iGem Registry of Standard Biological Parts. All of them were described in Table 2, and a schematic representation of the assembled fluorescent part and plasmids is presented in Figure 1.

Table 2. Biobrick parts employed for the construction of fluorescent plasmid derived from pCH03 and pCH04.

| Name | Biobrick CODE | Part Description/Function |
|---------------|---------------|---|
| J23119 | BBa_J23119 | Member of a family of constitutive promoter parts isolated from a small combinatorial library. J23119 is the "consensus" promoter sequence and the strongest member of the family |
| RBS | BBa_B0034 | RBS based on Elowitz repressilator (Elowitz e Leibier, 2000). |
| sfGFP | BBa_I746916 | Coding sequence of superfolder GFP Max excitation. 498 nm. , max emission. 513 nm. |
| dsRed | BBa_K1323009 | Coding sequence from DsRED_T3, highly fluorescent version originally found in <i>Discosoma</i> spp., codon optimized for <i>Staphylococcus aureus</i> |

| | | |
|--------------------------|-----------|--|
| | | excitation. 548 nm. , max emission. 562 nm. |
| Double terminator | BBa_B0015 | a composite terminator made by joining 2 other terminators, one derived from <i>E. coli</i> (BBa_B0010) and the other from the T7 phage. |

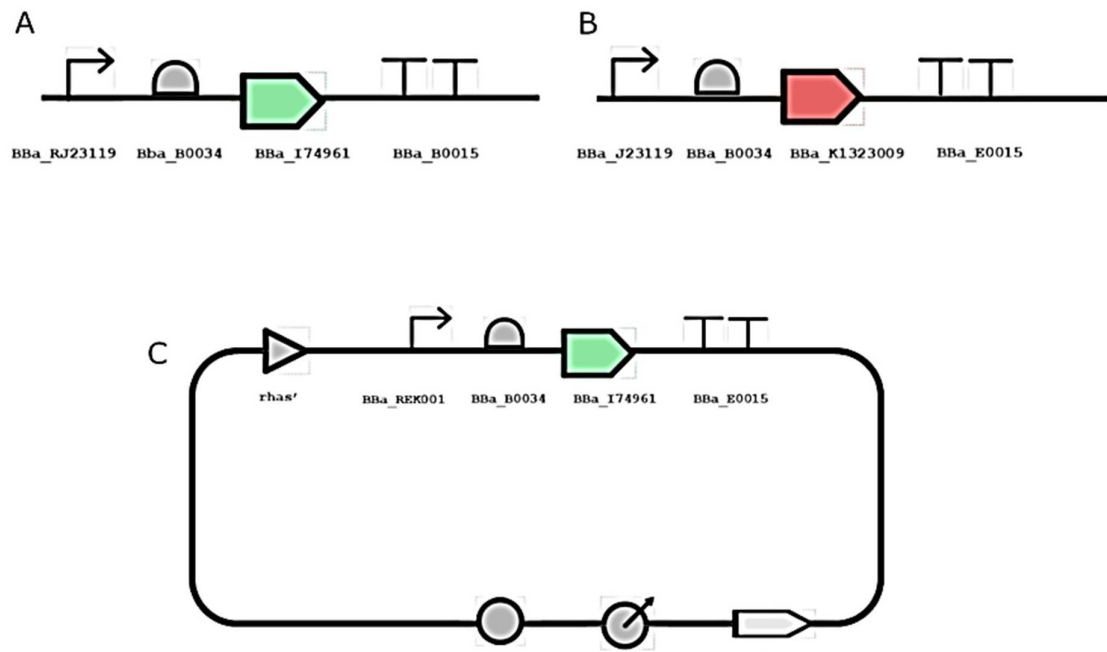


Figure 1. SBOL representation of biobrick constructions. A) containing a CDS for superfolder-GFP, B) containing the CDS of the dsRED protein, and C) the pCH03-SFGFP plasmid containing regions *rhaS'* for recombination in *Herbaspirillum seropedicae*, and Km/Neo resistance cassette as a selection mark.

All constructions were transformed separately into *E. coli* S17-1 and transferred into SmR1 and its isogenic mutants by bi-parental mating. Colonies were selected in plates containing NFb-HPN with streptomycin (80µg/mL), nalidixic acid (5µg/mL) and kanamycin (500µg/mL). Single recombinants containing the fluorescent construction were also screened for fluorescence by placing the plate on the E-Gel® iBase™ Power System and selecting only those with visible fluorescence.

3.3 Growing curves and plasmid stability

Strains derived from *H. seropedicae* SmR1 conjugated with plasmids pCH04 containing either super folder GFP or dsRED were grown in NFb-HPN medium under standard conditions: 30°C and 120 RPM. Except for this time, overnight cultures were diluted to OD₆₀₀ 0,1 in 3mL of the medium, divided into 0,2 mL aliquots, and transferred to a 96-well plate for OD measurement. Five samples (technical duplicates) from each strain were assayed for 12 h. Biological duplicates from each strain were assayed and their growth profiles were compared against its non-transformed wild-type strain SmR1.

For plasmid stability experiments, super folder GFP and dsRED tagged strain SmR1 were grown on NFb-HPN medium containing streptomycin (80 µg/mL) and Kanamycin (500 µg/mL) in duplicates. Each duplicate was used to inoculate bacteria on fresh Nfb-HPN medium containing only streptomycin (non-selective medium) or kanamycin/streptomycin (selective medium). Successive inoculations were made using the same medium each day for seven days and culture aliquots were collected on days: 1, 3, 5, and 7, used for serial dilutions, and plated in NFb-HPN plates with streptomycin, bacteria were screened for fluorescence using the E-Gel® iBase™ Power System and photographed to compare the number of fluorescent or non-fluorescent colonies at each dilution.

3.4 *In vitro* competition

Parental strain SmR1 and the isogenic derived $\Delta rpoN$ bot containing the pCH04-sfGFP plasmid (tagged strains) and their non-transformed counterpart were tested for the ability to compete under low -nitrogen concentration by growing both strains together in NFb-HPN medium containing only 5mM NH₄Cl, 50 mM phosphate solution and streptomycin (80 µg/mL).

For the experimental design, 10 mL cultures were prepared on glass flasks containing both strains, the combinations tested were (SmR1-tagged vs. $\Delta rpoN$ and SmR1 vs. $\Delta rpoN$ tagged), strains were dilute to an initial concentration of OD₆₀₀ 0,05 (starting OD₆₀₀ 0,1 when combined). Samples were taken at times: 0, 6, and 10 hours, followed by serial dilutions and plating.

Since the total CFU number would not allow quantification of the exact amount of each strain, plates were screened for fluorescence by placing them on the E-Gel® iBase™

Power System. Therefore, the GFP-tagged colonies from one strain were separated from the total count, and the remaining number represent the amount of non-fluorescent colonies. These combinations were assayed to determine if the GFP-tagging imposes a metabolic burden on bacteria that can significantly alter their phenotype.

3.5 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R statistical analysis tools, the growth rate was calculated for each strain according to (Hall et al., 2014), treating each technical and biological duplicate as a single curve for calculation. Complementary statistics were performed using the Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) between each plasmid-containing strain against the non-conjugated (control). For in vitro competition, CFU values of each strain were compared using the Mann-Whitney U Statistic test for each interval, at times 0, 6, and 10 hours.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary results showed that the integration of plasmids containing the autofluorescence protein sfGFP or dsRED is stable. After seven days of reinoculation in media with no selective pressure by antibiotics, all bacteria remained fluorescent as seen in Figure 2.

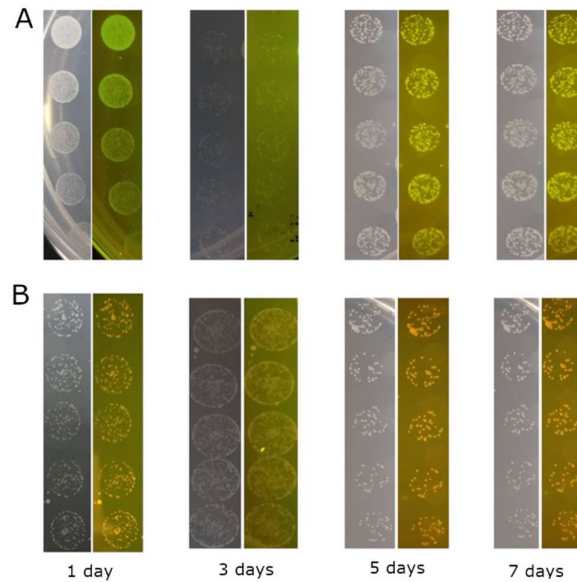


Figure 2. Plasmid stability of parental strain SmR1 tagged with both plasmids. A) pCH04-SFGFP and B) PCH04-dsRED and cultivated during seven days with streptomycin as the sole antibiotic (non-selective condition).

Some studies have questioned the use of chromosomal insertion for fluorescent tagging. One study in *A. brasilense* highlighted the disadvantages of *Tn5* transposons or other vector-mediated chromosomal insertions used for stably labeled strains. They stated that these insertion sites cannot always be fully controlled and may produce deleterious mutations. Therefore, they proposed the plasmid pBBR1-GFP originally derived from pBBR1, a small (2,6 kb) broad-host-range plasmid consisting of two functional cassettes (the replication and the mobilization regions) containing a GFP construction under a constitutive promoter. Stability assays containing these constructions proved no phenotypic trait that might represent a selective advantage or disadvantage for bacteria. However, after 50 generations of growth without any antibiotic pressure, the authors demonstrated recovering up to 60% of bacteria expressing GFP (Ramos *et al.*, 2002). In contrast, our method allows us to recover 100% of bacteria expressing fluorescence after seven days without any selective pressure, as shown in Figure 2.

To evaluate the effect of the insertion in the metabolism of bacteria, we decided to test for differences in growth in individual strains marked with the different plasmids and compare them to the unmarked ones, as the results show in Figure 3.

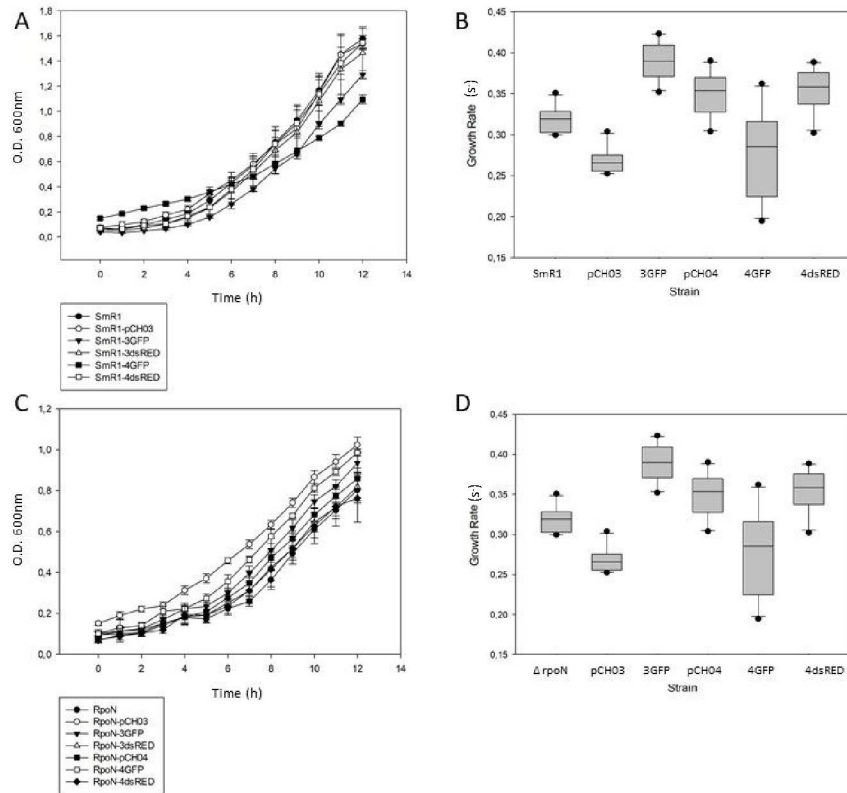


Figure 3. Growth curves of strain SmR1 (A) and mutant $\Delta rpoN$ (C) containing either plasmid pCH03 or pCH04 and its respective fluorescent variant. OD_{600} values from point 7h to 10h were considered for growth rate calculations, box plot of growth rates from SmR1 (B) and mutant $\Delta rpoN$ (D) are shown.

