

**UFRRJ  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TESE**

**O líquido apoplástico de cana-de-açúcar modula o perfil transcriptômico  
global da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica in vitro***

**PAULA RENATA ALVES DA SILVA**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**O LÍQUIDO APOPLÁSTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR MODULA O  
PERFIL TRANSCRIPTÔMICO GLOBAL DA BACTÉRIA  
DIAZOTRÓFICA *Burkholderia tropica* IN VITRO**

**PAULA RENATA ALVES DA SILVA**

*Sob orientação do Pesquisador*  
**José Ivo Baldani**  
*e Co-orientação da Pesquisadora*  
**Márcia Soares Vidal**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em**  
**Ciências**, no curso de Pós Graduação  
em Fitotecnia

Seropédica, RJ  
Fevereiro, 2016

633.61

S5861

T

Silva, Paula Renata Alves da, 1986-

O líquido apoplástico de cana-de-açúcar modula o perfil transcritômico global da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica in vitro* / Paula Renata Alves da Silva - 2016.

89 f.: il.

Orientador: José Ivo Baldani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Inclui bibliografias.

1. Cana-de-açúcar - Teses. 2. Genes - Teses. 3. Nicho (Ecologia) - Teses. 4. Nitrogênio - Fixação - Teses. 5. Plantas - Efeito de nitrogênio - Teses. I. Baldani, José Ivo, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**PAULA RENATA ALVES DA SILVA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no  
Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

TESE APROVADA EM 29/02/2016

---

José Ivo Baldani. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Silvia Regina Goi. Dra. UFRRJ

---

Emanuel Maltempi de Souza. Dr. UFPR

---

Stefan Schwab. Dr. Embrapa Agrobiologia

---

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

## **DEDICATÓRIA**

*À Deus, por ter me sustentado e guiado até aqui;*

### **OFEREÇO**

#### **COM AMOR**

*Aos meus pais*

Regina Alves da Silva e Marcos da Silva

#### **COM RESPEITO**

*Aos meus avós*

Adelino da Silva (*in memorian*) e Maria José da Silva (*in memorian*)

#### **COM CARINHO**

Ao amor...

"Depois de tanto procurar, alguém que me pudesse explicar

Por que eu viria tantas vezes a encarnar?

Você surgiu para me mostrar ,que era prá sempre eu por você me apaixonar

Eis que encontro em ti toda a perfeição, perfeição já conhecida essa é a sensação

De quando olho no profundo do seu ser com devoção

Vejo que nossas almas já haviam passado por essa união

Não sei explicar mas sua voz, seu beijo, seu cheiro eu já conhecia

E percebo que esta força será em todos os dias

Mesmo que todos os dias, não sejam vividos todos somente nesta vida

Mas que ao menos uma vez, ocorra sempre em cada nova vinda

Pois sei que sempre foi você que eu procurei

A partir daquele primeiro momento que te olhei

Naquele instante, é você, eu pensei

E mesmo sem ainda te conhecer, de tudo eu lembrei

Esta sensação de conhecimento do desconhecido

De sempre viver este amor que nunca havia vivido

Sentir novamente algo que jamais havia sentido

São lembranças de um passado não reconhecido

Então vou te falar lembranças de você quando jamais pensava em te conhecer

Eu sabia a doçura do seu beijo sem jamais ter te beijado

Sabia o calor do teu corpo sem jamais ter te tocado

Sabia o encaixe do seu abraço sem jamais ter te abraçado

Sabia o aroma da tua pele sem jamais ter te cheirado

Eu sabia do som da sua voz sem jamais ter te escutado

Eu sabia tudo isso por lembranças do "desconhecido"

Eu sabia que você era o amor jamais nesta vida vivido

Mas que em tantas outras vidas, certamente, eu já havia sentido!"

***D e d i c o***

## **AGRADECIMENTOS**

Talvez possa esquecer-me de qualquer uma das inúmeras pessoas que marcaram o desenvolvimento deste trabalho, por isso desde já peço perdão por não ter a capacidade de me lembrar de cada rosto, cada nome daqueles que contribuíram enormemente para que este documento existisse.

À Deus por guiar toda a minha vida, por ter me sustentado e me dado forças pra continuar seguindo e enfrentando barreiras, principalmente nesses dois anos onde só Ele sabe como eu cheguei até aqui.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, à Embrapa Agrobiologia, ao curso de Pós Graduação em Fitotecnia, e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade, estrutura e pelo apoio financeiro.

Agradeço muito, ao Pesquisador e orientador José Ivo Baldani, que sempre acreditou em mim, mais até do que eu pela confiança, amizade e ensinamentos que carregarei por toda a vida. Agradeço também à Pesquisadora e orientadora Márcia Soares Vidal, que deu todo o apoio técnico-pedagógico que sempre precisei, e aos Pesquisadores Stefan Schwab e Jean Luiz Simoes de Araújo pelo auxílio nas análises de Bioinformática.

À minha mãe Regina Alves da Silva, pelo amor incondicional e unilateral. Por ser essa mulher de fibra e garra que mesmo passando por fortes decepções e tristezas nunca se deixou abater. Eu te amo mãe.

Ao meu pai Marcos da Silva. Tem horas em que me confundo quem é filho de quem nessa relação e mesmo com todos os nossos problemas, nos amamos incondicionalmente. Só peço juízo a Deus pra você seu Kiko!!!

À minha querida vó Zé (Maria José da Silva), pelo amor e dedicação à família em vida. Tenho certeza que estaria muito feliz com mais esta conquista da sua neta.

À amiga-irmã Mariella Camargo Rocha que está sempre ao meu lado me apoiando e mesmo com nossas brigas (o que normalmente acontece entre duas "irmãs", como diria) nunca nos distanciamos emocionalmente falando, pois, o que nos une é maior do que tudo. Te amo amiga. Conte comigo sempre! Você é a grande culpada desse coração canino ter se dividido e agora ter espaço para os felinos!!!

À Joanna (Maria de Fátima Gomes Nogueira), pessoa especial que se tornou uma grande amiga sempre disposta a dar a mão quando preciso. Obrigada pelas gostosas risadas quando nos encontramos. Nossos encontros são inesquecíveis. Te amo.

Ao José Carlos Polidoro, pelos momentos vividos como companheiro e hoje como amigo, sempre me estimulando e apoiando. Agradeço de coração, essa Tese pertence um pouco à você também.

Aos meus avós Norma Palermo Alves e Manoel de Andrade, às tias Leila Araújo e Angélica de Andrade, aos tios Carlos Alberto e Levi Palermo, aos primos Cristiano Araújo e Carlos Araújo (*in memoriam*), às priminhas mais lindas Aline de Andrade e Lorena Charbel de Araújo e ao irmão Marcos da Silva pelo apoio e incentivo mesmo a distância.

À grande amiga mala amada Marcela Mota Drechsel, outra irmã que fiz no LGB. Agradeço pelas boas risadas, amizade e por ser minha confidente de coisas inconfidenciáveis rs. Te amo!

Às amigas Viviane Ferreira e Silvana Santos e ao amigo Esdras Silva, pelos momentos agradáveis no alojamento da Embrapa.

Ao amigo Cleiton de Paula, que é esse cara ímpar por ter Paula no nome principalmente rs. Sem você, meu amigo, essa tese não teria saído. Obrigada pelos ensinamentos, conversas, e por me emprestar seus ouvidos em meus desabafos.

À grande amiga Kátia Teixeira (*in memoriam*)... A separação visível é ferida aberta que não cicatriza. É saudade, é dor que não cessa. Um adeus querendo ser um até breve. Por que nossos caminhos se cruzaram ao acaso se logo se descruzaram para sempre? Será que é sempre? Será que nos encontraremos? Será que voltaremos? "Serás"... Tantas dúvidas, mas a única certeza é de que o sentimento que eu tive foi verdadeiro. Obrigada por me dar a oportunidade de conhecer, conviver e ser amiga de uma pessoa tão diferente de mim e tão semelhante ao mesmo tempo. Obrigada por me permitir conhecer uma Kátia que raros conheciam. Te amarei para sempre!!!

Aos amigos de Recife, Joacy Braz, Soninha (Sônia Sobreira) e Ana Elizabeth pelo grande carinho. Obrigada pelas gargalhadas das "resenhas" e amizade que nem mesmo a distância destrói. Amo vocês.

Às amigas Valéria Polese, Caroline Barra, Francine Otsuka e Késia Dias pelo companheirismo e amizade. Obrigada por tudo.

À amiga Carolina Nachi Rossi por ter me permitido participar da sua vida e por ter me aturado por um longo período.

Aos meus gatos Miguel Falabella e Chico Mio Buarque de Holanda pela companhia diária, marcas de amor pelo corpo e por ser um dos únicos momentos de distração e felicidade. Amo vocês meus peludos!

Aos professores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial a Professora Margarida Goréte Ferreira do Carmo, Helena Guglielmi Montano, João Sebastião de Paula Araújo e João Pedro Pimentel, por terem contribuído com minha formação e me ajudarem a chegar aonde cheguei, pelos ensinamentos e amizade.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa Luiz Antônio Maffia e Fabrício de Ávila Rodrigues pela contribuição excepcional na minha formação.

Aos membros da banca, tanto titulares quanto suplentes, professores Emanuel Maltempí de Souza, Leandro Azevedo Santos, Stefan Schwab, Sílvia Regina Goi, Luc Felicianus Marie Rouws e Leonardo de Oliveira Medici pela participação e certamente pelas grandes contribuições para que este documento tenha sua qualidade aprimorada.

À Dra. Michelle Zibetti Tadra-Sfeir pelo apoio no transcriptoma.

Aos Professores do Departamento de Fitotecnia e aos Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia que contribuíram para minha formação durante esse período.

À toda equipe do Laboratório de Genética e Bioquímica e todos, sem nenhuma exceção, sempre me apoiaram e ajudaram enormemente. Não vou citar nomes pois posso esquecer de alguém e não gostaria que isso acontecesse. Os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço especialmente a Geraldo Baêta, este Anjo Protetor e Amigo, pra quem não existe problema insolúvel e qualquer obstáculo pode ser contornado.

À todos que de uma forma ou de outra me apoiaram durante esse tempo.

E como diz a música: “Se chorei ou se sorri, o importante é que emoções eu vivi!”



## BIOGRAFIA

Paula Renata Alves da Silva, filha de Marcos da Silva e Regina Alves da Silva, nasceu em 19 de julho de 1986, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. Em 2001, ingressou no curso Técnico em Agropecuária Orgânica pelo Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CTUR), onde concluiu junto com o Ensino Médio, em dezembro de 2003. Em 2004, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde graduou-se em fevereiro de 2010. Em Março de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV) desenvolvendo sua dissertação de mestrado intitulada “Interação *Clonostachys rosea*, silício e *Botrytis cinerea* em pepineiro” sob a orientação do professor Luiz Antônio Maffia e orientação do professor Fabrício de Ávila Rodrigues onde concluiu em fevereiro de 2012. Em Março do mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) desenvolvendo sua tese de doutorado intitulada “O líquido apoplástico de cana-de-açúcar modula o perfil transcriptômico de *B. tropica*” sob a orientação do pesquisador José Ivo Baldani e orientação da professora Márcia Soares Vidal.

## RESUMO GERAL

SILVA, Paula Renata Alves da. **O líquido apoplástico de cana-de-açúcar modula o perfil transcriptômico global da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica in vitro***. 2016. 165p Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Algumas bactérias diazotróficas colonizam preferencialmente os tecidos vegetais internos e dentre elas destaca-se a *Burkholderia tropica* que possui baixa sobrevivência no solo. Existem relatos que bactérias diazotróficas endofíticas localizam-se no apoplasto de cana-de-açúcar, um nicho ecológico que apresenta características peculiares que possibilitam sua colonização por bactérias tais como: redução de competição por nutrientes, proteção contra excesso de oxigênio, fonte de carboidratos, aminoácidos, íons orgânicos e outras. Porém, os mecanismos da interação planta - fluido apoplástico ainda não são bem elucidados sendo a transcriptômica uma ferramenta que pode auxiliar no conhecimento desse fenômeno. Neste sentido, foi realizado um experimento comparando-se o crescimento da bactéria em três condições distintas: meio JMV completo (MM), meio JMV diluído com 50% de água destilada estéril (MA) e meio JMV com 50% de fluido do apoplasto (MLA) - extraído de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515. O RNA total foi extraído, os rRNAs foram removidos, os mRNAs enriquecidos e bibliotecas de cDNA construídas com sequenciamento em sequenciador Ion Torrent em parceria com a UFPR. Os resultados dos sequenciamentos foram analisados com o programa CLC. Os resultados mostraram 503 genes reprimidos e 157 genes induzidos na presença do fluido do apoplasto (MLA) em comparação ao meio completo (MM) enquanto que 703 e 387 genes foram reprimidos e induzidos, respectivamente, na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio diluído (MA). Esses genes diferencialmente expressos pertencem a diferentes classes. Genes relacionados à quimiotaxia e ao movimento foram reprimidos na presença do fluido do apoplasto indicando que a bactéria não se movimenta ativamente. A expressão de genes que poderiam ativar respostas de defesa na planta foi reprimida em Ppe8 na presença do fluido do apoplasto, dentre eles estão os genes envolvidos na biossíntese de lipopolissacarídeos (LPS), exopolissacarídeos (EPS) e peptídeoglicano, além de flagelos também envolvidos em quimiotaxia, conforme discutido acima. Houve expressão diferencial de genes envolvidos com o metabolismo de carboidratos, aminoácidos, íons orgânicos, lipídeos e produção e conversão de energia dentre outras classes, indicando que o metabolismo de Ppe8 é ativo na presença do fluido do apoplasto. Com o objetivo de selecionar genes normalizadores para validar as análises de transcriptômica, a estirpe Ppe8 foi cultivada em meio JMV com cinco fontes de carbono distintas (ácido aconítico, glicose, frutose, sacarose, manitol) e o caldo de cana. As análises realizadas com os programas GeNorm e NormFinder indicaram os genes *lpxC*, *gyrB* e *recA* como os genes de referência mais estáveis. A robustez dos dados obtidos nos estudos de RNA-seq foi confirmada através da análise de expressão de sete genes selecionados aleatoriamente (*bceE*, *fliP1*, *icmF1*, *nifE*, *paaF*, *secD* e *tsf*) por RT-qPCR, usando-se os genes *lpxC* e *recA*, previamente testados, como genes de referência. Os resultados deste estudo sugerem que a estirpe Ppe8 de *B. tropica* altera a expressão de genes na presença do líquido do apoplasto principalmente para fazer uso dos compostos presentes no fluido do apoplasto, bem como evitar a indução dos mecanismos de defesa da planta. Este é um estudo pioneiro de compreensão da expressão molecular de genes na estirpe Ppe8 cultivada em presença de compostos de plantas de cana-de-açúcar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Expressão gênica. Fixação biológica de nitrogênio. Genes normalizadores.

## ABSTRACT GENERAL

SILVA, Paula Renata Alves da. **The apoplast fluid from sugarcane modulates global transcriptomic profile of diazotrophic bacteria *Burkholderia tropica* in vitro.** 2016. 165p Thesis (Doctorate in Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Many diazotrophic bacteria colonize preferentially internal plant tissues and among them we found the species *Burkholderia tropica* that present low survival in soil. There are reports showing that endophytic bacteria are located in the sugarcane apoplast, an ecological niche that has unique characteristics that enable its colonization by bacteria due to the reducing competition for nutrients, protection to oxygen excess, sources of carbohydrates, amino acids, organic ions and others. However, the mechanisms of bacteria - apoplastic fluid interaction are not well elucidated and therefore the transcriptomic is a tool that may help to know better the phenomenon. In this sense, an experiment was conducted comparing the growth of bacteria in three different conditions: complete JMV (MM), JMV diluted with 50% of sterile distilled water (MA) and a JMV with 50% apoplast fluid (MLA) - extracted from plants of sugarcane variety RB867515. Total RNA was extracted, the rRNAs were removed, enriched mRNAs and cDNA libraries made and sequenced using the Ion Torrent sequencer in partnership with the UFPR. The results of sequencing were processed with the CLC program. Data analysis showed that 503 genes were repressed and 157 genes were induced in the presence of apoplast fluid (MLA) compared to the complete medium (MM) while 703 and 387 genes were repressed and induced, respectively in the apoplast the presence as compared to the diluted medium (MA). These differentially expressed genes belong to different classes. Genes related to chemotaxis and movement were repressed in the presence of apoplast fluid indicating that the bacteria do not actively move in the apoplast fluid. Genes that could activate defense responses in plants were repressed by the presence of apoplast fluid and among them are genes involved in biosynthesis of lipopolysaccharide (LPS), exopolysaccharides (EPS) and peptidoglycan. There was differential expression of genes involved in metabolism of carbohydrates, amino acids, inorganic ions, and lipid production and conversion of energy and other classes, indicating that the Ppe8 strain metabolism is active in presence of apoplast fluid. In order to select normalizing genes to validate the transcriptomic analyzes, the Ppe8 strain was cultured in JMV medium with five different carbon sources (aconitic acid, glucose, fructose, sucrose, mannitol) and also sugarcane juice. The analyses, carried out with the GeNorm and NormFinder programs, indicated the *lpxC* genes *gyrB* and *recA* as the most stable reference genes. The robustness of the data obtained from the RNA-seq studies was confirmed by analysis of expression of seven genes randomly selected (*bceE*, *fliP1*, *icmF1*, *nifE*, *paaF*, *secD* e *tsf*) by RT-qPCR using genes *lpxC* and *recA*, previously tested as reference genes. The results of this study suggest that *B. tropica* strain Ppe8 alters the expression of genes in the presence of the apoplast liquid mainly to make use of compounds present in the apoplast fluid as well as to avoid the induction of defense mechanisms of the plant. This is a pioneer study allowing to understand the molecular expression of genes in strain Ppe8 grown in presence of carbon compounds present in sugarcane plants.

**KEY-WORDS:** Genic expression. Biological fixing nitrogen. Normalizing genes.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** RNA total extraído de *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada em meio JMV suplementado com diferentes fontes de carbono. Canaletas: 1 e 11 - marcador de peso molecular 1kb plus; 2, 3 e 4 - meio JMV com 0,5% sacarose; 5, 6 e 7 - meio JMV com 0,5% glicose; 8, 9 e 10 - meio JMV com 0,5% frutose; 12, 13 e 14 - meio JMV com 0,5% manitol; 15, 16 e 17 - meio JMV com 0,5% de ácido aconítico; e 18, 19 e 20 - caldo de cana-de-açúcar. Todos os tratamentos com triplicatas biológicas 1, 2 e 3..... 35
- Figura 2.** Produto de PCR amplificado com iniciadores específicos de *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada em meio JMV suplementado com 0,5% de diferentes fontes de carbono ou caldo de cana. Canaletas: 1 e 12 - marcador de peso molecular 1kb; 2 e 13 - controle positivo (DNA Ppe8); 3, 4 e 5 - sacarose; 6, 7 e 8 - glicose; 9, 10 e 11 - frutose; 14, 15 e 16 - manitol; 17, 18 e 19 - de ácido aconítico; e 20, 21 e 22 - caldo de cana-de-açúcar. Todos os tratamentos em triplicata biológica. .... 36
- Figura 3.** Valores de  $C_T$  de seis genes de referência determinados em *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada em seis diferentes fontes de carbono. Os valores de  $C_T$  foram mensurados de três réplicas biológicas. Barras significam o desvio padrão. .... 37
- Figura 4.** Análise da estabilidade de expressão de seis genes candidatos usando o programa GeNorm. Valor da estabilidade de expressão média (M), genes à direita são os mais estáveis e os genes à esquerda os menos estáveis. .... 38
- Figura 5.** Determinação do número ótimo de genes normalizadores. Cada barra representa alteração na precisão quando mais um gene é adicionado de acordo com a ordem estabelecida na Figura 8..... 39
- Figura 6.** Estabilidade da expressão dos genes para os seis genes candidatos a partir da análise com o programa NormFinder..... 40
- Figura 7.** Determinação do número ótimo de genes normalizadores nas fontes de carbono separadamente e todas juntas..... 41
- Figura 8.** Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos em *B. tropica* estirpe PPe8 cultivada no meio JMV suplementado com diferentes fontes de carbono e caldo de cana. Os níveis de expressão dos genes foram quantificados usando RT-qPCR e a expressão relativa usando a fórmula  $Q=E^{-\Delta Cq}$  usando o programa qBase v1.3.5. Os genes *lpxC*, *recA* e *gyrB* foram usados como referência para a normalização dos dados e a expressão em células cultivadas com manitol foi usada como calibrador (controle) igual a 1 (RQ=1). Barras indicam o desvio padrão..... 42
- Figura 9.** Curva de crescimento da *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 cultivada em meio JMV suplementado com sacarose e pH 5,5. Os dados representam a média de três repetições em cada intervalo. Barras representam o desvio padrão da média. .... 64
- Figura 10.** Metodologia do cultivo de Ppe8. O experimento foi conduzido em triplicata biológica. .... 65
- Figura 11.** RNA total extraído de *B. tropica* Ppe8 cultivado nos diferentes meios P-Marcador 1kb plus. Triplicatas biológicas: 1, 2 e 3 - Tratamento JMV+JMV; 4,5 e 6 - Tratamento JMV+água; 7, 8 e 9 - tratamento JMV+líquido do apoplasto..... 66
- Figura 12.** Box plot dos níveis de expressão (RPKM) dos genes nas nove amostras de *B. tropica* estirpe Ppe8. .... 74

**Figura 13.** Análise dos componentes principais dos valores dos níveis de expressão em RPKM do transcriptoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 em três condições de cultivo. Círculos vermelhos, verdes e azuis representam os tratamentos MA, MM e MLA, respectivamente... 75

**Figura 14.** Distribuição dos genes diferencialmente regulados de *B. tropica* estirpe Ppe8 pelo fluido do apoplasto de acordo com a categoria do COG. Genes diferencialmente expressos na presença do fluido do apoplasto quando comparado ao meio diluído apresentam barras em cor cinza e genes diferencialmente expressos na presença do fluido do apoplasto quando comparado ao meio completo apresentam barras em cor preta. B: Dinâmica e estrutura da cromatina, J: Tradução, estrutura ribossomal e biogênese, V: Mecanismos de defesa, D: Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo, F: Transporte e metabolismo de nucleotídeos, U: Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular, L: Replicação, recombinação e reparo, H: Metabolismo e transporte de coenzimas, O: Modificação pós-transducional, recuperação de proteínas e chaperonas, S: Função desconhecida, P: Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, Q: Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, I: Metabolismo e transporte de lipídeos, M: Parede celular, membrana e biogênese do envelope, N: Motilidade celular, K: Transcrição, C: Produção e conversão de energia, G: Metabolismo e transporte de carboidratos, R: Funções gerais, E: Metabolismo e transporte de aminoácidos, T: Mecanismos de transdução de sinais. .... 78

**Figura 15.** Genes reprimidos por Ppe8 na presença do apoplasto em comparação ao meio completo. Genes que não apresentam barras (*fold change*), não foram diferencialmente expressos. .... 82

**Figura 16.** Cascata regulatória da quimiotaxia (Fonte: Adaptado de Russel, 2012). Os genes representados nas figuras foram reprimidos por Ppe8 na presença do fluido do apoplasto em comparação com o meio completo. MCPs ativam histidina kinases de CheA via uma proteína adaptadora CheW, CheA se autofosforila e transfere o fosfato para um regulador de resposta CheY que se difunde e interage com proteínas flagelares. Então CheY é desfosforilado por uma fosfatase CheZ, uma metiltransferase CheR adiciona grupos metil a resíduos de glutamato de receptores para modular a atividade de CheA, outro regulador de resposta CheB, é fosforilado por CheA ativando a atividade de metiltransferase para restaurar CheR através da demetilação de CheA, em adição a deaminase CheD converte resíduos de glutamina conservados de receptores para glutamato, aumentando a disponibilidade de substratos para CheR e uma fosfatase CheC ativa CheD formando um complexo com CheY fosforilado. .... 83

**Figura 17.** Proteínas envolvidas na montagem flagelar (Fonte: adaptado de KEGG Pathway). O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cor vermelho claro foram reprimidos em Ppe8 cultivada em meio contendo líquido do apoplasto em comparação ao meio completo. .... 84

**Figura 18.** Genes induzidos no *operon* do genoma de Ppe8 pelo fluido do apoplasto em comparação ao meio diluído (MA) e meio completo (MM). .... 87

**Figura 19.** Proteínas constituintes dos sistemas de secreção bacteriano. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. O genes que estão em caixas de cores azul escuro e vermelho escuro indicam que foram induzidos e reprimidos por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio diluído respectivamente. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway. .... 89