Although there were some statistical differences in the growth rate among the conjugated strains compared to the non-conjugated parental strain, the growth differences did not affect the metabolism of tagged bacteria to the point of causing an impairment that can significantly reduce their fitness during a competition assay (figure 4).

To further investigate this, we evaluated the competition of the strains in vitro by co-inoculating strain SmR1 and the mutant $\Delta rpoN$ (a mutant defective on the sigma factor RpoN, responsible for the metabolism of nitrogen in bacteria) together in a growth media containing only 5 mM of NH_4Cl (1/4 of the regular amount used) the results are showed in Figure 4.

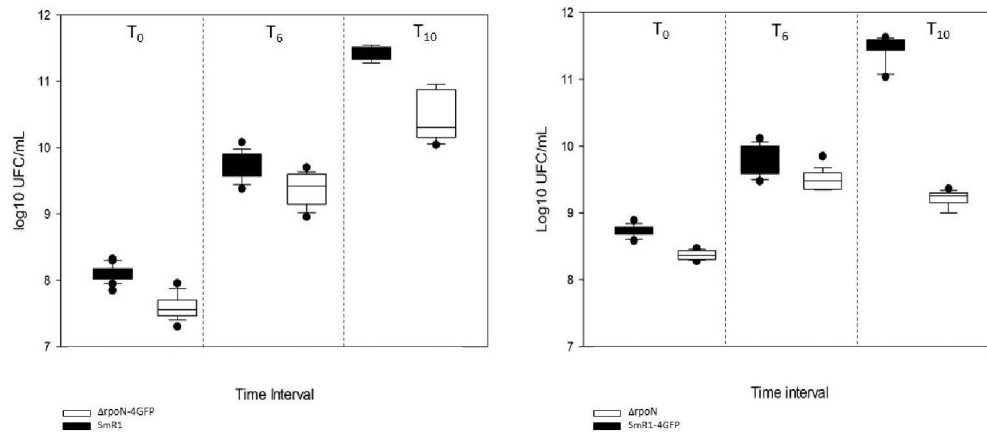


Figure 4. Competition assay under nitrogen limitation. UFC counts of strains SmR1 (black) or $\Delta rpoN$ (white) were taken at three different time-intervals during growth.

As shown in figure 4, after ten hours of growth, there were significant differences in the abundance of the $\Delta rpoN$ mutant in both conditions tested. Therefore, proving that GFP tagging does not impose a shift on the outcome during in-vitro competition assays. It is important to stress that the dsRED constructions still need to be assayed under the same conditions. Also, as a tool for bacteria tagging, the pCH03 constructs represent an alternative with great potential to be employed in vitro experiments. Although, it might have some constraints during colonization assays since mutation of the *rhaS* gene disables the bacteria from using rhamnose as a carbon source.

Together, the information gathered so far proves that our strategy is suitable for studying *H. seropedicae* colonization dynamics and competition, although we still need to prove that insertion of the plasmid targeted the genes proposed for recombination. For this, PCR studies need to be performed. Also, colonization assays in plants combined with confocal microscopy will allow us to prove that these constructions are sufficient for identifying bacteria in these environments.

CONCLUSÕES

O mutante *ArpoS* de *Herbaspirillum seropedicae* apresenta um fenótipo sensitivo quando submetido ao choque térmico pelo comprometimento das funções metabólicas relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo tais como: enzima álcool desidrogenase (*adhA*), enzimas do metabolismo da síntese/degradação de açúcares (*glgB/glgX*, *tktC*). Genes do sistema respiratório de nitrato (*narK/narU*). Fosforilação oxidativa (operon *nuo* e *cydA/cydB*). Assim como genes envolvidos nos mecanismos de reparação do DNA (*dnaX*, *polB*) e proteínas de choque térmico (*groEL*, *hfq*, *dnaK*).

O mutante *ArpoS* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 apresenta uma motilidade aumentada, quando comparada com a estirpe parental, mesmo quando análise de transcriptôma mostrou alguns genes envolvidos na motilidade com a sua expressão diminuída.

A utilização de plasmídeos de integração contendo proteínas de autofluorescência SFGFP e dsRED representa um mecanismo eficiente para marcação de *H. seropedicae* smR1 e os seus mutantes.

As construções se mostraram estáveis dentro das bactérias sendo mantidas sem nenhuma pressão seletiva e ainda foi corroborada a inserção dirigida na construção com pCH03-SFGFP.

As construções podem ser utilizadas para realização de ensaios de competição in vitro com estirpes marcadas diferencialmente.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar a validação do transcriptoma através de ensaios de RT-PCR.

Realizar a avaliação dos ensaios de competição in vitro usando construções com GFP e dsRED junto e comparar com estirpes não marcadas.

Realizar a validação da inserção dirigida dos plasmídeos com as construções pCH04 e com a proteína dsRED.

Realizar ensaios de colonização em plantas das estirpes parental e muntantes de *H. seropedicae* SmR1 marcadas com as proteínas de autofluorescência para conseguir determinar fenótipos menos competitivos.

REFERÊNCIAS:

- AFZAL, I. *et al.* **Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants** *Microbiological Research* Elsevier GmbH, , 1 abr. 2019.
- AGTUCA, B. J. *et al.* In-situ metabolomic analysis of *Setaria viridis* roots colonized by beneficial endophytic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 33, n. 2, p. 272–283, 2020.
- ALTENDORF, K.; VOELKNER, P.; PUPPE, W. The sensor kinase KdpD and the response regulator KdpE control expression of the kdpFABC operon in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 145, n. 5–6, p. 374–381, 1 jan. 1994.
- ALVES, L. P. S. *et al.* Backup Expression of the PhaP2 Phasin Compensates for phaP1 Deletion in *Herbaspirillum seropedicae*, Maintaining Fitness and PHB Accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–13, 20 maio 2016.
- ALVES, L. P. S. *et al.* Importance of Poly-3-Hydroxybutyrate Metabolism to the Ability of *Herbaspirillum seropedicae* To Promote Plant Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, n. October 2018, p. 1–14, 2019.
- ALVES, L. P. S. *et al.* 3-Hydroxybutyrate derived from poly-3-hydroxybutyrate mobilization alleviates protein aggregation in heat-stressed *herbaspirillum seropedicae* SmR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 17, p. 1–13, 2020.
- AMARAL, F. P. DO *et al.* Diverse bacterial genes modulate plant root association by beneficial bacteria. **mBio**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2020.
- ANRAKU, Y.; GENNIS, R. B. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, n. C, p. 262–266, 1 jan. 1987.
- BAEHLER, E. *et al.* Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 24–38, 2005.
- BALSANELLI, E. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2233–2244, 2010.
- BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; PANKIEVICZ, VÂNIA C S;

et al. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M. Z.; FAORO, H.; PANKIEVICZ, VÂNIA C.S.; *et al.* Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016.

BALSANELLI, E. *et al.* Exopolysaccharide Biosynthesis Enables Mature Biofilm Formation on Abiotic Surfaces by *Herbaspirillum seropedicae*. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 10 p.

BARAC, T. *et al.* Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 583–588, 11 maio 2004.

BARRET, M.; MORRISSEY, J. P.; O’GARA, F. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 7, p. 729–743, 2011.

BASSLER, B. L. Small Talk. **Cell**, v. 109, n. 4, p. 421–424, 17 maio 2002.

BASTIÁN, F. *et al.* Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 1, p. 7–11, 1998.

BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v. 65, p. 189–213, 2011a.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 557–574, 2001.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. **Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria** **Biocontrol Science and Technology**, 2001.

BHARDWAJ, D. *et al.* Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 66, 2014.

BLACK, L. K.; MAIER, R. J. IHF- and RpoN-dependent regulation of hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 405–

413, 1 maio 1995.

BLOEMBERG, G. V *et al.* Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: New perspectives for studying microbial communities. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 11, p. 1170–1176, 2000.

BODDEY, R. M. *et al.* Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *In: Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems*. [s.l.] Springer Netherlands, 1995. v. 174p. 195–209.

BONATO, P. *et al.* RNA-seq analyses reveal insights into the function of respiratory nitrate reductase of the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2677–2688, 2016.

BORISOV, V. B. *et al.* Cytochrome *bd* oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: An additional defense against oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 587, n. 14, p. 2214–2218, 11 jul. 2013.

BOWERS, J. H.; PARKE, J. L. Colonization of pea (*Pisum sativum* L.) taproots by *Pseudomonas fluorescens*: Effect of soil temperature and bacterial motility. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 12, p. 1693–1701, 1 dez. 1993.

BUKAU, B. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 671–680, 1 ago. 1993.

CAETANO-ANOLLÉS, G. *et al.* Role of Motility and Chemotaxis in Efficiency of Nodulation by *Rhizobium meliloti*. **Plant physiology**, v. 86, n. 4, p. 1228–35, 1988.

CALHOUN, M. W. *et al.* Energetic efficiency of *Escherichia coli*: Effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 10, p. 3020–3025, 1 maio 1993.

CANARINI, A. *et al.* Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. February, 21 fev. 2019.

CARVALHO, T. L. G. *et al.* Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-

leguminous plants. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 561–574, 2016.

CATALÁN, A. I. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1352–1357, 2007.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. **Plant and Soil**, v. 184, n. 2, p. 311–321, 1996.

CHALFIE, M. *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802–805, 1994.

CHANG, L. *et al.* Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. **Molecular Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 756–766, 1999.

CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E. Evolution of the RpoS regulon: Origin of RpoS and the conservation of RpoS-dependent regulation in bacteria. **Journal of Molecular Evolution**, v. 70, n. 6, p. 557–571, 2010.

CHISHOLM, S. T. *et al.* Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803–814, 2006.

COMPANT, S. *et al.* **Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects** *Applied and Environmental Microbiology*, 2005.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

CONIGLIO, A. *et al.* *Azospirillum* as Biofertilizer for Sustainable Agriculture: *Azospirillum brasilense* AZ39 as a Model of PGPR and Field Traceability. p. 45–70, 2019.

DALL'ASTA, P. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* promotes maize growth but fails to control the maize leaf anthracnose. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 1, p. 167–176, 2019.

DAPA, T. *et al.* The SOS and RpoS regulons contribute to bacterial cell robustness to genotoxic stress by synergistically regulating DNA polymerase pol II. **Genetics**, v. 206, n. 3, p. 1349–1360, 2017.

DEKKERS, L. C. *et al.* Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (nuo) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 8, p. 763–771, 1998.

DING, T.; MELCHER, U. Influences of plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0150895, 14 mar. 2016.

DOMBRECHT, B. *et al.* Prediction and overview of the RpoN-regulon in closely related species of the Rhizobiales. **Genome Biology**, v. 3, n. 12, p. RESEARCH0076, 2002.

DONG, T.; SCHELLHORN, H. E. Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 281, n. 1, p. 19–33, 2009a.

DONG, T.; SCHELLHORN, H. Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 281, n. 1, p. 19–33, 9 jan. 2009b.

DUIJFF, B. J. *et al.* Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, n. 9, p. 903–910, 1998.

ECHAVE, P. *et al.* Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 32, p. 30193–30198, 2003.