- Figura 20.** Via metabólica da pentose-fosfato. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cores azul escuro indicam que foram induzidos por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio diluído, os genes que estão em caixas em cores vermelho escuro e vermelho claro indicam que foram reprimidos no genoma de Ppe8 na presença do fluido apoplasto em comparação ao meio diluído e meio completo, respectivamente. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway. .... 91
- Figura 21.** Via metabólica glicolítica. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de *Burkholderia* endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cores azul escuro e vermelho escuro indicam que foram induzidos e reprimidos respectivamente no apoplasto em comparação ao meio diluído e o gene em caixa roxa escura indica que foi reprimido no apoplasto tanto em comparação ao meio diluído quanto no meio completo. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway..... 93
- Figura 22.** Via metabólica do ácido cítrico. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cores azul escuro e azul claro indicam que foram induzidos por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio diluído e no meio completo respectivamente, o gene em caixa roxa clara indica que foi induzido por Ppe8 no apoplasto tanto em comparação ao meio diluído quanto no meio completo e o gene em caixa vermelha clara indica que foi reprimido por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio completo. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway. .... 95
- Figura 23.** Via metabólica da fosforilação oxidativa. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cores azul escuro e azul claro indicam que foram induzidos por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio diluído e meio completo respectivamente e os genes marcados em roxo escuro foram reprimidos no apoplasto em ambas as condições. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway..... 96
- Figura 24.** Modelo com as principais classes diferencialmente expressas por Ppe8 na presença do fluido do apoplasto. Classes com a letra "x" em vermelho indicam que foram reprimidas na presença do apoplasto e classes sem a letra "x" indicam que foram induzidas na presença do apoplasto. .... 101
- Figura 25.** Formação de película pela *B. tropica* nas quatro repetições biológicas (A, B, C e D, respectivamente) nas três réplicas técnicas (T1, T2 e T3). (Foto: SILVA, 2012) ..... 115
- Figura 26.** Características morfológicas de *B. tropica* em placa contendo meio DYGS (A) e JMV (B). (Foto: SILVA, 2012). .... 115
- Figura 27.** DNA extraído de *B. tropica* estirpe. Canaletas: 1-Marcador 1kb plus; 2, 3 e 4-*B. tropica* estirpe Ppe8 (repetições 1, 2 e 3 respectivamente); 5-*G. diazotrophicus* e 6- Controle negativo (água). .... 116
- Figura 28.** Produto PCR amplificado de *B. tropica* estirpe Ppe8 realizada com iniciadores espécie-específico. Canaletas: 1-Marcador 1kb plus; 2, 3 e 4 *B. tropica* estirpe Ppe8 (repetições 1, 2 e 3, respectivamente); 5 e 6 *G. diazotrophicus* (repetições 1 e 2, respectivamente) e 7-Controle negativo (Água)..... 117

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Função dos genes usados para determinação de um controle interno nas reações de RT-qPCR. ....	31
<b>Tabela 2.</b> Características dos iniciadores para a normalização dos genes candidatos. ....	31
<b>Tabela 3.</b> Características dos iniciadores dos genes alvo.....	33
<b>Tabela 4.</b> Comparação dos programas GeNorm e NormFinder no cálculo da estabilidade dos genes em cada fonte de carbono. ....	41
<b>Tabela 5.</b> Caracterização dos iniciadores de <i>B. tropica</i> estirpe Ppe8 usados na validação do RNA-seq por RT-qPCR. Nome do gene, sequências dos iniciadores, tamanho do amplicon gerado, concentração e temperatura de anelamento. ....	72
<b>Tabela 6.</b> Resumo dos dados de RNA-seq .....	73
<b>Tabela 7.</b> Genes de <i>B. tropica</i> estirpe Ppe8, diferencialmente expressos no MA (meio diluído) (calibrador=1) em relação ao MM (meio puro) ou MLA (meio com fluido do apoplasto). ....	76

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL .....	3
2.1. A importância da cana-de-açúcar .....	3
2.2. Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em cana-de-açúcar .....	3
2.3. Importância do estudo do gênero <i>Burkholderia</i> .....	4
2.4. Nicho ecológico da <i>Burkholderia</i> em plantas .....	6
2.5. Caracterização do nicho ecológico em cana-de-açúcar e a importância do apoplasto .....	8
2.6. Genômica funcional: abordagem do transcriptoma .....	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	13
4. CAPÍTULO I .....	23
4.1. RESUMO .....	24
4.2. ABSTRACT .....	25
4.3. INTRODUÇÃO .....	27
4.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.4.1. Estirpe bacteriana, condições de crescimento e extração do RNA .....	29
4.4.2. Síntese do cDNA .....	30
4.4.3. Genes de referência candidatos e desenho dos iniciadores .....	30
4.4.4. Condições das reações de RT-qPCR .....	31
4.4.5. Análise da expressão dos genes candidatos para uso como normalizadores .....	32
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.6. CONCLUSÕES .....	47
4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
5. CAPÍTULO II .....	57
5.1. RESUMO .....	58
5.2. ABSTRACT .....	60
5.3. INTRODUÇÃO .....	61
5.4. MATERIAL E MÉTODOS .....	63
5.4.3. Coleta do apoplasto .....	63



5.4.4. Cultivo bacteriano .....	63
5.4.5. Experimentos do perfil transcriptômico e análises .....	65
5.4.6. Depleção rRNA.....	66
5.4.7. Preparo de cDNA.....	67
5.4.8. RT-qPCR .....	71
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.6. CONCLUSÕES .....	102
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	103
6.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
7. ANEXOS.....	113

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas semi-perenes cultivadas no Brasil, sendo este país o maior produtor mundial com aproximadamente 9 milhões de ha (hectares) ocupados pela cultura (CONAB, 2016). A área plantada com a cultura vem crescendo ao longo dos anos principalmente em virtude do uso de etanol como combustível alternativo e renovável contribuindo com a redução do uso de combustíveis fósseis e consequentemente reduzindo os impactos ambientais causados pelos derivados do petróleo.

Com o aumento da área plantada, consequentemente há um maior gasto com insumos na produção, principalmente de adubos. O nitrogênio, apesar de ser requerido em pequenas quantidades devido ao melhoramento genético da cana-de-açúcar que fez com que as plantas fossem selecionadas em solos pobres do nutriente, ainda é muito usado principalmente nas plantas socas. A preocupação com o uso de nitrogênio mineral ou orgânico advém principalmente da contaminação de mananciais e águas subterrâneas (HOEFT, 1990) e também por aumentar as emissões de óxido nitroso ( $N_2O$ ) na atmosfera (NOVOA & TAJEDA, 2006), o que pode favorecer o efeito estufa, uma vez que este composto tem potencial impactante 296 vezes maior que o  $CO_2$  (IPCC, 2007). Outro problema está relacionado ao mecanismo de obtenção do nutriente, normalmente utilizando recursos como o petróleo, combustível este que é esgotável, não renovável e de custo elevado. Além disso, do total do mineral consumido pelo Brasil, cerca de 75% do nitrogênio é proveniente de importações de outros países, gerando uma grande relação de dependência externa (ANDA, 2012).

Uma alternativa para reduzir esta relação de dependência, custos com insumos nitrogenados e impactos ambientais, seria o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas, principalmente no que diz respeito à sua interação com as plantas, o que pode tornar os sistemas agrícolas muito mais sustentáveis, produtivos e de baixo custo.

No sistema natural são encontrados diversos microrganismos que possuem o complexo da nitrogenase e, portanto fixadores de  $N_2$ . Estão presentes em diversos locais como solo, planta, água, entre outros, ocorrendo de forma livre ou em interações diversas (ALVES, 2007). A fixação biológica de nitrogênio cataliza a redução do  $N_2$  atmosférico a amônia biologicamente disponível sendo uma importante via de entrada de nitrogênio nos ambientes aquáticos e terrestres (VITOUSEK & HOWARTH, 1991; ARP, 2000).

Existem diversos microrganismos conhecidos que realizam este processo, porém a associação de microrganismos diazotróficos endofíticos com plantas não leguminosas ainda não é completamente entendida. Algumas bactérias diazotróficas colonizam preferencialmente os tecidos vegetais internos e dentre elas encontram-se a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azoarcus* spp. e *Burkholderia* spp. que possuem baixa sobrevivência no solo sem planta e um espectro restrito de plantas hospedeiras (BALDANI *et al.*, 1997). Este nicho ecológico foi definido por DOBEREINER (1992) como endofítico. Existem relatos de bactérias diazotróficas endofíticas que se localizam no apoplasto (DONG *et al.*, 1994; JAMES *et al.*, 2001; MATTOS *et al.*, 2008). DONG *et al.* (1997) e MCCULLY (2001) também verificaram que o apoplasto é o nicho mais adequado para bactérias endofíticas. DONG *et al.* (1994) verificaram a presença de um endófito fixador de nitrogênio (*G. diazotrophicus*) vivendo no fluido apoplástico de plantas de cana, e FUENTES RAMIREZ *et al.* (1999) confirmaram a presença desta bactéria no xilema e apoplasto. O gênero *Burkholderia* compreende 96 espécies isoladas de diversos ambientes como, por exemplo, água de rio, sedimentos, solo, rizosfera de plantas, homem, animais e

interior dos tecidos de plantas (LPNS, 2016). Nos últimos anos, algumas espécies de *Burkholderia* foram isoladas da rizosfera e tecidos internos de cana-de-açúcar com a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e dentre elas destacam-se a *B. unamae*, *B. tropica* e *B. silvatlantica* (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2004; PERIN *et al.*, 2006). Bactérias deste gênero também podem promover o crescimento de plantas e apresentar atividade antagônica aos patógenos *Fusarium verticillioides*, *Xanthomonas albilineans*, *Rhizoctonia solani* e *Verticillium dahliae* (LUVIZOTTO *et al.*, 2010; GASSER *et al.*, 2011; TENORIO-SALGADO *et al.*, 2013; BERNABEU *et al.*, 2015). Para o conhecimento aprofundado de como a interação bactéria-planta ocorre, de quais mecanismos moleculares e genéticos os microrganismos usam para o reconhecimento e estabelecimento com a planta, há a necessidade do uso de ferramentas moleculares.

A transcriptômica é uma ferramenta molecular que pode auxiliar no entendimento desses mecanismos envolvidos na interação bactéria-planta. YODER-HIMES *et al.* (2009) ao realizarem a análise do transcriptoma de dois isolados de *B. cenocepacia*, AU1054 e HI2424, isolados de paciente com fibrose cística e solo respectivamente, verificaram que o genoma dos dois isolados apresenta 99,8% de identidade entre si, que o isolado AU1054 contém 50 genes ausentes em HI2424, e que este último contém 470 genes ausentes no primeiro, sendo todos esses genes provavelmente responsáveis pela adaptação ao nicho específico de cada isolado. A bactéria diazotrófica *H. seropedicae*, quando cultivada na presença do flavonóide nanrigenina, apresentou 382 genes diferencialmente expressos, e dentre os genes encontrados, foram identificados genes relacionados à biossíntese de flagelos e peptídeoglicano foram reprimidos (TADRA-SFEIR *et al.*, 2015). Já o transcriptoma de duas estirpes de *Azospirillum* inoculadas em duas cultivares de arroz identificou que tanto as estirpes quando as cultivares afetam a expressão de genes de *Azospirillum*, porém o efeito dos genótipos é maior, indicando que existe uma clara interação planta-bactéria (DROGUE *et al.*, 2014). Já *B. phytofirmans* inoculadas em plantas de batata apresentou expressão diferencial de genes com funções importantes para a colonização endofítica da planta, como genes relacionados à quimiotaxia e motilidade (SHEIBANI-TEZERJI *et al.*, 2015). Todos esses trabalhos indicam que o estudo do transcriptoma bacteriano pode auxiliar na compreensão da interação planta-bactéria.

Na busca pelo conhecimento da interação planta-bactéria e melhor entendimento da regulação de vias metabólicas e sistemas biológicos, tem se lançado mão de técnicas baseadas na análise transcriptômica com o objetivo de verificar a funcionalidade bacteriana e vegetal envolvida durante o processo da interação direcionando estudos com abordagens mais racionais e específicas. Além disso, o estudo do transcriptoma de cada organismo é de grande importância para a identificação de genes, e também incorpora informações sobre o funcionamento do seu genoma. Este trabalho representa uma primeira etapa na identificação de genes do microrganismo *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 expressos na presença do fluido do apoplasto de cana-de-açúcar através de dados obtidos por RNA-seq.

E como hipótese científica propõe que o líquido do apoplasto de cana-de-açúcar modula a expressão de gênica da *B. tropica* estirpe Ppe8.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A importância da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), pertencente à família *Poaceae*, é caracterizada como monocotiledônea semi-perene (MATSUOKA *et al.*, 1999). É originária de Nova Guiné e foi amplamente dispersa através de migrações humanas sendo disseminada para o sudeste da Ásia, Índia e Pacífico. Chegou ao Mediterrâneo entre 1400-600 a.c., de lá foi levada para Egito, Síria, Grécia e Espanha e posteriormente introduzida no oeste da África e subsequentemente na América do Sul e Central e oeste da Índia (CANABRAVA, 1991).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil no início do século XVI, quando foi iniciada a instalação de engenhos de açúcar, a primeira indústria implantada na nova possessão de Portugal, que em pouco tempo substituiu a indústria extrativa do pau-brasil (CANABRAVA, 1991).

Atualmente a área de cana-de-açúcar a ser colhida e destinada à atividade sucroalcooleira está estimada em 8.995,5 mil hectares na safra 2015/2016. Dentre os estados produtores, São Paulo é o maior com 52% (4.678,7 mil hectares), seguido por Goiás com 10,1% (908 mil hectares), Minas Gerais com 9% (811,2 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,5% (677,9 mil hectares), Paraná com 6,6% (596 mil hectares), Alagoas com 3,8% (338,3 mil hectares), Pernambuco com 2,9% (264 mil hectares) e Mato Grosso com 2,6% (230,3 mil hectares). Estes oito estados são responsáveis por 94,5% da produção nacional. Nos demais estados produtores as áreas são menores, com representações abaixo de 6%. Na safra 2015/16 a produtividade média brasileira está estimada em 73.228 kg.ha<sup>-1</sup>, 3,9% maior que na safra 2014/15 (CONAB, 2016). No cenário mundial da produção da cana-de-açúcar o Brasil é o maior produtor e a cultura gera mais de um milhão de empregos diretos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A cultura para apresentar produtividade média de 100 Mg.ha<sup>-1</sup> de colmos, acumula em sua parte aérea, 180-250 e 120-180 kg.ha<sup>-1</sup> de N na cana planta e nas soqueiras, respectivamente (XAVIER, 2002). Considerando-se que as quantidades de N-fertilizante aplicadas não ultrapassam a dose de 80 kg.ha<sup>-1</sup> de N em média, o restante pode ser proveniente do N do solo, que é naturalmente pouco disponível para as plantas, e do processo de FBN (URQUIAGA *et al.*, 1992). Uma alternativa eficiente para reduzir a aplicação desta grande quantidade de insumo seria a fixação biológica de nitrogênio. Existem mecanismos moleculares que estão envolvidos nesta interação planta-bactéria e vários genes presentes em diferentes processos fisiológicos, podem estar diferencialmente expressos durante a associação com bactérias endofíticas (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Dependendo da variedade e da interação com bactérias diazotróficas (REIS *et al.*, 2000) a contribuição da FBN para plantas de cana-de-açúcar pode chegar até 60% (BODDEY *et al.*, 2001).

Cerca de 50% do total da produção mundial de cana-de-açúcar, ocorre no Brasil e Índia. No Brasil em particular, a cana tem um papel fundamental na produção de bioetanol, o qual é usado como substituto de combustíveis fósseis nos carros tipo flex.

### 2.2. Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em cana-de-açúcar

O elemento nitrogênio é parte essencial de muitos compostos orgânicos como proteínas e ácidos nucléicos que constituem a base de todas as formas de vida. O nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>) representa aproximadamente 80% da atmosfera terrestre, entretanto, este não

pode ser utilizado diretamente pela maioria dos seres vivos (URQUIAGA, 2012). A fixação biológica de nitrogênio ( $N_2$ ), como já dito, reduz o  $N_2$  atmosférico a amônia sendo uma importante via de entrada de nitrogênio nos diversos ambientes (VITOUSEK & HOWARTH, 1991; ARP, 2000). A FBN pode contribuir significativamente em até 60% de todo o N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar (BODDEY *et al.*, 2001; XAVIER, 2002), dependendo do genótipo da planta e sua interação com os diversos gêneros de bactérias diazotróficas associativas (REIS *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002) e contribui com aproximadamente a metade do total de nitrogênio fixado na agricultura global (FOWLER *et al.*, 2013).

Somente certas bactérias chamadas de diazotróficas ou fixadoras de  $N_2$  são capazes de transformá-lo em  $NH_3$  que as plantas podem usar (DÖBEREINER, 1997). No ambiente, podem ocorrer diversas bactérias fixadoras de  $N_2$  dentre elas aquelas conhecidas como de vida livre, rizosféricas e endofíticas associadas com várias plantas não leguminosas (BALDANI & BALDANI, 2005). Acredita-se que as bactérias endofíticas apresentem certa vantagem quanto à FBN em relação às demais por se localizarem em espaços intercelulares e, portanto estarem menos expostas a fatores ambientais, menor competição e baixa concentração de oxigênio (BALDANI *et al.*, 1997).

Bactérias diazotróficas não causam danos ao hospedeiro, e apresentam ainda diversas características benéficas como promoção do crescimento de plantas pela produção e secreção de reguladores de crescimento, atividade antagonica a fitopatógenos e disponibilização de nutrientes como o ferro e potássio (BENHAMOU *et al.*, 1996). Contudo, a intensidade do estímulo de crescimento vegetal, incluindo a fixação de nitrogênio na planta e a transferência deste nitrogênio fixado para a planta, depende de uma eficiente interação planta-bactéria (BULL *et al.*, 1991).

Diazotrofos endofíticos como a *B. tropica* apresentam estreita associação com o hospedeiro e baixa sobrevivência em solos desprovidos de raízes (BALDANI, 1996). Ao colonizarem os espaços intercelulares e o xilema das plantas, estes organismos são capazes de se disseminar sistemicamente até alcançar tecidos aéreos (JAMES & OLIVARES, 1997). Por ser um gênero cosmopolita, é de grande valia o entendimento dos seus mecanismos, principalmente o conhecimento de mecanismos bioquímicos e moleculares relacionados às espécies fixadoras de nitrogênio.

### **2.3. Importância do estudo do gênero *Burkholderia***

O gênero *Burkholderia* compreende 96 espécies isoladas de diversos ambientes como, por exemplo, água de rio, sedimentos, solo, rizosfera, homem e animais (LPNS, 2016). Está dentro do subfilo  $\beta$ -proteobactéria (YABUUCHI *et al.*, 1991) e são bactérias Gram-negativas. Existem duas principais ramificações neste gênero, uma composta amplamente por patógenos, a outra é composta principalmente de isolados ambientais que podem formar associações não patogênicas com plantas. Dentre as 96 espécies, 20 têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, sendo que algumas espécies possuem a capacidade de colonizar a rizosfera e/ou ambiente endofítico de uma ampla gama de hospedeiros, tais como, milho, sorgo, cana-de-açúcar, abacaxi e café, e outras de nodularem plantas da família das leguminosas (GILLIS *et al.*, 1995; ACHOUAK *et al.*, 1999; COENYE *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2000; COENYE *et al.*, 2001; VANDAMME *et al.*, 2002; CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; GORIS *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006; PERIN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; ELLIOTT *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; AIZAWA *et al.*, 2010; AIZAWA *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA CUNHA *et al.*, 2012; SHEU *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-AGUILAR *et al.*, 2013; SHEU *et al.*, 2013).

Análises genéticas sugerem a existência de dois grandes grupos dentro do gênero da *Burkholderia*, um é compreendido pelo complexo *B. cepacia* (BCC), o grupo das “pseudomallei” e patógenos de plantas bem como patógenos endossimbiontes de fungos fitopatogênicos. Este complexo BCC é abundante no solo e rizosfera de plantas e faz parte de um grupo de agentes patogênicos de grande risco em pacientes com fibrose cística, sendo intrinsecamente resistentes a vários antibióticos, podendo ser transmitidas por contato ou uso de equipamentos durante internações hospitalares (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001; MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2005; COENYE & VANDAMME, 2003; CORREIA *et al.*, 2008). O segundo grupo contém espécies não patogênicas associadas com plantas e/ou de vida livre (SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2012).

Bactérias do segundo grupo têm sido isoladas de distintos lugares podendo uma mesma estirpe ser recuperada de distintos locais e em diferentes nichos. Por exemplo, uma estirpe de *B. caribensis* foi isolada de solos em Martinica enquanto que outra estirpe da mesma espécie foi isolada de nódulos de *Mimosa* spp. em Formosa e China (ACHOUAK *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2011). Estirpes de *B. graminis* têm sido isoladas de solo rizosférico tanto da França quanto da Austrália (VIALARD *et al.*, 1998), e estirpes de *B. tropica* têm sido isoladas de espécies de Poaceas cultivadas no México, Brasil e África do Sul (REIS *et al.*, 2004). Embora muitas delas tenham sido identificadas em associação com plantas podendo ter relação epifítica, endofítica ou interações endossimbióticas, elas também podem ser encontradas em vida livre no solo ou associadas tanto com fungos quanto insetos (SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2012).

A criação do gênero *Burkholderia* deu-se a partir da reclassificação de um grupo homólogo de *Pseudomonas* (STEAD, 1992) com base na análise de ácidos graxos, lipídeos e características fenotípicas (YABUUCHI *et al.*, 1991), e posteriormente em relação à homologia DNA:DNA e DNA:rRNA (TRAN VAN *et al.*, 1994). Este gênero foi originalmente descrito como o agente causal da podridão mole em cebola (BURKHOLDER, 1950), e tem sido encontrado em diferentes tipos de solos e raízes. Bactérias do gênero *Burkholderia* relacionadas às plantas podem ser fitopatogênicas (ALMEIDA *et al.*, 2009; NANDAKUMAR *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012) ou não fitopatogênicas (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2004; CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2007; BORDIEC *et al.*, 2011). Neste último grupo estão relacionadas as bactérias com propriedades importantes tais como, forte potencial para degradar compostos aromáticos, disponibilização de nutrientes via fixação biológica de nitrogênio e/ou solubilização de fosfato, capacidade de colonizar a rizosfera e ou espaços intercelulares em várias plantas, promover o crescimento e capacidade de formar interações simbióticas com plantas (REIS *et al.*, 2004; MATTOS *et al.*, 2008).

Bactérias deste gênero têm genoma com dois ou três cromossomos, variando de 6-9 Mb, característica que confere grande plasticidade e adaptabilidade (MICHÉ *et al.*, 2001). Então, bactérias deste gênero podem colonizar a rizosfera e tecidos internos de uma ampla faixa de plantas hospedeiras (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; PERIN *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2004). Bactérias penetram o interior dos tecidos hospedeiros ou por aberturas naturais ou ferimentos e acredita-se que bactérias do gênero *Burkholderia* colonizem primeiramente a superfície do tecido hospedeiro como a rizosfera e posteriormente através de discontinuidades diversas nos tecidos superficiais podem penetrar e colonizar endofiticamente (ANDREOTE *et al.*, 2006). LUVIZOTTO *et al.* (2010) encontraram dois grupos distintos quando analisaram a diversidade genética de *Burkholderia* spp: um grupo maior é formado por isolados independentemente do nicho de ocupação enquanto o outro

grupo menor é nicho específico evidenciando a mistura de populações rizosférica-endofítica colonizando plantas (LUVIZOTTO *et al.*, 2010).

Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* são comuns e abundantes associadas a inúmeras plantas. Embora exista uma legislação rigorosa de segurança em relação a esse gênero (existem espécies que pertencem à classe de risco 2 e outras à classe de risco 3 de agentes biológicos) (BRASIL, 2006), o conhecimento da interação endofítica dessas bactérias com plantas de cana-de-açúcar é importante para melhor conhecimento e manejo do sistema de produção agrícola.

#### **2.4. Nicho ecológico da *Burkholderia* em plantas**

Espécies de *Burkholderia* podem ocupar diversos nichos ecológicos como, por exemplo, rizosfera, nódulos de leguminosas, solos e espaços internos dos tecidos das plantas colonizando-as endofiticamente. A rizosfera é uma zona biologicamente ativa do solo que envolve as raízes das plantas, e que contém microrganismos incluindo bactérias e fungos. A rizosfera é o local onde se encontra o maior número de espécies de *Burkholderia*. Tem sido especulado que tal preferência pode estar associada com sua versatilidade catabólica que degrada exsudatos radiculares e outros compostos derivados da raiz (CHAIN *et al.*, 2006). Um considerável número de estirpes das espécies *B. unamae*, *B. xenovorans*, *B. tropica*, e *B. silvatlantica* já foi recuperado da rizosfera de diferentes plantas sugerindo ser este o seu principal nicho (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2007; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS *et al.*, 2001; PERIN *et al.*, 2006). É possível que plantas tenham preferência por espécies particulares de *Burkholderia* e que o local geográfico possa ser o principal fator nessa preferência. Por exemplo, *B. unamae* que ocorre na rizosfera de milho, café, cana-de-açúcar e tomate é prevalentemente encontrado na rizosfera de cana no México, mas não no Brasil (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; 2007, PERIN *et al.*, 2006). Similarmente, *B. tropica* foi encontrada ser prevalente na rizosfera de sorgo e milho no México e *B. silvatlantica* foi encontrada prevalentemente na rizosfera de milho e cana no Brasil (PERIN *et al.*, 2006; WONG-VILLARREAL & CABALLERO-MELLADO, 2010). Rizobactérias tem um relacionamento intrínseco com raízes de plantas e esse relacionamento depende da bactéria e da planta envolvidas bem como das características físicoquímicas do solo. A rizosfera é caracterizada por gradientes que ocorrem ao longo de raízes individuais, em termos de nutrientes, de potencial redox e processos de redução, de exsudatos de raiz, de atividade microbiana e de pH. Estes gradientes são determinados por fatores do solo e da planta, afetando assim, a absorção de nutrientes minerais em geral (GAIAD, 2003).