EICHELBERG, K.; GALA, J. E. The Flagellar Sigma Factor FliA (σ^{28}) Regulates the Expression of III secretion System. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2735–2743, 2000.

ELBELTAGY, A. *et al.* Endophytic Colonization and in Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3–12, p. 5285–5293, 2001.

ELOWITZ, M. B.; LEIBIER, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. **Nature**, v. 403, n. 6767, p. 335–338, jan. 2000.

FARRAR, K.; BRYANT, D.; COPE-SELBY, N. **Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: Plant growth promotion in energy crops** **Plant Biotechnology Journal**, 2014.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 352–386, 1994.

FORTE, E. *et al.* **Cytochrome bd oxidase and hydrogen peroxide resistance in Mycobacterium tuberculosis** **BioAmerican Society for Microbiology**, , 17 dez. 2013. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/>>. Acesso em: 4 abr. 2021

GAMALERO, E. *et al.* Methods for Studying Root Colonization by Introduced Beneficial Bacteria. *In: Sustainable Agriculture*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. v. 23p. 601–615.

GARBEVA, P. *et al.* Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 4, p. 369–383, 2001.

GERMAINE, K. *et al.* Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 109–118, 2004.

GIUFFRÈ, A. *et al.* Cytochrome bd oxidase and nitric oxide: From reaction mechanisms to bacterial physiology. **FEBS Letters**, v. 586, n. 5, p. 622–629, 9 mar. 2012.

GOTTESMAN, S. Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 31, p. 11685–11700, 2019.

GUNSEKERE, I. C. *et al.* Comparison of the RpoH-dependent regulon and general stress response in *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 13, p. 4769–4776, 2006.

GUSSO, C. L. *et al.* Effect of an ntrC mutation on amino acid or urea utilization and on nitrogenase switch-off in *Herbaspirillum seropedicae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 235–239, 2008.

HAN, Y. *et al.* Comparative transcriptomics in *Yersinia pestis*: a global view of environmental modulation of gene expression. **BMC microbiology**, v. 7, p. 96, 2007.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; JENDROSSEK, D. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5916–5918, 2000.

HELMANN, J. D. **Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression** **Molecular Microbiology**, 1991.

HENGGE-ARONIS, R. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ^S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 373–395, 2002.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. **Journal of Biotechnology**, v. 106, n. 2–3, p. 169–178, 19 dez. 2003.

IIDA, A.; TESHIBA, S.; MIZOBUCHI, K. Identification and characterization of the *tktB* gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5375–5383, 1993.

IMAM, J.; SINGH, P. K.; SHUKLA, P. Plant microbe interactions in post genomic era: Perspectives and applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–15, 2016.

JAISHANKAR, J.; SRIVASTAVA, P. Molecular basis of stationary phase survival and applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–12, 2017.

JAMES, E. K. *et al.* *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.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization Involvement of the Reserve Material Poly- γ -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244–3250, 2003a.

KADOWAKI, M. A. S. *et al.* Structural characterization of the RNA chaperone Hfq from the nitrogen-fixing bacterium *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Biochimica et**

Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, v. 1824, n. 2, p. 359–365, 2012.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 97–104, 2001.

KIELY, P. D. *et al.* Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 257–266, 2006.

KLASSEN, G. *et al.* Nitrogenase activity of *Herbaspirillum seropedicae* grown under low iron levels requires the products of *nifXorf1* genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 255–259, 2003.

KNIEF, C.; DELMOTTE, N.; VORHOLT, J. A. Bacterial adaptation to life in association with plants - A proteomic perspective from culture to in situ conditions. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3086–3105, 2011.

KOSKIMÄKI, J. J. *et al.* Methyl-esterified 3-hydroxybutyrate oligomers protect bacteria from hydroxyl radicals. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 332–338, 14 mar. 2016.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. *et al.* Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244–1251, dez. 2004.

KULLIK, I. *et al.* *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the *rpoN* gene (*rpoN*). **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 3, p. 1125–1138, 1991.

LERY, L. M. S. *et al.* Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 5, p. 562–576, maio 2011b.

LERY, L. M. S. *et al.* Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. **Proteomics**, v. 8, n. 8, p. 1631–1644, 2008.

LERY, L. M. S. *et al.* Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 5, p. 562–576, maio 2011a.

- LEVY, A. *et al.* Genomic features of bacterial adaptation to plants. **Nature Genetics**, v. 50, n. 1, p. 138–150, 2018.
- LI, L. *et al.* Transcriptomic changes of *Legionella pneumophila* in water. **BMC genomics**, v. 16, p. 637, 2015.
- LODEWYCKX, C. *et al.* Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583–606, nov. 2002.
- LOPER, J. E.; HENKELS, M. D. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5357–5363, 1 dez. 1999.
- LU, X.-Y. *et al.* Molecular cloning of polyhydroxyalkanoate synthesis operon from *Aeromonas hydrophila* and its expression in *Escherichia coli*. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 5, p. 1332–6, 2004.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 541–556, 2009.
- LUNDBERG, D. S. *et al.* Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 86–90, 1 ago. 2012.
- MA, Y. *et al.* Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. **Journal of Environmental Management**, v. 174, p. 14–25, 1 jun. 2016.
- MACALUSO, A.; BEST, A. E.; BENDER, R. A. Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 7249–7255, 1 dez. 1990.
- MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 73–80, 2009.
- MATILLA, M. A. *et al.* Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, p. 1–13, 2007.
- MERCADO-BLANCO, J.; BAKKER, P. A. H. M. Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: Exploiting bacterial traits for crop protection. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 92,

n. 4, p. 367–389, 2007.

MILCAMPS, A *et al.* The *Azospirillum brasilense* rpoN gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 5, p. 467–78, 1996.

MILIUTE, I. *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 102, n. 4, p. 465–478, 30 nov. 2015.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165–199, 28 out. 2001.

MISAGHI, I. J. *et al.* The importance of rhizobacterial mobility in biocontrol of bacterial wilt of tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 287–293, 1992.

MITTER, B. *et al.* Comparative genome analysis of Burkholderia phytofirmans PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. April, p. 1–15, 2013.

MONTEIRO, R. A. *et al.* Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v. 508, n. 1, p. 1–4, 2001.

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

MORAIS, R. F. DE *et al.* Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 23–34, 14 jul. 2012.

MUFFLER, A. *et al.* Heat shock regulation of $\sigma(S)$ turnover: A role for DnaK and relationship between stress responses mediated by $\sigma(S)$ and σ^{32} in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 445–452, 1997.

NOTZ, R. *et al.* Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain *cha0* in the rhizosphere. **Phytopathology**, v. 91, n. 9, p. 873–881, 2001.

NÚÑEZ, C. *et al.* DNA microarray and proteomic analyses of the RpoS regulon in *Geobacter sulfurreducens*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 8, p. 2792–2800, 2006.

OJIMA, Y. *et al.* Motility behavior of rpoS-deficient *Escherichia coli* analyzed by individual cell tracking. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 6, p. 652–

656, 2012.

OKON, Y. Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 9, p. 223–228, 1985.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in Azospirillum brasilense and the ecological role of PHB in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Letters**, v. 103, n. 2–4, p. 131–139, 1992.

OSIRIPHUN, Y. *et al.* Identification and characterization of RpoS regulon and RpoS-dependent promoters in Burkholderia pseudomallei. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 6, p. 3118–3131, 2009.

PANKIEVICZ, V. C. S. *et al.* Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907–919, 2015.

PANKIEVICZ, V. C. S. *et al.* RNA-seq transcriptional profiling of Herbaspirillum seropedicae colonizing wheat (Triticum aestivum) roots. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 589–603, 2016.

PANKIEVICZ, V. C.S. *et al.* RNA-seq transcriptional profiling of Herbaspirillum seropedicae colonizing wheat (Triticum aestivum) roots. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 589–603, 2016.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Regulation of indoleacetic acid production in Pseudomonas putida GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. **Canadian journal of microbiology**, v. 48, n. 7, p. 635–642, 2002.

PEANO, C. *et al.* Characterization of the Escherichia coli σ (S) core regulon by Chromatin Immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq) analysis. **Scientific reports**, v. 5, n. April, p. 10469, 2015.

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

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, n. 2, p. 189–199, 2003.

PHILIPPOT, L. *et al.* **Going back to the roots: The microbial ecology of the**

rhizosphere **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 23 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro3109>>. Acesso em: 16 mar. 2021

PICCOLO, S. LO *et al.* Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 161–167, 2010.

RAMIREZ-MATA, A. *et al.* Versatile use of *Azospirillum brasilense* strains tagged with egfp and mCherry genes for the visualization of biofilms associated with wheat roots. **Microbiological Research**, v. 215, n. March, p. 155–163, 2018.

RAMOS, H. J. O. *et al.* Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the gfp and gusA genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 243–252, 2002.

RASMUSSEN, S.; PARSONS, A. J.; NEWMAN, J. A. **Metabolomics analysis of the *Lolium perenne*-*Neotyphodium lolii* symbiosis: More than just alkaloids?** *Phytochemistry Reviews*. **Anais...**2009

ROCKABRAND, D. *et al.* Roles of DnaK and RpoS in starvation-induced thermotolerance of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 846–854, 1998.

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

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

ROSCONI, F. *et al.* 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, p. 6664–6671, 15 nov. 2016.

RUIZ, J. A. *et al.* Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p.

225–230, 2001.

SANDERCOCK, J. R.; PAGE, W. J. RpoS expression and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* during carbon and nitrogen diauxic shifts. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 946–953, 2008.

SANTOS, A. R. S. *et al.* Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422–426, 2017.

SCHMIDT, M. A. *et al.* Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 182–185, 2011.

SCHUSTER, M. *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 973–985, 2004.

SESSITSCH, A. *et al.* Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 1, p. 28–36, 13 jan. 2012.

SÉVENO, N. A.; MORGAN, J. A. W.; WELLINGTON, E. M. H. Growth of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and the dynamics of HHL and phenazine production in liquid culture, on nutrient agar, and on plant roots. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 4, p. 314–324, 2001.

SHARMA, P. *et al.* Proteomic analysis of streptomycin resistant and sensitive clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proteome Science**, v. 8, n. 1, p. 59, 2010.

SHIDORE, T. *et al.* Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 2775–2787, 2012.

SILVEIRA, G. L. L. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM EXPRESSÃO INDUZIDA POR CHOQUE TÉRMICO EM *Herbaspirillum seropedicae*. 2009.

SIMONS, M. *et al.* Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 9, n. 7, p. 600–607, 1 set. 1996.

SMALLA, K. Culture-Independent Microbiology. **Microbial Diversity and Bioprospecting**, p. 88–99, 9 abr. 2014.

SOUZA, E. M. Sequence and structural organization. v. 278, n. 1991, 1991.

STOCKWELL, V. O.; LOPER, J. E. The sigma factor RpoS is required for stress tolerance and environmental fitness of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Microbiology**, v. 151, n. 9, p. 3001–3009, 2005.

STUURMAN, N. *et al.* Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 11, p. 1163–1169, 2000.

SUDTACHAT, N. *et al.* Aerobic vanillate degradation and C1 compound metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5012–5017, 2009.

SUN, L.; WANG, X.; LI, Y. Increased plant growth and copper uptake of host and non-host plants by metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, n. 5, p. 494–501, 3 maio 2016.

TANAKA, K. *et al.* Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing σ_{38} (the rpoS gene product). **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 5, p. 827–834, 11 mar. 1995.

TING, A. S. Y.; MAH, S. W.; TEE, C. S. Detection of potential volatile inhibitory compounds produced by endobacteria with biocontrol properties towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 229–235, 2011.

TIRAPELLE, E. F. *et al.* Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 - Old Partners, New Players. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

TSUI, H.-C. T.; LEUNG, H.-C. E.; WINKLER, M. E. Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 35–49, 1 jul. 1994.