A partir da fotossíntese, o CO<sub>2</sub> assimilado pode ser direcionado em dois processos, um é a respiração da rizosfera ou CO<sub>2</sub> derivado da raiz, incluindo respiração microbiana e radicular utilizando materiais provenientes de raízes vivas e o segundo processo é a decomposição da matéria orgânica. A respiração rizosférica pode variar de 30-80% do total do efluxo do CO<sub>2</sub> subterrâneo em vários ecossistemas (HANSON *et al.*, 2000). Além do carbono, todas as formas de moléculas da planta podem ser encontradas na rizosfera, porém compostos de baixo peso molecular são encontrados em maiores proporções (HANSON *et al.*, 2000). Exsudatos radiculares são geralmente constituídos de compostos de baixo peso molecular e, portanto fáceis de serem decompostos. Esses exsudatos aumentam a densidade microbiana e atividade metabólica na rizosfera (SÖDERBERG & BÅÅTH, 1998). A composição e a quantidade podem variar de acordo com a espécie da planta, ao longo do eixo da raiz, estado fenológico da planta, status nutricional, estresses ambientais e doenças (NEUMANN & RÖMHELD 2007). Sob deficiência nutricional, compostos de exsudatos radiculares tais como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos são liberados primeiramente

na zona imediatamente abaixo da ponta da raiz e na zona distal de alongamento (MARSCHNER *et al.*, 1997), as quais são sítios onde microrganismos são menos abundantes, porém mais ativos (NGUYEN & GUCKERT, 2001). A diferença no tipo e na quantidade de carbono disponível em diferentes zonas radiculares influencia tanto o crescimento microbiano quanto a estrutura distinta da comunidade na rizosfera (MARSCHNER *et al.*, 2001). Esses exsudatos radiculares são uma excelente fonte de carbono (e possivelmente nitrogênio) e energia e favorecem um rápido crescimento de microrganismos na rizosfera desde que tenham a capacidade metabólica correspondente (BAUDOIN *et al.*, 2003).

Isolados de *Burkholderia* spp. também podem colonizar endofiticamente diversas plantas. Endófitos são definidos como microrganismos que são capazes de colonizar os tecidos internos das plantas sem causar sinais de infecção ou efeitos negativos no seu hospedeiro. Existem diversas vantagens em ocupar este tipo de nicho, principalmente menor competição por nutriente e espaço (GILLIS *et al.*, 1995). Embora sua presença seja variável, são frequentemente capazes de aumentar o desenvolvimento da planta via diversos mecanismos como fixação biológica de nitrogênio, produção de hormônio vegetal, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e efeito antagônico a fitopatógenos (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; COMPANT *et al.*, 2010). *B. tropica*, *B. kururiensis*, *B. unamae*, *B. silvatlantica*, *B. phytofirmans*, e *B. acidipaludis* já foram isolados tecidos de plantas esterilizadas superficialmente e são considerados potenciais endófitos.

SUÁREZ-MORENO *et al.* (2010) pesquisando semelhanças e diferenças na regulação do quorum sensing em espécies de *Burkholderia*, verificaram que em arroz, mutantes de *B. kururiensis* M130 defectivos em realizar quorum sensing apresentaram redução na colonização e produção de exopolissacarídeos (EPS) o que poderia indicar que a produção de EPS está envolvida na colonização endofítica de plantas de arroz. EPS têm sido detectados em espécies de *Burkholderia* associados a plantas tais como *B. graminis*, *B. phytofirmans*, *B. phymatum* e *B. xenovorans* e provavelmente estão associados à interação planta-bactéria (FERREIRA *et al.*, 2010). A colonização de plantas de arroz por *B. kururiensis* foi positivamente regulada pelo sistema de quorum sensing (SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2010), indicando que a planta também pode ter um papel na regulação da densidade populacional. CASTRO-GONZÁLEZ *et al.* (2011) estudando a diversidade de *Burkholderia* spp. em cana-de-açúcar, verificaram que entre as espécies diazotróficas, *B. unamae* e *B. tropica* foram as mais predominantemente encontradas sendo cada uma predominante em uma variedade de cana diferente. Os autores sugerem que o tipo e/ou quantidade de exsudatos radiculares estejam envolvidos na interação principalmente em virtude do tipo de composto de carbono exsudado e isto é importante pois se deve levar em consideração a variedade a ser utilizada.

Endófitos diazotróficos podem estimular o crescimento de plantas através de vários mecanismos para além da FBN. Durante a interação com seu hospedeiro, a bactéria detecta metabólitos específicos da planta, os quais são usados como sinais para a expressão gênica da bactéria. Por exemplo, KOBAYASHI *et al.* (2004) verificaram que existe uma ativação de vários genes gerando uma cascata na interação de *Rhizobium* NGR 234 com plantas. Segundo os autores, há uma percepção de sinais pelas plantas, as quais produzem flavonoides e induzem a expressão dos genes *nod* responsáveis pela nodulação, e também ativam o sistema de secreção tipo III.

Em plantas de cana-de-açúcar, o colmo é constituído por espaços intercelulares (apoplasto) e espaços vacuolares (simplasto), os quais tem sido objeto de estudo por muitos anos com objetivo de estudar a colonização endofítica (GLASZIOU & GAYLER, 1972; MOORE, 1995). Endófitos no apoplasto podem auxiliar no crescimento das plantas principalmente pelo aumento da resistência a fatores bióticos ou abióticos, e por contribuir diretamente com a nutrição mineral da planta (SATTELMACHER, 2001). DONG *et al.*



(1994) verificaram a presença de um endófito fixador de nitrogênio (*G. diazotrophicus*) habitando o fluido apoplástico de plantas de cana-de-açúcar, e confirmaram a presença desta bactéria no interior do xilema e apoplasto. Existem relatos que bactérias endofíticas diazotróficas localizam-se no apoplasto de plantas de cana-de-açúcar (DONG *et al.*, 1994; JAMES *et al.*, 2001). DONG *et al.* (1997) e MCCULLY (2001) também verificaram que o apoplasto é o nicho mais adequado para bactérias endofíticas. Vários compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos estão também presentes tanto no apoplasto quanto no simplasto e provavelmente facilitaria a colonização por essas bactérias endofíticas.

## 2.5. Caracterização do nicho ecológico em cana-de-açúcar e a importância do apoplasto

Como já foi dito, *Burkholderia* pode colonizar diferentes nichos pela sua versatilidade metabólica em virtude da sua plasticidade genética. Em plantas de cana existem dois nichos ecológicos principais que é a rizosfera e o interior dos tecidos conhecido como apoplasto.

KIRCHHOF *et al.* (1997) observaram um alto número de bactérias diazotróficas no interior de plantas gramíneas quando não foi aplicada adubação nitrogenada. Neste contexto, YONEYAMA *et al.* (1997) sugeriram que a fertilização nitrogenada no estágio inicial da cultura não afeta negativamente a fixação biológica de nitrogênio. A frequência de algumas bactérias fixadoras de nitrogênio em culturas pode ser reduzida. A população de *G. diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar reduz proporcionalmente com a quantidade de fertilizantes nitrogenados nos campos de cultivos (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 1995; FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1999). Porém a população de outros diazotróficos como *Herbaspirillum* spp. não foi afetada pela aplicação de nitrogênio mineral (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 1999). TEJERA *et al.* (2004) verificaram que um menor número de isolados de bactérias diazotróficas foi recuperado de solos com pH 8,7 e menor conteúdo de matéria orgânica 1,19%, conteúdo de N 0,07%, e conteúdo de nitrato de 2,06 mg.kg<sup>-1</sup>. Diazotróficas como *G. diazotrophicus* são sensíveis a altas doses de adubações nitrogenadas (400-500 kg N.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>) outros efeitos também podem estar envolvidos como diferentes variedades e outros fatores ambientais (MUTHUKUMARASAMI *et al.*, 1999; REIS JÚNIOR *et al.*, 2000).

SHENG *et al.* (2012) verificaram a diversidade de microrganismos na rizosfera de cana-de-açúcar nos estádios de canas planta e canas soca pois em experimentos anteriores verificaram que o padrão de exsudação radicular poderia ser alterado em cada corte de cana e por isso poderia interferir nos microrganismos existentes. Os autores verificaram uma ampla variedade de grupos e mais especificamente ao nosso interesse quando analisaram a rizosfera de locais mantidos em pousio, Proteobacteria foi encontrada em 10,42%, quando a rizosfera de cana-planta foi analisada e 14,58% quando analisaram a rizosfera de cana-soca. Bactérias do gênero *Burkholderia* estão incluídas no grupo das  $\beta$ -Proteobactérias e quando plantas de cana estão presentes, através desses dados pode-se verificar um aumento na população de bactérias deste grupo no decorrer do cultivo da planta. Os autores concluem que após um ano de cultivo da cana, devido ao acúmulo de exsudatos e resíduos das plantas, a abundância de bactérias participantes no ciclo do carbono aumenta e promove a decomposição e reutilização de carboidratos para outros microrganismos que se beneficiam (SHENG *et al.*, 2012). EL-AMIN & SAADABI (2007) coletaram amostras da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar no Sudão de 20 locais diferentes para verificar a população fúngica, o pH, conteúdo de matéria orgânica e conteúdo total de fósforo (P), potássio (K) e nitrogênio (N). Os autores verificaram que o conteúdo de K variou de 0,9-4,9%, P variou de 6-89 ppm, N variou de 0,11-1,18% e o pH variou muito pouco de 4,9-6,6. Pode-se perceber que dependendo do local de coleta a

quantidade de macronutrientes pode variar bastante e talvez isso possa influenciar o estabelecimento de bactérias do gênero *Burkholderia*, porém o pH não variou tanto.

Em experimento realizado por SILVA *et al.* (2012) (dados não publicados), os autores verificaram que *B. tropica* pode crescer em diferentes fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e cloreto de amônio) e em diferentes pHs como 4,5, 5,0, e 5,5 se estabelecendo mais rapidamente quando a fonte utilizada de N foi sulfato de amônio e no pH 5,5 e portanto essas variações de macronutrientes, conteúdo e fonte de carbono e pH possam interferir no estabelecimento da bactéria. TIRONI *et al.* (2009), ao verificarem a ação de herbicidas na atividade de bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera de cana, realizaram uma análise química do solo rizosférico dessas plantas em cinco locais e perceberam que o pH fica em torno de 5,5-6,5, faixa ideal para bactérias do gênero *Burkholderia*. PISA *et al.* (2011) também verificaram que o pH da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar fica em torno de 5,5 e que o grupo mais abundante encontrado nessa região é formado por bactérias pertencentes a Proteobacteria, filo da *Burkholderia*.

As plantas normalmente estão associadas a altas densidades e diversidades de microrganismos e, existe íntima e peculiar relação entre estes e seus hospedeiros, (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; HARDOIM *et al.*, 2008). Muitas bactérias benéficas interagem com a planta e algumas bactérias fixadoras de N, como já dito, são capazes de colonizar o interior dos tecidos. DÖBEREINER *et al.* (1992) introduziram o termo endofítico na área de FBN para descrever as bactérias fixadoras de N com a capacidade de colonizar o interior dos tecidos de gramíneas (Poaceae).

Endófitos diazotróficos podem estimular o crescimento de plantas através de vários mecanismos. Alguns fatores afetam diretamente o crescimento da planta como a solubilização de fosfato, síntese de fitohormônios e vitaminas essenciais, modulação das vias de sinalização tais como a da síntese de etileno e resistência a estresses (SPAEPEN *et al.*, 2007). Indiretamente, podem proteger as plantas de fitopatógenos pela produção de compostos tóxicos ao patógeno (DOBBELAERE *et al.*, 2003; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; RYAN *et al.*, 2008). Durante a interação com seu hospedeiro, a bactéria detecta metabólitos específicos da planta, os quais são usados como sinais para a expressão gênica da bactéria. Por exemplo, KOBAYASHI *et al.* (2004) verificaram que existe uma ativação de vários genes gerando uma cascata na interação de *Rhizobium* NGR 234 com plantas. Segundo os autores, há uma percepção de sinais pelas plantas, as quais produzem flavonoides e induzem a expressão dos genes *nod* responsáveis pela nodulação, e também ativam o sistema de secreção tipo III.

Em cana-de-açúcar, TEJERA *et al.* (2004) verificaram a existência de aminoácidos e amônia no apoplasto. A composição de aminoácidos foi também investigada nas plantas (var. NCo 310) cultivadas em ambiente controlado sem nitrogênio e inoculadas com *G. diazotrophicus* PAL-5, e interessantemente, o conteúdo total de aminoácidos no apoplasto foi cerca de seis vezes menor que nas plantas cultivadas no campo na presença de fertilizante nitrogenado (TEJERA *et al.*, 2006). Os autores sugerem ainda que a presença de *G. diazotrophicus* no apoplasto pode ser afetada pela quantidade de alguns aminoácidos e que a baixa quantidade de alguns aminoácidos nas plantas inoculadas com o endófito quando comparado às plantas não inoculadas sugerem ainda papel fundamental desses aminoácidos na associação planta-endófito (TEJERA *et al.*, 2006). No caso da cana-de-açúcar esse nicho favorece as bactérias por disponibilizar carbono como fonte de energia, o que é primordial para a sobrevivência dos endófitos (ASSIS JÚNIOR *et al.*, 2004). TEJERA *et al.* (2006) analisaram ainda, o conteúdo do líquido do apoplasto de três variedades de plantas de cana-de-açúcar cultivadas na Espanha e verificaram que o teor de açúcar, aminoácidos, proteínas, amônio, nitrato e nitrito, variou de 150-170 mg.mL<sup>-1</sup>, 2-6 mg.mL<sup>-1</sup>, 2-3 m. mL<sup>-1</sup>, 2-3 µg.mL<sup>-1</sup>,

1-1,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 890-910  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente. Portanto, o teor desses produtos pode variar com a variedade.

ASSIS JÚNIOR *et al.* (2004) analisaram o conteúdo de ácidos orgânicos e açúcar no líquido do apoplasto de duas cultivares de plantas de cana cultivadas no Japão, através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e demonstraram que o fluido do apoplasto da cana-de-açúcar contém aconitato, malato e citrato além de ácidos orgânicos e açúcares como a sacarose, a frutose e a glicose. Os autores também verificaram que *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans* utilizam preferencialmente sacarose e aconitato como fonte de carbono respectivamente (ASSIS JÚNIOR *et al.*, 2004). Provavelmente esses ácidos orgânicos e fontes de açúcares são essenciais para bactérias endofíticas diazotróficas em troca do nitrogênio fixado como fonte de energia em qualquer porção do caule e em qualquer idade da planta. Esse resultado se assemelha com os encontrados por BELLONE & BELLONE (2006) que ao verificarem diazotróficos no caldo de duas variedades de cana-de-açúcar na Argentina, realizaram também ensaios para verificarem o conteúdo de ácidos orgânicos e açúcares e encontraram o açúcar glicose variando de 5-8%, e os ácidos orgânicos aconitato, citrato, malato, fumarato, oxalato, glicolato e succinato em torno de 1,0; 0,15; 0,13; 0,1; 0,12; 0,05 e 0,019  $\text{mg.100mL}^{-1}$  respectivamente. Os autores relataram que a quantidade de glicose no ápice do caule é maior que sacarose e conforme segue até a base o inverso se torna verdadeiro, e explicam isso dizendo que o ápice é a região de crescimento e, portanto, os níveis de fonte de carbono são menores (sacarose e glicose, 15 e 18  $\text{mg.100mL}^{-1}$ , respectivamente) quando comparado a base (sacarose e glicose, 163 e 6  $\text{mg.100mL}^{-1}$  respectivamente). Os autores sugerem que esta quantidade diferencial dessas duas fontes de carbono seja responsável por alterações espaciais de diazotróficos (BELLONE & BELLONE, 2006). DONG *et al.* (1994) ao estudarem o conteúdo do líquido do apoplasto de duas variedades de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Cuba, verificaram que o conteúdo de sacarose variou de 11-13% (p/v) e o pH do fluido em torno de 5,5. REIS *et al.* (2004) ao descreverem a espécie *B. tropica* verificaram que a mesma cresce bem numa faixa de pH que varia de 4,5-6,5, cresce de uma forma mais lenta numa faixa de pH variando de 7,0-7,5 e tem uma faixa ótima de crescimento de pH que é em torno de 5,0-5,8. Portanto, o experimento de DONG e colaboradores (1994) o qual informa que o pH do fluido está em torno de 5,5 sugere que provavelmente este seja o nicho ideal de *B. tropica* se considerarmos apenas o fator pH. Existem evidências que consideram que bactérias do gênero tem a característica de colonizar ambientes com o pH próximo ao neutro (LIESACK *et al.*, 1997), porém já existem evidências de uma alta abundância deste tipo de bactéria em ambientes mais ácidos (NOGALES *et al.*, 2001; REIS *et al.*, 2004). REIS *et al.* (2004) também verificaram que *B. tropica* pode utilizar diversas fontes de carbono como fonte de energia como por exemplo açúcares e ácidos orgânicos.

## 2.6. Genômica funcional: abordagem do transcriptoma

O fenótipo de um organismo qualquer pode ser observado levando em consideração os pontos de vista morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular. Sob a visão molecular, o fenótipo pode ser descrito em termos de RNA mensageiro (mRNA) e proteínas, associados ao genoma e influenciados pelo ambiente (SALVATO & CARVALHO, 2010). Dessa maneira, a relação entre genótipo e fenótipo torna-se bastante complexa (MATTICK, 2003).

O transcriptoma compreende o conjunto completo dos transcritos de um organismo em um determinado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica. A interpretação dos elementos funcionais do genoma e o entendimento dos componentes moleculares de células e tecidos só são possíveis através do conhecimento e compreensão do transcriptoma (WANG *et*

*al.*, 2009), o qual é uma poderosa ferramenta para se entender a estrutura gênica e a regulação RNA-dependente de qualquer organismo (SOREK & COSSART, 2010).

Uma célula se mantém graças a seus produtos gênicos para poder efetuar as diversas funções. As proteínas são os principais componentes ativos da maquinaria celular sendo o DNA que armazena as informações para sua síntese a qual é mediada pelos respectivos mRNA (MAGALHÃES, 2007).

Durante todo o processo de diferenciação celular e tecidual um conjunto diversificado de proteínas é mobilizado como resultado da expressão diferencial dos respectivos genes. Portanto, o primeiro ponto de controle molecular é a expressão gênica do conjunto de mRNA (MAGALHÃES, 2007). Além disso, o transcriptoma é variável entre os diferentes tipos de célula, tecidos e órgãos de um dado indivíduo, sendo que a própria condição fisiológica normal pode influenciar no perfil do transcriptoma (PASSOS *et al.*, 2000).

Existem inúmeros trabalhos que evidenciam a importância do estudo do transcriptoma para o entendimento da interação planta-bactéria. SHEIBANI-TEZERJI *et al.* (2015) ao estudarem o transcriptoma de *B. phytofirmans* estirpe PsJN inoculada em duas variedades de batata, observaram que cerca de 62% dos genes encontravam-se expressos nesta interação. Os autores verificaram que a bactéria é metabolicamente ativa na planta, pois a maioria dos genes diferencialmente expressos foi relacionada à regulação transcricional, metabolismo geral (açúcares, aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos), produção de energia e homeostase celular, concluindo que o interior das plantas de batata como habitat ideal para PsJN pois não requerem muitas funcionalidades especializadas (SHEIBANI-TEZERJI *et al.*, 2015). Além disso, verificaram que genes relacionados à motilidade e mecanismos de defesa parecem ter menos importância para o sucesso do estabelecimento endofítico bacteriano. No transcriptoma de *Pseudomonas syringae* crescida ou na superfície de folhas de feijão ou no apoplasto, foi verificado que genes relacionados à síntese de flagelos e quimiotaxia foram reprimidos no apoplasto indicando que um movimento mais ativo e direcionado aos nutrientes não é necessário nesta condição (YU *et al.*, 2013). Além disso, verificaram ainda que genes envolvidos no catabolismo de fenilalanina foram menos expressos no apoplasto em comparação ao crescimento epifítico e chegaram à conclusão que a bactéria elicit a produção de fenilalanina, que é uma molécula precursora importante da defesa de plantas, particularmente na superfície das folhas, no processo de infecção inicial sendo mais importante que quando a bactéria já colonizou (YU *et al.*, 2013). Em *Azospirillum lipoferum* inoculado em raízes de arroz apresentaram um alto número de genes relacionados a funções regulatórias e transdução de sinais sugerindo que diferentes sinais são percebidos pela bactéria na raiz (DROGUE *et al.*, 2014). Já em *Xanthomonas campestris* inoculada em folhas de repolho, genes relacionados com a biossíntese de lipopolissacarídeos foram superexpressos nesta condição (BERNONVILLE *et al.*, 2014). Além disso, as classes de genes do metabolismo e transporte de carboidratos, produção e conversão de energia e mecanismos de defesa tiveram sua expressão reprimida quando a bactéria esteve em contato com folhas de repolho (BERNONVILLE *et al.*, 2014). Genes envolvidos na motilidade, direção e formação de biofilme foram fortemente expressos indicando que a bactéria pode perceber e direcionar um movimento até a entrada nas folhas de repolho (BERNONVILLE *et al.*, 2014). O flavonóide naringenina que faz parte de exsudatos radiculares (CESCO *et al.*, 2010) regula a expressão de genes envolvidos na biossíntese de parede celular de *Herbaspirillum seropedicae* tornando-os reprimidos. Isto indica que a bactéria pode reprimir a expressão desses genes quando em contato com o flavonóide para escapar da resposta imune da planta (TADRA-SFEIR *et al.*, 2015). Além desses genes, também foram reprimidos genes relacionados com a biossíntese de flagelos e quimiotaxia, indicando que naringenina pode reduzir o movimento de *H. seropedicae* (TADRA-SFEIR *et al.*, 2015).

Portanto, o estudo do transcriptoma de bactérias quando em associação com plantas, ou em contato com fluidos vegetais, pode prover importantes informações sobre o processo regulatório que a bactéria é capaz de expressar e, deste modo, auxiliar o conhecimento mais aprofundado do potencial genético da bactéria e também fornecer informações para processos biotecnológicos futuros. Baseado na importância do uso do transcriptoma no conhecimento de interações complexas entre planta-bactéria, esta tese teve como objetivo o estudo do perfil transcriptômico da bactéria diazotrófica *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada no líquido do apoplasto de cana-de-açúcar.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; BARAKAT, M.; MARTEL, M.; HEULIN, T. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p.787-794, 1999.
- AIZAWA, T.; VE, N.B.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, p.1152-1157, 2010.
- AIZAWA, T.; VIJARNSORN, P.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acid-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.61, p.1645-1650, 2011.
- ALMEIDA, I.; BERIAM, L.; SANNAZZARO, A.; NETO, J. Mancha bacteriana em *Ruscus* sp. causada por *Burkholderia andropogonis* no Brasil. *Tropical Plant Pathology*, v.34, p.339-342, 2009.
- ALVES, G.C. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho. Seropédica: UFRRJ, 2007, 53p. (Dissertação de Mestrado).
- ANDREOTE, F.D.; LACAVAL, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; OVERBEEK, L.S.V.; ELSAS, J.D.V.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.52, p.419-426, 2006.
- ARP, D.J. The nitrogen cycle. In *Prokaryotic Nitrogen Fixation*. Triplett, E.W. (ed). Wymondham, Great Britain: Horizon Scientific Press, p. 1-14, 2000.
- ASSIS JÚNIOR, A.; KATSUKI, A.; AKAO, S. N<sub>2</sub> fixation in sugarcane and population of N<sub>2</sub>-fixing endophytes in stem apoplast solution. *Philippine Journal of Crop Science*, v.29, p.45-58, 2004.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA A DIFUSÃO DE ADUBOS – ANDA. 2012. Disponível em: <[www.anda.org.br](http://www.anda.org.br)>. Acesso em: 15 de Julho de 2012.
- BALDANI, J.; CARUSO, L.; BALDANI, V.; GOI, S.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v.29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.77, p.549-579, 2005.
- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica seropédica. Seropédica: UFRRJ, 1996, 262p. (Tese de doutorado).
- BELLONE, S.C.; BELLONE, C.H. Presence of endophytic diazotrophs in sugarcane juice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.22, p.1065-1068, 2006.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; QUADT-HALLMAN, A.; TUZON, S. Induction of defense-related ultrastructural modification in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*, v.112, p.919-929, 1996.
- BERNABEU, P.R.; PISTORIO, M.; TORRES-TEJERIZO, G.; ESTRADA-DE-LOS SANTOS, P.; GALAR, M.L.; BOIARDI, J.L.; LUNA, M.F. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae*, v.191, p.113-120, 2015.