TURNBULL, G. A. *et al.* The role of motility in the in vitro attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 1, p. 57–65, 5 mar.

2006.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

VIJAYAKUMAR, S. R. V. *et al.* RpoS-regulated genes of Escherichia coli identified by random lacZ fusion mutagenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 24, p. 8499–8507, 2004.

WANG, X. *et al.* Type II toxin/antitoxin MqsR/MqsA controls type V toxin/antitoxin GhoT/GhoS. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1734–1744, 2013.

WEBER, H.; POLEN, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, VOLKER F.; *et al.* Genome-wide analysis of the general stress response network in Escherichia coli: σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1591–1603, 2005.

WEBER, H.; POLEN, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, VOLKER F.; *et al.* Genome-wide analysis of the general stress response network in Escherichia coli: σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1591–1603, 2005.

WEERT, S. DE *et al.* Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by Pseudomonas fluorescens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 11, p. 1173–1180, 1 nov. 2002.

WEGER, L. A. DE *et al.* Flagella of a plant-growth-stimulating Pseudomonas fluorescens strain are required for colonization of potato roots. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2769–2773, 1987.

YOUNG, J. M. Biocidal activity in plant pathogenic Acidovorax , Xanthomonas spp . **Journal Of Applied Bacteriology**, v. 84, n. 2, p. 263–271, 1998.

ZAMBRANO, M. M.; KOLTER, R. Escherichia coli mutants lacking NADH dehydrogenase I have a competitive disadvantage in stationary phase. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5642–5647, 1 set. 1993.

ZAREI, M. *et al.* Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native Serratia marcescens B4A. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1017–1029, 2011.

ZOU, N.; DYBVIG, K. DNA Replication, Repair and Stress Response. *In: Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. [s.l: s.n.]. p. 303–321.

APÊNDICE

1. Comparação do perfil de crescimento das estirpes mutantes ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1.2$) com a estirpe parental SmR1 em meio NFbHPN-malato.

A continuação algumas das análises complementares realizadas durante a execução do meu doutorado, essas análises são de caráter exploratório e visavam estabelecer uma conexão entre o comportamento in vitro dos diferentes mutantes de *H. seropedicae* SmR1 avaliados sob diferentes condições de crescimento e estresse e as limitações que eles poderiam apresentar durante o processo de colonização em plantas. Assim, foram avaliados o crescimento em condições padrão de temperatura e meio nutritivo, limitação de fonte de nitrogênio, avaliação de estresse oxidativo por adição de metilviologênio e choque térmico.

Para o crescimento das estirpes de *H. seropedicae* SmR1 e os seus diferentes mutantes isogênicos ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1.2$) foram utilizadas colônias frescas e isoladas em placas, as colônias foram inoculadas em cultura líquida contendo meio NFbHPN-malato, 50 mM de misturas de fosfatos (159,4 g/L KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4) 20 mM de NH_4Cl e incubadas a 30°C e 120 RPM de agitação. Após 24h de incubação, as estirpes foram reinoculadas novamente em meio fresco por mais 24h e depois utilizadas como pré-inóculos para os ensaios de curva de crescimento, a avaliação do perfil foi realizada sob as mesmas condições temperatura e agitação descritas previamente. A DO_{600} das bactérias foi medida durante 12h em intervalos de 1h, os ensaios foram realizados em triplicata biológica. Os resultados do perfil de crescimento são mostrados na Figura 1.

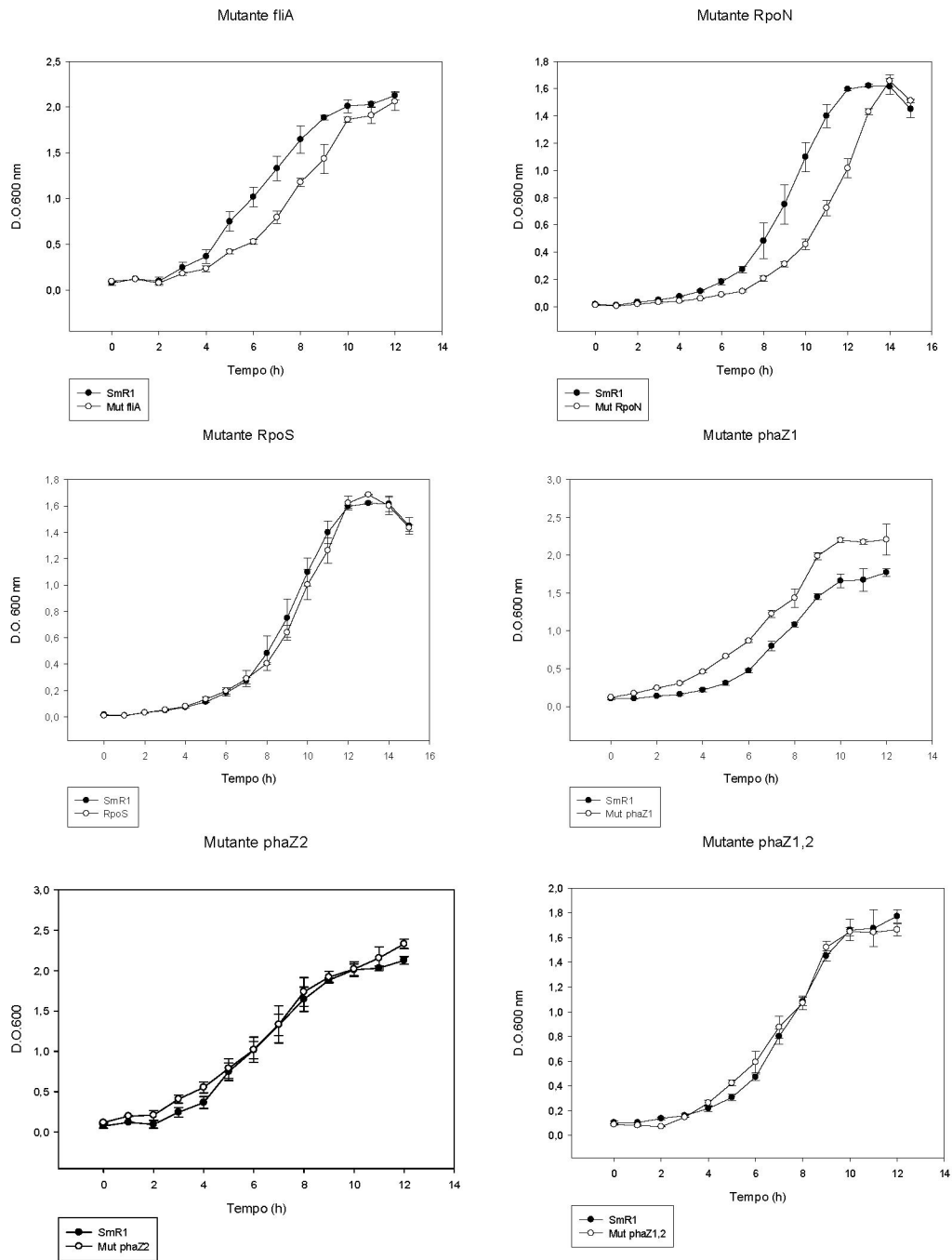
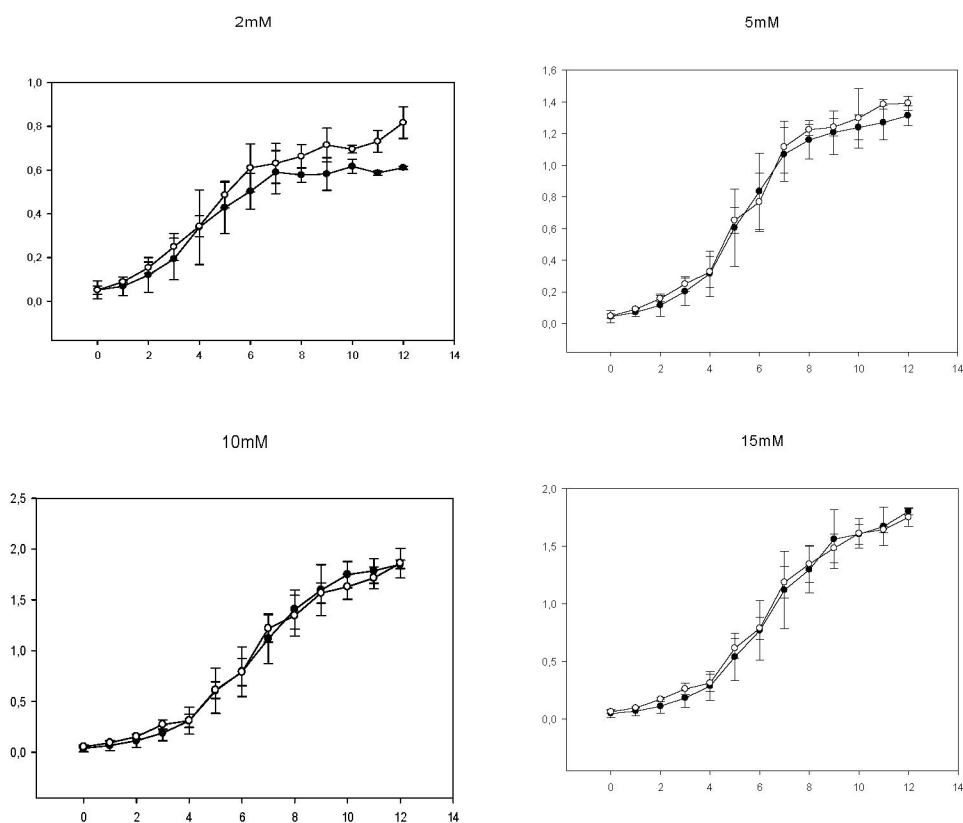


Figura 1. Perfil de crescimento das estirpes SmR1 e mutantes isogênicos ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaR$ e $\Delta phaZ1,2$) de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Cada ponto representa o valor de D.O. ₆₀₀ nm com seu respectivo desvio padrão, em todos os ensaios a estirpe parental SmR1 foi utilizada como controle.

2. Avaliação do perfil de crescimento da estirpe selvagem SmR1 e o mutante $\Delta rpoN$ de *H. seropedicae* em condições de limitação de amônio.

Com o intuito de avaliar a resposta da estirpe parental SmR1 e o mutante $\Delta rpoN$ em diferentes concentrações de fonte de nitrogênio foi avaliado o perfil de crescimento das estirpes em meio NfbHPN-malato, com 50 mM de mistura de fosfatos e avaliando as concentrações: 2, 5, 10, 15 e 20 mM de NH_4Cl . As bactérias foram crescidas seguindo o mesmo protocolo mencionado no experimento anterior, foram realizadas triplicatas biológicas de cada estirpe. A D.O._{600} foi determinada durante 12h em intervalos de 1h. Os resultados estão apresentados na Figura 2.



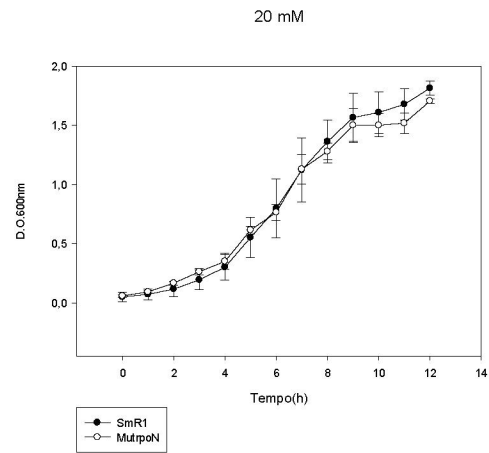


Figura 2. Avaliação do perfil de crescimento da estirpe SmR1 e mutante $\Delta rpoN$ em diferentes concentrações de NH_4Cl (2, 5, 10, 15 e 20 mM). Cada ponto representa a média do valor de D.O._{600nm} desse intervalo com seu respectivo desvio padrão.