- BERNONVILLE, T.D.; NOËL, L.D.; SANCRISTOBAL, M.; DANOUN, S.; BECKER, A.; SOREAU, P.; ARLAT, M.; LAUBER, E. Transcriptional reprogramming and phenotypical changes associated with growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage xylem sap. *FEMS Microbiology Ecology*, v.89, p.527-541, 2014.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and others grasses. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.28, p.889-895, 2001.
- BORDIEC, S.; PAQUIS, S.; LACROIX, H.; DHONDT, S.; AIT BARKA, E.; KAUFFMANN, S.; JEANDET, P.; MAZEYRAT-GOURBEYRE, F.; CLÉMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. *Journal of experimental botany*, v.62, p.595-603, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Classificação de risco dos agentes biológicos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 36p.
- BULL, C.T.; WELLER, D.M.E.; THOMASHOW, L.S. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, v.81, p.954-959, 1991.
- BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*, v.40, p.115-117, 1950.
- CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; REIS, V.M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.3008-3013, 1995.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; SANTOS, P.E.-D.-L. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.1165-1172, 2004.
- CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p.5308-5319, 2007.
- CANABRAVA, A.A. Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar. Jaboticabal: FUNEP. 175p, 1991
- CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. *Plant and Soil*, v.345, p.155-169, 2011.
- CESCO, S.; NEUMANN, G.; TOMASI, N.; PINTON, R.; WEISSKOPF, L. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil*, v.329, p.1-25, 2010.
- CHAIN, P.S.G.; DENEFF, V.J.; KONSTANTINIDIS, K.T.; VERGEZ, L.M.; AGULLÓ, L.; REYES, V.L.; HAUSER, L.; CÓRDOVA, M.; GÓMEZ, L.; GONZÁLEZ, M.; LAND, M.; LAO, V.; LARIMER, F.; LIPUMA, J.J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; MALFATTI, S.A.; MARX, C.J.; PARNELL, J.J.; RAMETTE, A.; RICHARDSON, P.; SEEGER, M.; SMITH, D.; SPILKER, T.; SUL, W.J.; TSOI, T.V.; ULRICH, L.E.; ZHULIN, I.B.; TIEDJE, J.M. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.103, p.15280-15287, 2006.
- CHEN, W.-M.; DE FARIA, S.M.; CHOU, J.-H.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J.P.W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.58, p.2174-2179, 2008.

- CHEN, W.-M.; DE FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; LIN, K.-Y.; CHOU, J.-H.; SHEU, S.-Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.57, p.1055-1059, 2007.
- CHEN, W.-M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.-H.; BARRIOS, E.; DE FARIA, S.M.; ELLIOTT, G.N.; SHEU, S.-Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.56, p.1847-1851, 2006.
- COENYE, T.; HOLMES, B.; KERSTERS, K.; GOVAN, J.R.; VANDAMME, P. *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al. 1960) Gillis et al. 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami et al. 1994 are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi et al. 1993 and *Burkholderia plantarii* (Azegami et al. 1987) Urakami et al. 1994, respectively. International Journal of Systematic Bacteriology, v.49, p.37-42, 1999.
- COENYE, T.; LAEVEENS, S.; WILLEMS, A.; OHLÉN, M.; HANNANT, W.; GOVAN, J.R.; GILLIS, M.; FALSEN, E.; VANDAMME, P. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.51, p.1099-1107, 2001.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. Environmental Microbiology, v.5, p.719-729, 2003.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) Disponível em:<[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>; acessado em 01/02/2016.
- 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, p.669-678, 2010.
- CORREIA, S.; NASCIMENTO, C.; PEREIRA, L.; CUNHA, M.V.; SÁ-CORREIA, I.; BARRETO, C. Infecção respiratória por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia*: Evolução clínica em doentes com fibrose quística. Revista Portuguesa de Pneumologia, v.14, p.5-26, 2008.
- DE OLIVEIRA CUNHA, C.; GODA ZULETA, L.F.; PAULA DE ALMEIDA, L.G.; PRIOLI CIAPINA, L.; LUSTRINO BORGES, W.; PITARD, R.M.; BALDANI, J.I.; STRALIOTTO, R.; DE FARIA, S.M.; HUNGRIA, M.; SOUSA CAVADA, B.; MERCANTE, F.M.; RIBEIRO DE VASCONCELOS, A.T. Complete genome sequence of *Burkholderia phenoliruptrix* BR3459a (CLA1), a heat-tolerant, nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa flocculosa*. Journal of Bacteriology, v.194, p.6675-6676, 2012.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences, v.22, p.107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Symbiosis, v.13, p.1-13, 1992.
- DÖBEREINER, J. Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio Para a Agricultura Sustentável. Seropédica: CNPAB/Embrapa, v.1, p.1-2, 1997.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). Plant Physiology, v.105, p.1139-1147, 1994.
- DONG, Z.; MCCULLY, M.E.; CANNY, M.J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. Annals of Botany, v.80, p.147-158, 1997.



- DROGUE, B.; SANGUIN, H.; BORLAND, S.; PRIGENT-COMBARET, C.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. *FEMS Microbiology Ecology*, v.87, p.543-555, 2014.
- EL-AMIN, A.; SAADABI, A. Contribution to the knowledge of soil fungi in Sudan rhizosphere mycoflora of sugarcane at Kenana sugar estate. *International Journal of Botany*, p.97-102, 2007.
- ELLIOTT, G.N.; CHEN, W.-M.; CHOU, J.-H.; WANG, H.-C.; SHEU, S.-Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN, L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J.M.; BESSI, R.; DE FARIA, S.M.; TRINICK, M.J.; PRESCOTT, A.R.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *The New phytologist*, v.173, p.168-80, 2007.
- ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and environmental microbiology*, v.67, p.2790-2798, 2001.
- FERREIRA, A.S.; LEITÃO, J.H.; SILVA, I.N.; PINHEIRO, P.F.; SOUSA, S.A.; RAMOS, C.G.; MOREIRA, L.M. Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, p.441-450, 2010.
- FOWLER, D.; COYLE, M.; SKIBA, U.; SUTTON, M.A.; CAPE, J.N.; REIS, S.; SHEPPARD, L.J.; JENKINS, A.; GRIZZETTI, B.; GALLOWAY, N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A.F.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. v.368, p.20130164, 2013.
- FUENTES-RAMÍREZ, L.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, v.29, p.117-128, 1999.
- GAIAD, S. Alterações na rizosfera e seus reflexos na biomassa, na composição química e na fotossíntese de erva-mate decorrentes do uso de diferentes fontes de nitrogênio. Curitiba: UFPR, 2003, 149p. (Tese de Doutorado).
- GASSER, I.; CARDINALE, M.; MÜLLER, H.; HELLER, S.; EBERL, L.; LINDENKAMP, N.; KADDOR, C.; STEINBÜCHEL, A.; BERG, G. Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant and Soil*, v.347, p.125-136, 2011.
- GILLIS, M.; VAN, T.V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.274-289, 1995.
- GLASZIOU, K.T.; GAYLOR, K.R. Storage of sugars in stalks of sugarcane. *The Botanical Review*, v.38, p.471-490, 1972.
- GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN, J.F.; TIEDJE, J.M.; VANDAMME, P. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.1677-1681, 2004.
- HANSON, P.; EDWARDS, N.; GARTEN, C.; ANDREWS, J. Separating root and soil microbial contributions to soil respiration: a review of methods and observations. *Biogeochemistry*, v.48, p.115-146, 2000.
- HARDOIM, P.; VAN OVERBEEK, L.; ELSAS, J.V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, v.16, p.463-471, 2008.

HOEFT, R.G. Fertilizer nitrogen: providing food and protecting the environment. *Better Crops with Plants Food*, v.74, p.4-8, 1990.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.17, p.77-119, 1997.

KIM, B.; CHO, M.; KIM, M.; CHOI, H.; KANG, M.; SHIM, H.; AHN, T.; KIM, J.; PARK, D. Rapid and specific detection of *Burkholderia glumae* in rice seed by real-time bio-PCR using species-specific primers based on an rns family gene. *Plant Disease*, v.1, p.577-580, 2012.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; AßMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, v.29, p.853-862, 1997.

KOBAYASHI, H.; NACIRI-GRAVEN, Y.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular Microbiology*, v.51, p.335-347, 2004.

LIESACK, W.; JANSSEN, P.H.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L.; STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In *Modern Soil Microbiology*, pp. 375–439. Edited by J. D. Van Elsas, J. T. Trevors & E. M. H. Wellington. New York: Marcel Dekker, 1997.

LIU, X.Y.; WU, W.; WANG, E.T.; ZHANG, B.; MACDERMOTT, J.; CHEN, W.X. Phylogenetic relationships and diversity of  $\beta$ -rhizobia associated with Mimosa species grown in Sishuangbanna, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.61, p.334-342, 2011.

LPNS, 2016. Acessado em: 26/01/2016. Disponível em:<<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>>

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.26, p.1829-1836, 2010.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T.A.; GOLDBERG, J.B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Review in Microbiology*, v.3, p. 144-156, 2005.

Magalhães, D.A.R. Análise do transcriptoma durante a ontogenia do timo. São Paulo, USP, 2007, 237p. (Tese de Doutorado).

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; HIGASHI, R. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and Soil*, v.189, p.11-20, 1997.

MARSCHNER, P.; YANG, C.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, p.1437-1445, 2001.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; SALAZAR-SALAZAR, C.; MÉNDEZ, R.D.; CABALLERO-MELLADO, J.; HIRSCH, A.M.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M.S.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.104, p.1063-1071, 2013.

- MATSUOKA, S.; GARCIA, A.A.A.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: Borém, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV. p. 205-251, 1999.
- MATTICK, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays*, v.25, p.930-939, 2003.
- MATTOS, K.A.; PÁDUA, V.L.M.; ROMEIRO, A.; HALLACK, L.F.; NEVES, B.C.; ULISSES, T.M.U.; BARROS, C.F.; TODESCHINI, A.R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.80, p.477-93, 2008.
- MCCULLY, M.E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: A plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.28, p.983-990, 2001.
- MICHÉ, L.; BATTISTONI, F.; GEMMER, S.; BELGHAZI, M.; REINHOLD-HUREK, B. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.19, p.502-511, 2006.
- MOORE, P.H. Temporal and special regulation of sucrose metabolism in the sugarcane stem. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.22, p.661-679, 1995.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. From Indian sugarcane varieties. *Biological Fertility Soils*, v.29, p.157-164, 1999.
- NANDAKUMAR, R.; PATHOLOGY, P.; PHYSIOLOGY, C.; CLARK, C.A.; PATHOLOGY, P.; PHYSIOLOGY, C.; ROUGE, B.; CARTWRIGHT, R.D.; RUSH, M.C. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Disease*, v.93, p.896-905, 2009.
- NEUMANN, G.; RÖMHELD, V. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (Eds.). *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, 23-72, 2007.
- NGUYEN, C., GUCKERT, A. Short-term utilisation of <sup>14</sup>C- [U] glucose by soil microorganisms in relation to carbon availability. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, p.53-60, 2001.
- NOGALES, B.; MOORE, E.R.B.; LLOBET-BROSSA, E.; ROSSELLO-MORA, R.; AMMAN, R.; TIMMIS, K.N. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied Environment Microbiology*, v.67, p.1874-1884, 2001.
- NOGUEIRA, E.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.; VARGAS, C.; PÁDUA, V.; SILVA, F.; SANTOS, R.; BALDANI, J.; FERREIRA, P.; HEMERLY, A. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genetics and Molecular Biology*, v.24, p.199-206, 2001.
- NOVOA, R.S.A.; TEJEDA, H.R. Evaluation of the N<sub>2</sub>O emissions from N in plant residues as affected by environmental and management factors. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.75, p.29-46, 2006.
- OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil*, v.284, p.23-32, 2006.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, v.242, p.205-215, 2002.

- PARKE, J.L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity oh the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annual Review of Phytopathology, v.39, p. 225-258, 2001.
- PASSOS, G.A.S.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Transcriptoma- análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. Biotecnologia, ciência e desenvolvimento, v.12, p.34-37, 2000.
- PECHANOVA, O.; HSU, C.-Y.; ADAMS, J.P.; PECHAN, T.; VANDERVELDE, L.; DRNEVICH, J.; JAWDY, S.; ADELI, A.; SUTTLE, J.C.; LAWRENCE, A.M.; TSCHAPLINSKI, T.J.; SÉGUIN, A.; YUCEER, C. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. BMC genomics, v.11, p.674, 2010.
- PERIN, L.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M. Como isolar e identificar *Burkholderia silvatlantica*. Comunicado Técnico Embrapa, n.86, p.1-4, 2006.
- PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.44, p.1215-1221, 2011.
- REIS JÚNIOR, F.; SILVA, L.; REIS, V.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.35, p.985-994, 2000.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. Critical Reviews in Plant Science, v.19, p.227-247, 2000.
- REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v.54, p.2155-62, 2004.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, v.19, p.827-837, 2006.
- RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters, v.1, p.1-9, 2008.
- SALVATO, F.; CARVALHO, M.C.D.C.G.D. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. Ciência Rural, v.40, p.727-734, 2010.
- SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. New Phytologist, v.149, p.167-192, 2001.
- SHEIBANI-TEZERJI, R.; RATTEI, T.; SESSITSCH, A.; TROGNITZ, F. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. mBio, v.6, p.1-11, 2015.
- SHENG, L.; AIJIA, Z.; RONGYU, W.; TING, C.; MINGMING, Z.; ZHAONIAN, Y.; WENXIONG, L. Effects of Sugarcane Ratooning Cultivation on the Alteration of Bacterial Communities in the Rhizosphere Soil. Sugar Tech, v.14, p.275-283, 2012.
- SHEU, S.-Y.; CHOU, J.-H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; GROSS, E.; DOS REIS JUNIOR, F.B.; MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.-M. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. International Journal of Systematic and Evolutionary, v.63, p.435-441, 2013.
- SHEU, S.-Y.; CHOU, J.-H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; GROSS, E.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.-M. *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.62, p.2272-2278, 2012.