3. Avaliação da resistência ao estresse oxidativo das estirpes SmR1 e mutantes por adição de metilviologênio.

As estirpes SmR1 e os mutantes isogênicos ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaR$ e $\Delta phaZ1.2$) foram crescidas em meio NFbHPN-malato com 50 mM de mistura de fosfatos e 20 mM de NH_4Cl e estreptomicina 80 $\mu g/mL$, incubados a 30°C e 120 RPM. Ao atingir a D.O.₆₀₀ de 0,6 foi adicionado no meio de cultura concentrações de 1 e 2 mM de metilviologênio ou paraquat e acompanhado o perfil de crescimento por até 12h. Os resultados do perfil de crescimento das estirpes são mostrados nas figuras 3 e 4. A partir dos dados foi calculada a taxa de crescimento de cada estirpe sem e com adição de metilviologênio. Os resultados da diminuição da taxa de crescimento após adição de paraquat são mostrados na Figura 5.

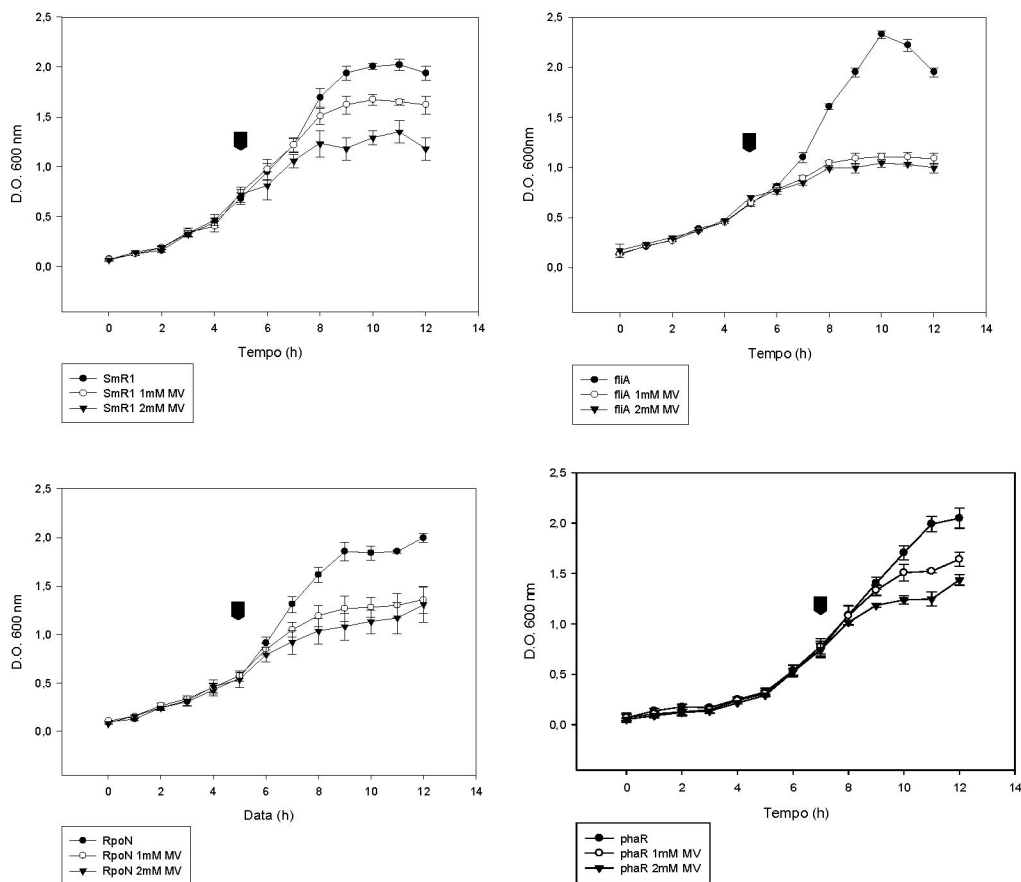


Figura 3. Perfil de crescimento da estirpe SmR1 e os mutantes $\Delta fliA$, $\Delta rpoN$ e $\Delta phaR$ de *Herbaspirillum seropedicae* em meio NFbHPN-malato com adição de metilviologênio (paraquat). A seta indica o ponto onde foi adicionado o metilviologênio ou paraquat na

cultura, cada ponto representa a média do valor de D.O._{600nm} com o seu respectivo desvio padrão.

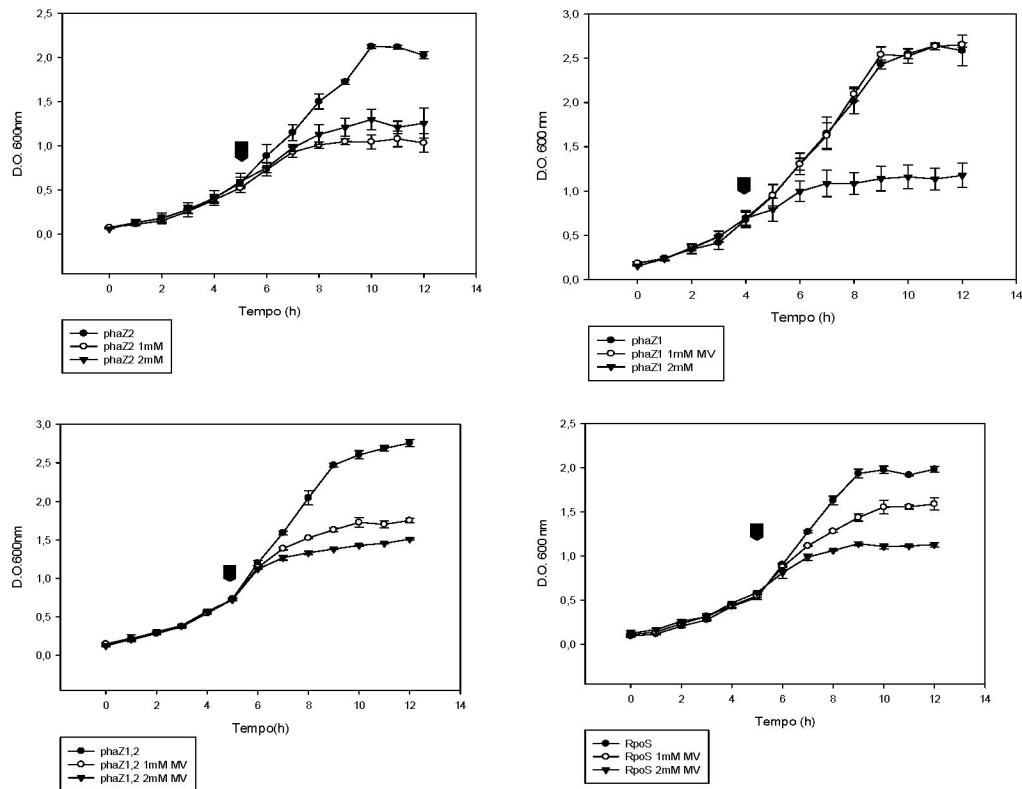


Figura 4. Perfil de crescimento da estirpe SmR1 e os mutantes ($\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1.2$) de *Herbaspirillum seropedicae* em meio NFbHPN-malato com adição de metilviologênio (paraquat).

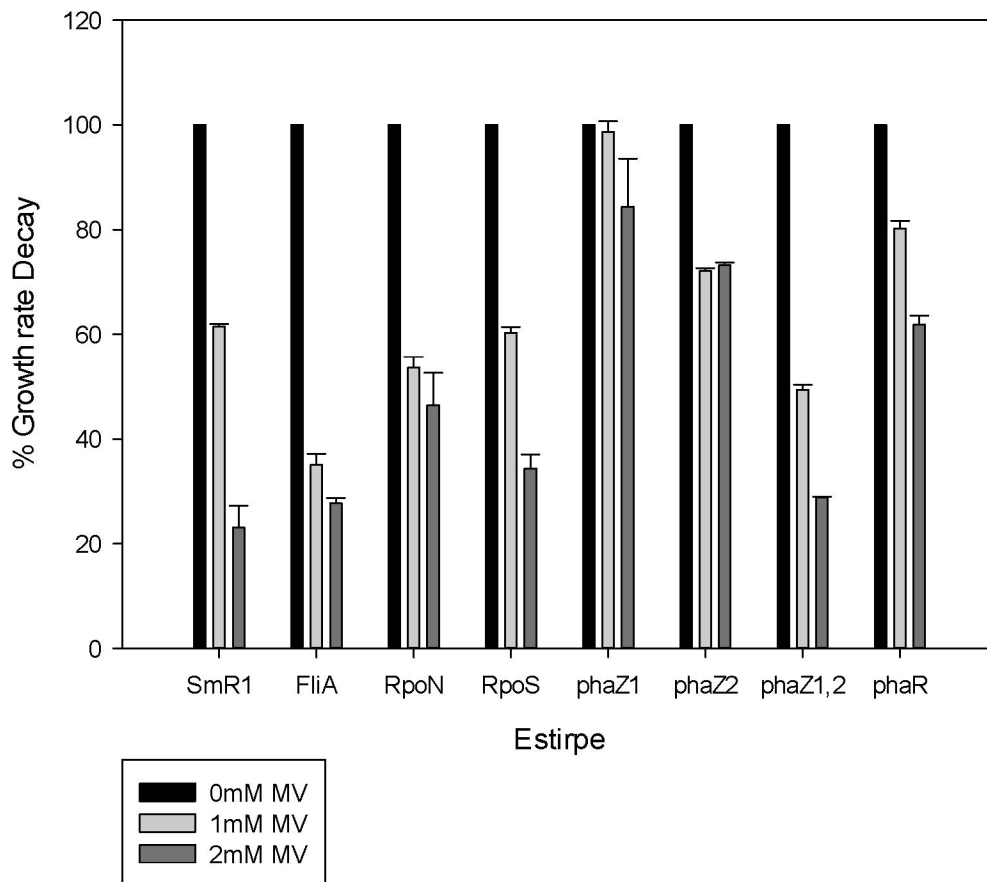


Figura 5. Porcentagem de diminuição das taxas de crescimento das estirpes SmR1 e mutantes ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaR$ e $\Delta phaZ1.2$) após adição de concentrações de 1 e 2 mM de metilviologênio. O valor da taxa de crescimento sem a adição de metilviologênio ou paraquat representa o 100%; a partir disso, foi calculada a porcentagem com base à diminuição observada após adição das concentrações 1 e 2 mM do agente oxidativo; FliA, RpoN, RpoS, phaZ1, phaZ2, phaZ1,2 e phaR representam os mutantes isogênicos da estirpe parental SmR1.

4. Avaliação da resposta de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e os mutantes isogênicos ($\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, e $\Delta phaZ1.2$) ao choque térmico.

As estirpes SmR1 e os mutantes isogênicos foram crescidas em meio NFbHPN-malato seguindo os protocolos descritos anteriormente para a preparação dos pré-inóculos, no dia do experimento. Culturas contendo as bactérias previamente crescidas

foram diluídas até D.O.₆₀₀ 0,1 em frascos de 50mL contendo 10 mL de volume de meio NFB HPN-malato fresco, as estirpes foram crescidas até atingir D.O.₆₀₀ 1,0.

Foram tomadas alíquotas da cultura e avaliadas por diluição seriada (tempo 0), o restante do volume de cultura foi separado em dois frascos de vidro com volumes iguais, um deles foi incubado num banho maria a 45°C, o outro num banho a 30°C; após 15min. de incubação novas alíquotas da cultura foram tomadas e realizada a diluição seriada, os dados de UFC/mL foram convertidos a Log₁₀ e plotados e são apresentados nas Figuras 6 e 7.

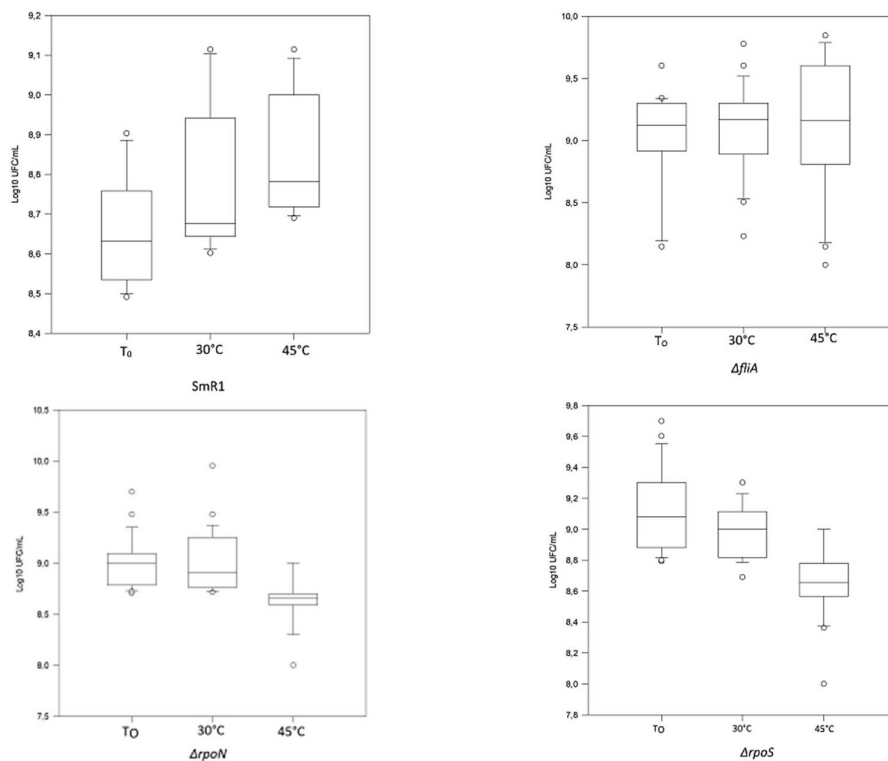


Figura 6. Avaliação da sobrevivência por contagem de colônias das estirpes SmR1, $\Delta fliA$, $\Delta rpoN$, $\Delta rpoS$ ao choque térmico. Cada uma das estirpes foi avaliada por triplicata biológica os valores obtidos da contagem de UFC/mL são apresentados em escala logarítmica (Log₁₀) com o seu valor de média e desvio padrão.

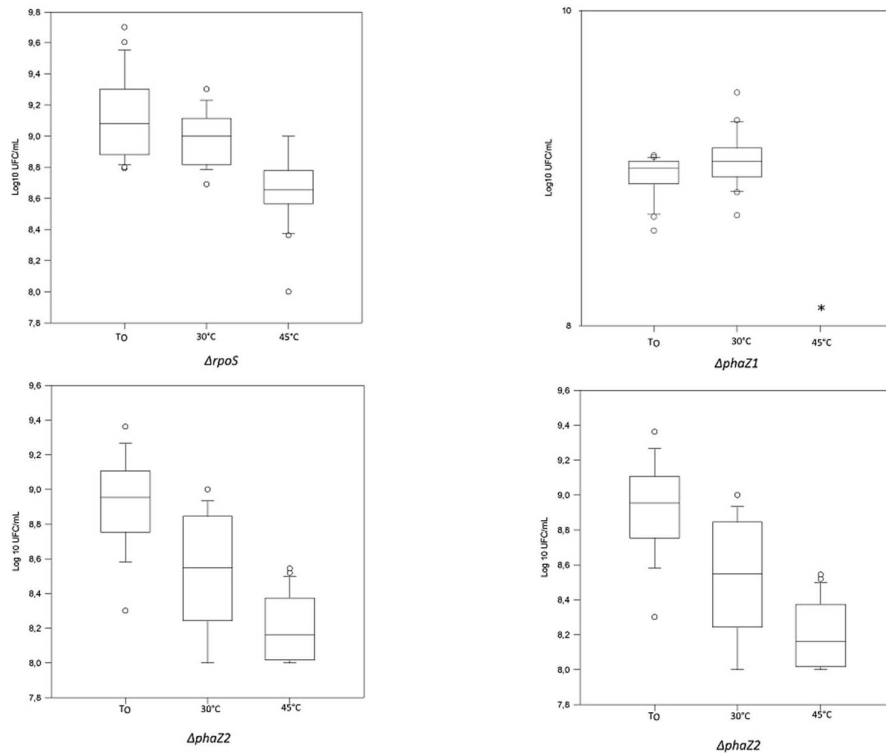


Figura 7. Avaliação da sobrevivência por contagem de colônias das estirpes $\Delta rpoS$, $\Delta phaZ1$, $\Delta phaZ2$, $\Delta phaZ1.2$ ao choque térmico. Cada uma das estirpes foi avaliada por triplicata biológica os valores obtidos da contagem de UFC/mL são apresentados em escala logarítmica (Log₁₀) com o seu valor de média e desvio padrão.

5. Construção dos plasmídeos de pCH03 e pCH04 com proteínas de fluorescência.

O plasmídeo pCH03 foi construído por Cristiane Heinrichs. Ele é um plasmídeo derivado do pBluescript II KS(+) com a inserção de um cassette de Km/Neo e um fragmento do gene *rhaS* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1; enquanto o pCH04 essa região foi substituída por um fragmento do gene *gp18* (**Hsero_0218**), que expressa uma proteína putativa do capsídeo de um fago inativo, e até o momento não foi detectada como expressa nas análises transcriptômicas realizadas com *H. seropedicae* SmR1. As primeiras construções de fluorescência foram realizadas utilizando uma sequência do promotor mínimo do gene *phaP1* de *H. seropedicae* SmR1, desenvolvido por Kim e col. (2018); ligado ao RBS, e seguido do gene que expressa a proteína verde fluorescente GFPmut3b (BBa_E0040) e um duplo terminador. Outras combinações com diferentes proteínas de fluorescência também foram construídas e testadas. A continuação o mapa representativo do plasmídeo pCH03 (Figura 8) e pCH04 (Figura 9).

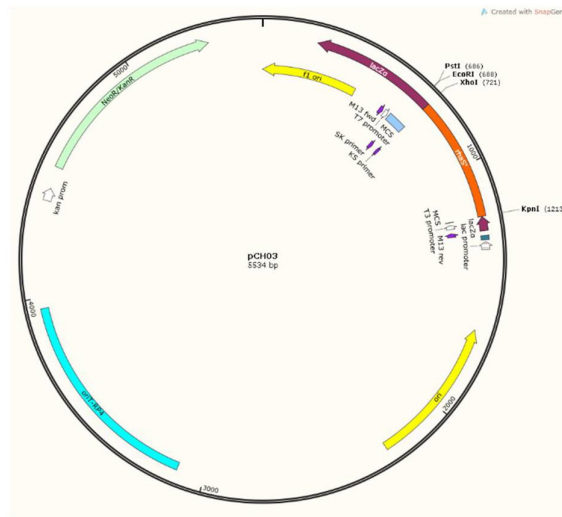


Figura 8. Mapa do plasmídeo pCH03. A figura mostra o cassete de resistência Km/Neo, o fragmento *rhaS'* do gene de *H. seropedicae* e mostrando as enzimas *EcoRI* e *PstI*, onde será inserida cada uma das construções com proteínas de fluorescência e *KpnI-XhoI* que corresponde ao sítio de restrição para troca da região *rhaS'* por *gp18'*. Ilustração obtida utilizando o software Snapgene®.

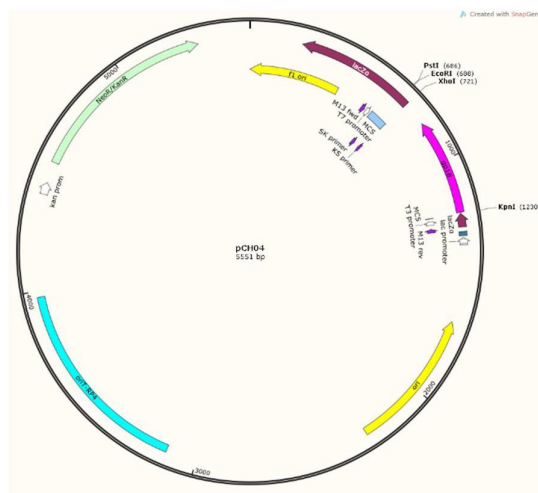


Figura 9. Mapa do plasmídeo pCH04. A figura mostra o cassete de resistência Km/Neo, o fragmento *gp18'* do gene de *H. seropedicae* e os sítios de restrição *EcoRI-PstI* onde será inserida cada uma das construções com proteínas de fluorescência e *KpnI-XhoI* que corresponde ao lugar onde ocorreu a substituição para inserção do fragmento do gene *gp18'*. Ilustração obtida utilizando o software Snapgene®.

Originalmente, as construções com proteínas de fluorescências foram elaboradas utilizando o promotor mínimo *phaPI* de desenvolvido por Kim e col. (2018); ligado ao RBS (BBa_B0034) seguido da região codificadora da proteína verde fluorescente

GFPmut3b (BBa_E0040) e um duplo terminador (BBa_B0034). Variações dessas construções foram elaboradas com as proteínas: mRFP, eCFP, eYFP, mOrange. Na tabela III são listados cada um dos elementos genéticos utilizados nas construções Biobrick.

Tabela III. Descrição de cada um dos elementos (partes Biobrick) utilizados nas construções com fluorescência.

| Parte | Identificação do BioBrick (inseto de DNA utilizado nas clonagens) | Descrição/Função |
|------------------------------|--|---|
| Promotor <i>phaP1</i> | | Sequência derivada do promotor <i>phaP1</i> de <i>H. seropedicae</i> (Kim, 2018). |
| J23119 | BBa_J23119 | Sequência derivada de uma livreria de promotores que expressam constitutivamente, sendo J23119 o promotor mais forte dessa família. |
| RBS | BBa_B0034 | RBS baseado no Elowitz repressilator, (Elowitz e Leibier, 2000). |
| GFP | BBa_E0040 | Proteína de fluorescência verde GFP mut3, derivada da água viva <i>Aequorea victoria</i> GFP “selvagem”. Excitação máx. 504 nm. , emissão máx. 515 nm. |
| mRFP1 | BBa_E1010 | Mutante da proteína de fluorescência vermelha de <i>Discosoma striata</i> . Excitação máx. 586 nm. , emissão máx. 611 nm. |
| eCFP | BBa_E0020 | Proteína de fluorescência azul (cyan) da proteína GFP de <i>A. victoria</i> . Excitação máx. 439 nm. , emissão máx. 476 nm. |
| eYFP | BBa_E0030 | Proteína de fluorescência eYFP (enhanced yellow fluorescent protein) derivada de <i>A. victoria</i> GFP. Excitação máx. 514 nm. , emissão máx. 527 nm. |
| mORANGE | BBa_E2050 | Proteína derivada de mRFP1, otimizada para levedura. Excitação máx. 548 nm. , emissão máx. 562 nm. |
| sfGFP | BBa_I746916 | Proteína de fluorescência verde com aumento de até três vezes quando comparada com outras proteínas de fluorescência. Excitação máx. 498 nm. , emissão máx. 513 nm. |
| Duplo terminador | BBa_B0015 | Duplo terminador baseado nas sequencias terminadoras <i>rrnBT1-T7TE</i> . |

Após avaliação da fluorescência das estirpes transformadas, foi comprovado que as fusões com o promotor mínimo *phaP1* não eram suficientemente fortes para dirigir a expressão de GFP e RFP (resultados não mostrados). Portanto, o promotor foi trocado pela parte (BBa_J23119) que constitui o promotor mais forte de uma livraria de promotores.

A partir disso, foram construídos novamente os plasmídeos pCH03 e pCH04 com as construções sfGFP e RFP com o novo promotor. Após confirmação dos conjugantes, as bactérias foram crescidas e avaliadas por microscopia confocal para observar a fluorescência, os resultados estão mostrados na Figura 10.

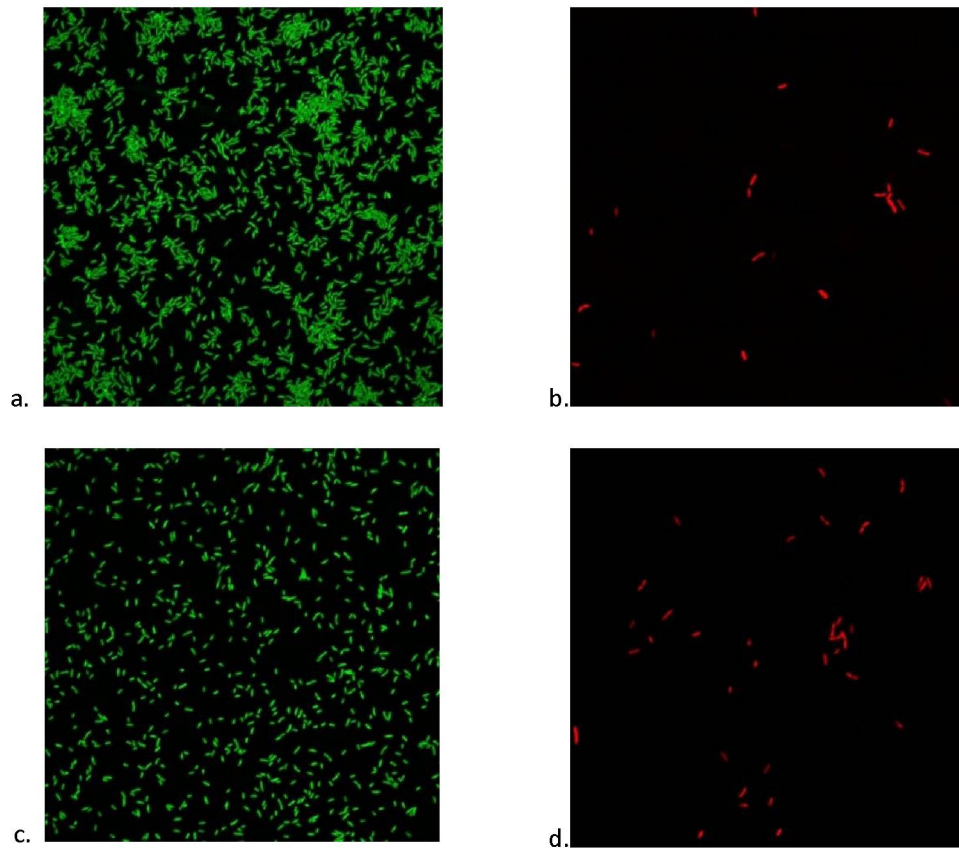


Figura 10. Fotografia de microscopia confocal de fluorescência da estirpe SmR1 transformada com os plasmídeos: **a.** pCH03-sfGFP; **b.** pCH03-RFP; **c.** pCH04-sfGFP e **d.** pCH04-RFP. As imagens foram coletadas em um microscópio confocal modelo A1 MP+ Nikon, as imagens estão com aumento de 60x e Zoom digital 2x.

Na fotografia de microscopia confocal de fluorescência é possível observar que a abundância de células marcadas com a proteína de fluorescência verde superfolder GFP é muito maior do que as marcadas com fluorescência vermelha (RFP) levantando a possibilidade de que a expressão da proteína poderia resultar tóxica para a bactéria. Visando comprovar essa hipótese, foi feita a avaliação do perfil de crescimento da estirpe SmR1 e dos mutantes $\Delta phaZ1$ e $\Delta fliA$ em meio NfbHPN-Malato de acordo com protocolo descrito anteriormente. Os resultados são mostrados na Figura 11.

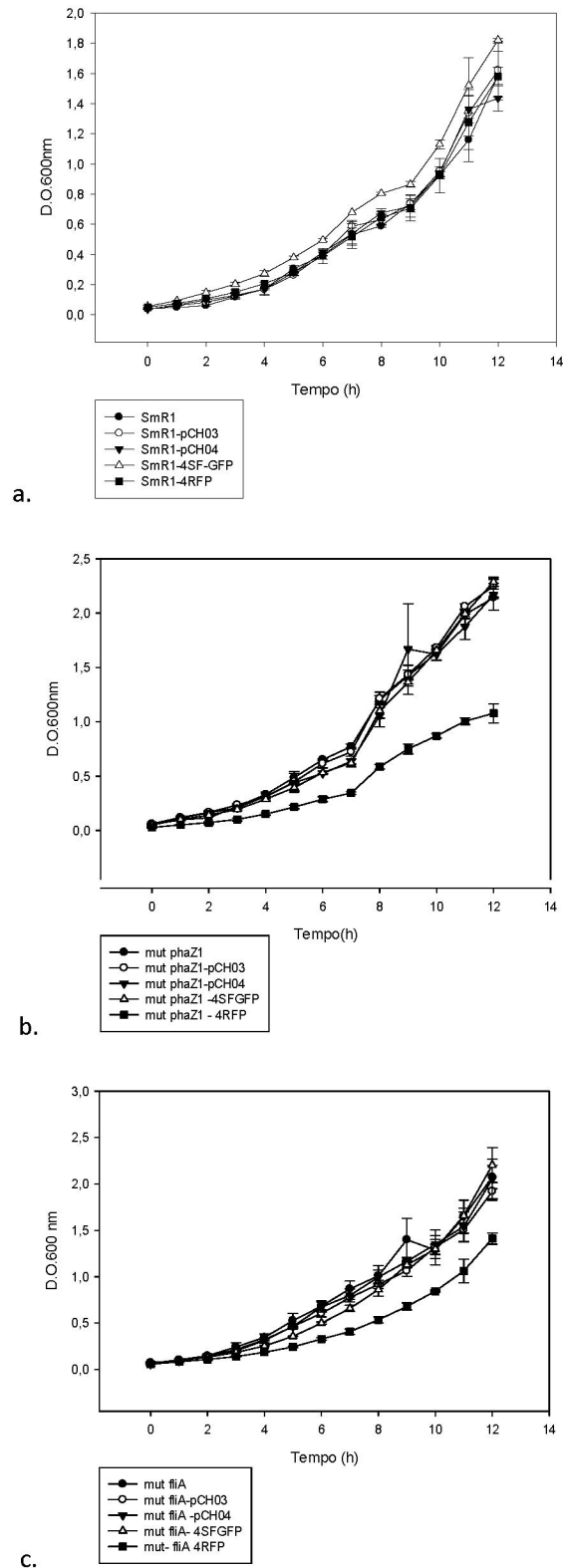


Figura 11. Perfil de crescimento das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* **a.** SmR1; **b.** mutante $\Delta phaZ1$ e **c.** mutante $\Delta fliA$ transformados com os plasmídeos pCH03, pCH04, pCH04-sfGFP(4SF-GFP) e pCH04-RFP(4RFP).

Além disso, foram realizados ensaios de motilidade com as estirpes $\Delta fliA$ e $\Delta rpoS$ de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, cada uma contendo os plasmídeos pCH04 com as variantes fluorescentes superfolder GFP e RFP. O ensaio visava avaliar diferenças do fenótipo durante o crescimento em meio semissólido. Isso porque o mutante $\Delta fliA$ carece de motilidade, enquanto o $\Delta rpoS$ parece ter uma motilidade maior do que a estirpe parental SmR1. Os resultados são mostrados na figura 19. Como é possível observar na imagem, o halo de crescimento da estirpe $\Delta rpoS$ marcada com a proteína de fluorescência verde (c) é maior do que o halo de crescimento da mesma bactéria marcada com a proteína de fluorescência vermelha (d) demonstrando assim a sensibilidade de algumas estirpes na marcação com a proteína vermelha (RFP).

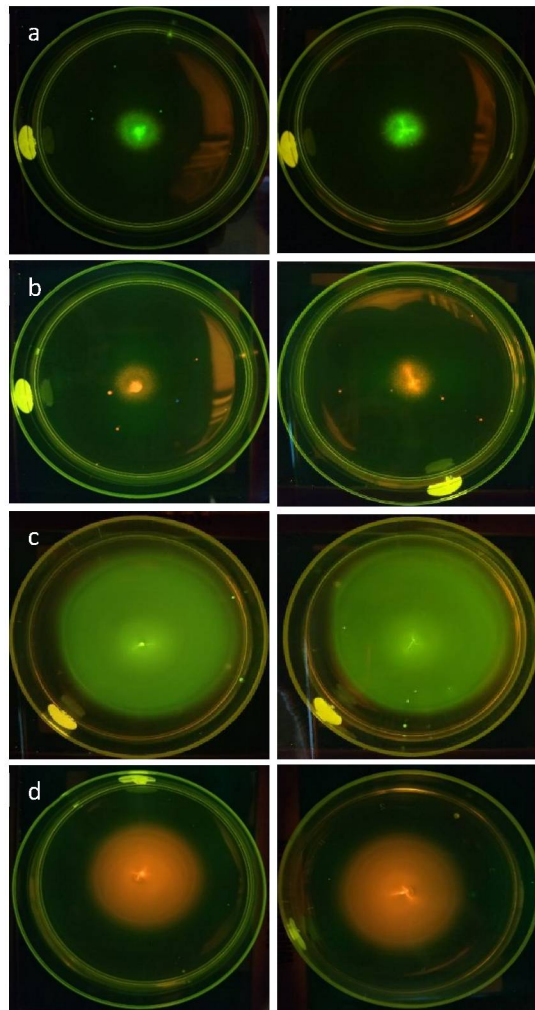


Figura 12. Ensaio de motilidade das estirpes: $\Delta fliA$ marcada com o plasmídeo pCH04 com as proteínas SFGFP (a) e RFP (b), estirpe $\Delta rpoS$ com plasmídeo pCH04 com SFGFP (c) e RFP (d).

6. Análise transcriptômica comparativa da estirpe mutante $\Delta rpoS$ e parental SmR1 na fase estacionária e em condições de choque térmico.

A preparação e o sequenciamento das bibliotecas das estirpes SmR1 e mutante *rpoS* de *Herbaspirillum seropedicae* após choque térmico a 45°C, foi um trabalho realizado pela Doutora Vânia Pankiewicz durante as atividades do seu pós-doutorado. O procedimento é descrito brevemente: foram coletadas amostras de cultura com crescimento da estirpe selvagem e mutante $\Delta rpoS$ 15 min antes e depois do choque térmico a 45°C, as amostras foram transferidas rapidamente a RNA later para conservação do RNA. Após a coleta de todas as amostras (triplicatas biológicas de cada estirpe) foram preparadas as bibliotecas e sequenciadas no *IonProton Sequencer* da Thermo Fischer®, os arquivos obtidos foram analisados com os programas CLC Workbench 7.0 (aparagem dos reads, mapeamento e análise transcriptômica). As análises estatísticas foram feitas utilizando os pacotes de Biocondutor DESeq2 e EdgeR. Foram analisadas todas as combinações possíveis para as análises do perfil transcriptômico, com o objetivo de descobrir possíveis genes envolvidos no regulon RpoS. Os resultados obtidos de genes diferencialmente expressos são mostrados na tabela IV.

Tabela IV. Perfil transcriptômico comparativo da estirpe $\Delta rpoS$ e parental SmR1 de *H. seropedicae* em condições de choque térmico.

| Perfil comparado | DESeq2 | | Edge R | |
|-------------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|
| | Sobre expresso | Reprimido | Sobre expresso | Reprimido |
| RpoS vs SmR1 | 354 | 256 | 404 | 293 |
| RpoS45 vs SmR145 | 269 | 312 | 334 | 369 |
| SmR145 vs SmR1 | 1038 | 797 | 1097 | 838 |
| RpoS45 vs RpoS | 867 | 782 | 1059 | 910 |

Após avaliação, os genes foram classificados em categorias a partir das análises no KEGG, e elaboradas tabelas de grupos de genes de acordo com a sua função. Na sequência, apresentam-se as tabelas das categorias complementares das análises que não foram incluídas no artigo.

Tabela V. Genes implicados no metabolismo de lipídeos:

| Gene New annotation/Old | S45 vs S30 | R45 vs R30 | R30S vs S30 | R45 vs S45 | Function |
|-------------------------------|------------|------------|-------------|------------|---|
| HSERO_RS12580 <i>eutB</i> | 3.36 | | 0.0 | 0 | ethanolamine ammonia-lyase |
| HSERO_RS12575 <i>eutC</i> | 2.88 | 1.9 | 0 | 0 | ethanolamine ammonia-lyase |
| HSERO_RS23360 <i>gmhA</i> | 2.74 | 1.9 | | 0 | phosphoheptose isomerase |
| HSERO_RS05580 Hsero_1112 | 2.06 | | | 1.52 | phospholipase D family |
| HSERO_RS20850 Hsero_4171 | | | | 1.4 | ADP-heptose synthase |
| HSERO_RS22085 Hsero_4418 | | | -1.4 | | histidinol phosphatase |
| HSERO_RS13915 <i>kdsA</i> | 1.41 | 0.0 | | 0 | 8-phosphate synthase |
| HSERO_RS10935 <i>lpxA</i> | 1.44 | 1.9 | | 0 | O-acyltransferase |
| HSERO_RS16575 <i>pldA</i> | 2.61 | 1.53 | 0.0 | 0 | Phospholipase A1 |
| HSERO_RS11255 <i>tsaC</i> | | | -1.4 | | toluenesulfonate Zinc-independent alcohol dehydrogenase |

Tabela VI. Genes envolvidos no metabolismo de nucleotídeos.

| Gene New annotation/Old | S45 vs S30 | R45 vs R30 | R30 vs S30 | R45 vs S45 | Function |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|--|
| HSERO_RS21260 <i>add</i> | | | | 1.03 | adenosine deaminase |
| HSERO_RS18415 <i>cmk</i> | | | -1.8 | -2.13 | cytidylate kinase |
| HSERO_RS07040 <i>dut</i> | 1.30 | 2.2 | 0 | 0 | deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase |
| HSERO_RS03520 Hsero_0704 | | | -1.7 | | aminoglycoside phosphotransferase |
| HSERO_RS21170 Hsero_4237 | | | -1.5 | -1.2 | 5'-nucleotidase |
| HSERO_RS14815 <i>ndk</i> | 1.33 | 1.7 | -1.4 | 0 | nucleoside-diphosphate kinase |
| HSERO_RS19570 <i>prsA</i> | | | -1.9 | -2.19 | phosphoribosylpyrophosphate synthetase |
| HSERO_RS03360 <i>purC</i> | 1.49 | 0 | 0.0 | 0 | phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase |
| HSERO_RS17755 <i>purD</i> | 1.63 | 1.91 | 0.0 | 0 | phosphoribosylamine-glycine ligase |
| HSERO_RS03365 <i>purE</i> | 2.26 | 0 | 0.0 | 0 | phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit |
| HSERO_RS16445 <i>purF</i> | 2.86 | 2.18 | 0.0 | 0 | glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase |
| HSERO_RS02330 <i>pyrB</i> | | | -1.8 | -1.3 | aspartate carbamoyltransferase |
| HSERO_RS13920 <i>pyrG</i> | 1.34 | 2.11 | -1.09 | 0 | CTP synthase (UTP-ammonia lyase) |
| HSERO_RS10885 <i>pyrH</i> | 2.29 | 1.51 | 0.0 | 0 | uridylate kinase |
| HSERO_RS16275 <i>uraH</i> | 2.52 | 0 | 1.49 | 1.67 | transhyreretyn-like (hydroxyisourate hydrolase) |

Tabela VII. Genes envolvidos no metabolismo de cofatores.

| Gene New annotation/Old | S45 vs S30 | R45 vs R30 | R30 vs S30 | R45 vs S45 | Function |
|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--|
| HSERO_RS12250 <i>bioA</i> | 1.74 | 0 | 0 | 0 | adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase |
| HSERO_RS21510 <i>birA</i> | | 1.50 | | | bifunctional: biotin operon repressor/biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] synthetase |
| HSERO_RS13275 <i>cbiG</i> | | | -1.4 | | bifunctional precorrin-3B C17-methyltransferase/precorrin isomerase |
| HSERO_RS07045 <i>coaBC</i> | 1.75 | 1.6 | 0 | 0 | phosphopantothenoylcysteine synthetase/decarboxylase |
| HSERO_RS13245 <i>cobP</i> | | | | 1.1 | bifunctional enzyme: cobinamide kinase/cobinamide phosphate guanylyltransferase |
| HSERO_RS11070 <i>nadC</i> | 1.75 | 0.0 | | 0 | nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase |
| HSERO_RS18240 <i>ribE</i> | | -1.76 | | | riboflavin synthase |

Tabela VIII. Genes envolvidos na síntese de metabolitos secundários.

| Gene New annotation/Old | S45 vs S30 | R45 vs R30 | R30 vs S30 | R45 vs S45 | Function |
|---|------------|---------------|---------------|------------|---|
| HSERO_RS04830 <i>adhA</i> | | | 5.00 | 3.84 | alcohol deshidrogenase |
| HSERO_RS10905 <i>dxr</i> | 1.68 | 0.00 | 0.00 | -1.17 | 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase |
| HSERO_RS19125 <i>dxs</i> | 1.79 | 2.05 | 0.00 | 0.00 | 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase protein |
| HSERO_RS12515 <i>glgA</i> | | | -2.20 | | glycogen synthase protein |
| HSERO_RS12510 <i>glgB</i> | | | -2.20 | | 1,4-alpha-glucan branching enzyme protein |
| HSERO_RS17870 <i>glk</i> | 2.84 | 3.12 | | | glucokinase protein |
| HSERO_RS19595 <i>gltB</i> | | | -1.60 | -1.50 | glutamate synthase |
| HSERO_RS19590 <i>gltD</i> | | | -1.50 | | glutamate synthase |
| HSERO_RS20345 <i>hisD</i> | | | -1.90 | | histidinol dehydrogenase oxidoreductase |
| HSERO_RS06705 <i>Hsero_1338</i> | | | 1.50 | 1.47 | MFS transporter |
| HSERO_RS12030 <i>Hsero_2407</i> | | | 1.80 | 1.39 | phosphate acetyltransferase |
| HSERO_RS21170 <i>Hsero_4237</i> | | | -1.50 | -1.23 | Nucleotidase |
| HSERO_RS19560 <i>ipk</i> | | -2.20 | -1.70 | -3.43 | kinase |
| HSERO_RS19130 <i>ispA</i> | 2.37 | 3.25 | | 0.00 | farnesyl diphosphate synthase |
| HSERO_RS15190 <i>ispF</i> | | | -1.30 | -1.00 | cyclodiphosphate synthase |
| HSERO_RS06245 <i>katG</i> | 1.71 | 0.00 | | 0.00 | Catalase |

| | | | | | |
|-------------------------------------|------|------|-------|-------|---------------------------------------|
| HSERO_RS03085 <i>panB</i> | 2.84 | 2.83 | 0.00 | 0.00 | hydroxymethyltransferase |
| HSERO_RS00265 <i>tdcB</i> | | | -1.30 | | threonine dehydratase |
| HSERO_RS01975 <i>ubiC</i> | 1.59 | 0.00 | -1.74 | 0.00 | 4-hydroxybenzoate synthetase |
| HSERO_RS19485 <i>ubiE</i> | | 1.42 | | | benzoquinol methylase |
| HSERO_RS19230 <i>ubiF</i> | 2.28 | 2.86 | 0.00 | 1.29 | 3-demethoxyubiquinol 3-hydroxylase |
| HSERO_RS18450 <i>ubiG</i> | 1.56 | | | -1.16 | 3-methyltransferase |
| HSERO_RS10895 <i>uppS</i> | 1.64 | | | | undecaprenyl pyrophosphate synthetase |

Tabela IX. Genes envolvidos no sistema de secreção bacteriana.

| Gene New annotation/Old | S45 vs S30 | R45 vs R30 | R30 vs S30 | R45 vs S45 | Function |
|---|------------|------------|------------|------------|---|
| HSERO_RS03785 <i>Hsero_0758</i> | 1.68 | | | | type VI secretion system protein VasK |
| HSERO_RS20170 <i>Hsero_4035</i> | -1.75 | -1.57 | | 1.04 | type VI secretion system |
| HSERO_RS01850 <i>ffh</i> | 1.97 | 1.97 | | | Signal recognition particle subunit SRP54 |
| HSERO_RS20715 <i>ftsY</i> | 2.97 | 3.43 | | | signal recognition particle GTPase |
| HSERO_RS04005 <i>hrcJ</i> | 4.00 | | | | type III secretion HrcJ lipoprotein |
| HSERO_RS03970 <i>hrcQ</i> | 3.42 | | | | type III secretion system |
| HSERO_RS06225 <i>secF</i> | 1.56 | 1.72 | | | preprotein translocase subunit |
| HSERO_RS20295 <i>tatA</i> | -2.24 | -2.59 | | | Sec-independent protein translocase |
| HSERO_RS06215 <i>yajC</i> | 2.82 | 1.84 | | | preprotein translocase transmembrane |
| HSERO_RS00495 <i>secE</i> | | | -2.80 | -2.53 | preprotein translocase SecE subunit transmembrane |
| HSERO_RS21675 <i>ydC</i> | | | -1.40 | | inner-membrane transmembrane protein |

Tabela X. Genes envolvidos no sistema de dois componentes.

| Gene New annotation/Old | S45 vs S30 | R45 vs R30 | R30 vs S30 | R45 vs S45 | Function |
|---|------------|------------|------------|------------|--|
| HSERO_RS19165 Hsero_3839 | | | -1.5 | | histidine kinase |
| HSERO_RS18175 narJ | | | -3.5 | | respiratory nitrate reductase |
| HSERO_RS09765 Hsero_1957 | | | 1.6 | 2.04 | chemotaxis signal transduction protein |

| | | | | | |
|------------------------------------|-------|------|------|-------|--|
| HSERO_RS10170 Hsero_2031 | -1.51 | -2.3 | | -1.29 | anti-sigma-28 factor protein |
| HSERO_RS14820 Hsero_2597 | | | | -1.17 | response regulator RegA |
| HSERO_RS14045 citE | | | | 1.98 | citrate lyase beta subunit |
| HSERO_RS10160 fliA | | | | -1.2 | RNA polymerase sigma factor for flagellar operon |
| HSERO_RS18870 kdpA | 2.83 | | | 1.67 | potassium-transporting ATPase |
| HSERO_RS18865 kdpB | 2.83 | | | 1.32 | high-affinity K ⁺ transport system, ATPase |
| HSERO_RS14390 nifA | 1.56 | | 1.5 | 1.1 | nif-specific regulatory protein |
| HSERO_RS19855 rpoN | -2.41 | -3.2 | -1.2 | -1.53 | RNA polymerase sigma-N (sigma-54) factor transcription regulator |