SÖDERBERG, K.H.; BAATH, E. Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, v.30, p.1259-1268, 1998.

SOREK, R.; COSSART, P. Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nature Reviews Genetics*, v.11, p.9-16, 2010.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, v.31, p.425-448, 2007.

STEAD, D.E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.42, p.281-295, 1992.

SUÁREZ-MORENO, Z.R.; DEVESCOVI, G.; MYERS, M.; HALLACK, L.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; CABALLERO-MELLADO, J.; VENTURI, V. Commonalities and differences in regulation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in the beneficial plant-associated *Burkholderia* species cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, v.24, p.4302-4317, 2010.

TADRA-SFEIR, M.Z.; FAORO, H.; CAMILIOS-NETO, D.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.; BALSANELLI, E.; WEISS, V.; BAURA, V.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; PEDROSA, F.D.O.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenin. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-8, 2015.

TEJERA, N.A.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.50, p.745-750, 2004.

TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: some implications in the association with endophytes. *Journal of Plant Physiology*, v.163, p.80-85, 2006.

TENORIO-SALGADO, S.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; PEREZ-RUEDA, E. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*, v.4, p.236-243, 2013.

TIRONI, S.; REIS, M.; GALON, L. Action of herbicides on the activity of phosphate-solubilizing bacteria isolated from sugarcane rhizosphere. *Planta Daninha*, p.747-754, 2009.

TRAN VAN, V.; GILLIS, M.; HEBBER, K.P.; FERNANDEZ, M.; SEGERS, P.; MARTEL, M.H.; BERGE, O.; MEYER, J.M.; HEULIN, T. Isolation from the rice rhizosphere of a new species of nitrogen-fixing Proteobacteria, belonging to the genus *Burkholderia*. In: *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*, sixth, Cairo. Proceedings. Cairo: American University in Cairo Press, 299-309, 1994.

URQUIAGA S., CRUZ K.H.S. E BODDEY R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*, v.56, p.105-114, 1992.

Urquiaga, S. Fixação biológica de nitrogênio. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_31\\_711200516717.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_31_711200516717.html)> acessado em 08 de julho de 2012.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, v.512, p.507-512, 2002.

VIALARD, V.; POIRIER, I.; COURNOYER, B.; HAURAT, J.; WIEBKIN, S.; OPHÉL-KELLER, K.; BALANDREAU, J. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinium*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.48, p.549-563, 1998.

- VITOUSEK, P.M.; HOWARTH, R.W. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry*, v.13, p.87-115, 1991.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v.10, p.57-63, 2009.
- XAVIER, R.P. Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita. Seropédica: UFRRJ, 2002, 108p. (Dissertação de Mestrado).
- WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. *Systematic and applied microbiology*, v.33, p.35-43, 2010.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia*. *Microbiology and Immunology*, v.36, p.1251-1275, 1991.
- YODER-HIMES, D.R.; CHAIN, P.S.G.; ZHU, Y.; WURTZEL, O.; RUBIN, E.M.; TIEDJE, J.M.; SOREK, R. Mapping the *Burkholderia cenocepacia* niche response via high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.106, p.3976-81, 2009.
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T.; DACANAY, E.; NAKANISHI, Y. The natural <sup>15</sup>N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant and Soil*, v.189, p.239-244, 1997.
- YU, X.; LUND, S.P.; SCOTT, R.A.; GREENWALD, J.W.; RECORDS, A.H.; NETTLETON, D.; LINDOW, S.E.; GROSS, D.C.; BEATTIE, G.A. Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.110, p.E425-E434, 2013.
- ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, v.50, p.743-749, 2000.



#### **4. CAPÍTULO I**

**Determinação de genes de referência de *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 cultivada em diferentes fontes de carbono para a validação do transcriptoma da bactéria por RT-qPCR**



## 4.1. RESUMO

Bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* apresentam ampla gama de hospedeiros como plantas, animais e homens e são bastante cosmopolitas. Dentro do gênero existem espécies que causam doenças em humanos e em plantas, contudo também existem espécies que apresentam propriedades benéficas às plantas como a fixação biológica de nitrogênio. *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 é uma estirpe que compõe o inoculante da cana-de-açúcar da Embrapa Agrobiologia. Esta espécie tem o potencial de realizar o processo de fixação biológica de nitrogênio, bem como auxiliar no controle biológico de fitopatógenos, porém pouco se conhece sobre esta bactéria e sua interação (diálogo molecular) com plantas de cana-de-açúcar. Para aprofundar o entendimento da interação, a transcriptômica é uma ferramenta bastante promissora. O método de quantificação reversa pela reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) é considerado o método preferencial para estudos de expressão gênica diferencial em diferentes condições por ser considerado altamente sensível e específico. Além disso, a RT-qPCR pode ser usado para validar dados de transcriptoma e para tanto torna-se necessário fazer uso de normalizadores internos como genes de referência. Apesar da literatura já indicar diversos genes de referência para diversos organismos, nem sempre os mesmos são estáveis nas reações de RT-qPCR para o organismo alvo. Neste sentido do trabalho o presente capítulo teve por objetivo, selecionar e validar genes de referência para uso nas análises do transcriptoma da bactéria *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 quando cultivada na presença do fluido do apoplasto de cana-de-açúcar. A seleção dos genes candidatos foi realizada após o cultivo da estirpe Ppe8 no meio JMV líquido e JMV modificado pela substituição do manitol por cinco fontes de carbono diferentes: glicose, frutose, sacarose, ácido aconítico e caldo de cana-de-açúcar. As células foram coletadas quando a bactéria atingiu a metade da fase exponencial e o RNA total foi extraído seguido da síntese de cDNA para as análises de RT-qPCR. Foram testados seis genes candidatos a normalizadores: *lpxC*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* e *rpoD*, todos presentes no genoma da estirpe Ppe8. As análises realizadas com os programas GeNorm e NormFinder indicaram os genes *lpxC*, *gyrB* e *recA* como os genes de referência com expressões mais estáveis. A variação par-a-par sugeriu a utilização de um número acima de seis genes, porém, optou-se pela seleção dos três genes que normalmente são suficientes para normalização e também para redução nos custos. A validação dos três genes de referência selecionados foi realizada através da análise da expressão de nove genes alvos (*glgA*, *glgB*, *glgC*, *treY*, *treZ*, *otsA*, *sdhD*, ORF\_6066 e ORF\_7487), todos associados à classe de metabolismo de carboidratos. O crescimento da estirpe Ppe8 em meio JMV contendo manitol como fonte de carbono foi usado como calibrador (RQ=1). Os resultados mostraram que a expressão relativa dos nove genes é alterada na presença das diferentes fontes de carbono e que os genes de referência selecionados (*lpxC*, *gyrB* e *recA*) são genes com expressões estáveis e portanto passíveis de serem usados na validação do transcriptoma da estirpe Ppe8 cultivada na presença do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias diazotróficas, genes normalizadores, FBN, expressão relativa.

## 4.2. ABSTRACT

Bacteria belonging to the genus *Burkholderia* have broad host range such plants, animals and humans and are quite cosmopolitan. There are species within the genus that cause diseases to humans and plants, but there are also species with beneficial properties of plants such as biological nitrogen fixation. *Burkholderia tropica* Ppe8 strain is a bacterial strain that composes the inoculant of sugarcane of Embrapa Agrobiologia. This species has the potential to fix nitrogen as well as assist in the biological control of plant pathogens, however, little is known about this bacterium and its interaction (molecular dialogue) with sugarcane plants. To better understanding the interaction with the plants is necessary to obtain better knowledge in the area of transcriptomics. The method of quantification by reverse polymerase chain reaction (RT-qPCR) is considered the preferred method for differential gene expression studies in different conditions due to its high sensitive and specificity. In addition, the RT-qPCR may be used to validate transcriptome data and for that it becomes necessary to use internal gene as reference. Although the literature has indicated reference genes for many diverse organisms, they are not always stable in RT-qPCR reactions for the target organism. In this sense, this chapter aimed to select and validate reference genes for use in the analysis of the transcriptome of the bacteria *Burkholderia tropica* strain Ppe8 when grown in the presence of sugarcane apoplastic fluid. The selection of the candidate genes was carried out after culturing the strain Ppe8 in JMV liquid medium and JMV modified by replacing the mannitol by five different carbon sources: glucose, fructose, sucrose, aconitic acid and sugarcane juice. Cells were collected when the bacterium reach half of the exponential phase, total RNA was extracted followed by cDNA synthesis for RT-qPCR analysis. Six candidate genes were tested: *lpxC*, *gyrB*, *recA*, *rpoA*, *rpoB* and *rpoD*, all present in the genome of Ppe8 strain. The analyses carried out with the GeNorm and NormFinder programs indicated the *lpxC* genes *gyrB* and *recA* as the most stable reference genes. The pair-to-pair variation suggested using a number above six genes, however, we decided for the selection of the three genes usually sufficient to standardization and also by the reduction in costs. Validation of the three selected reference genes was performed by analyzing the expression of nine target genes (*glgA*, *glgB*, *glgC*, *treY*, *treZ*, *otsA*, *sdhD*, ORF\_6066 e ORF\_7487), all associated with carbohydrate metabolism class. Growth of strain PPe8 in JMV medium containing mannitol as carbon source was used as the calibrator (RQ = 1). The results showed that the relative expression of nine genes is altered in the presence of different carbon sources and that the selected reference genes (*lpxC*, *gyrB* and *recA*) are stable genes and therefore capable of being used in the transcriptome validation of Ppe8 strain cultivated in presence of sugarcane apoplast liquid.

**KEY-WORDS:** Diazotrophic bacteria, normalizing gene, BFN, relative expression.



### 4.3. INTRODUÇÃO

O gênero *Burkholderia* pertence ao sub filo  $\beta$ -proteobactéria (YABUUCHI *et al.*, 1991) e compreende 96 espécies originadas de diferentes ambientes, incluindo: rios, sedimentos, solo associadas a plantas, humanos e animais (LPNS, 2016). Dentre as duas principais ramificações existentes, uma delas é composta por espécies ambientais que não causam doenças. Dentre as 96 espécies, 20 têm a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (GILLIS *et al.*, 1995; ACHOUAK *et al.*, 1999; COENYE *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2000; COENYE *et al.*, 2001; VANDAMME *et al.*, 2002; CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; GORIS *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006; PERIN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; ELLIOTT *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; AIZAWA *et al.*, 2010; AIZAWA *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA CUNHA *et al.*, 2012; SHEU *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-AGUILAR *et al.*, 2013; SHEU *et al.*, 2013). E dentre as fixadoras, várias espécies são capazes de fixar nitrogênio atmosférico por meio da formação de nódulos em associação com plantas leguminosas (TALBI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; ORMEÑO-ORRILLO *et al.*, 2012; BEUKES *et al.*, 2013; BOURNAUD *et al.*, 2013; ANGUS *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA-LONGATTI *et al.*, 2015). Além disso, existem várias espécies, diazotróficas ou não, que podem colonizar a rizosfera e/ou endofiticamente uma ampla gama de espécies de plantas como, milho, sorgo, cana-de-açúcar, arroz, abacaxi e café (GILLIS *et al.*, 1995; ACHOUAK *et al.*, 1999; COENYE *et al.*, 1999; COENYE *et al.*, 2001; CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; GORIS *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2004; PERIN *et al.*, 2006; AIZAWA *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA CUNHA *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-AGUILAR *et al.*, 2013).

Entre essas espécies que se associam com plantas não leguminosas, está a *Burkholderia tropica* (REIS *et al.*, 2004), que é uma bactéria Gram negativa, que fixa nitrogênio sob condições microaeróbicas nos meios JMV semi-sólido livre de nitrogênio, LGI-P e BAZ (BALDANI *et al.*, 2014). Bactérias do gênero *Burkholderia* colonizam a rizosfera e tecidos internos de uma ampla gama de plantas hospedeiras incluindo a cana-de-açúcar (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2004; PERIN *et al.*, 2006; COMPANT *et al.*, 2008; MATTOS *et al.*, 2008). O apoplasto, potencial nicho bacteriano, constitui os espaços intercelulares (o meio extracelular), espaços aquosos externos à membrana plasmática incluindo a parede celular e o xilema (HASLAM *et al.*, 2003). Portanto, o apoplasto representa um compartimento altamente dinâmico que serve como um contínuo que vai da raiz, passando pelo caule e chegando até as folhas, sendo bastante importante no que tange a percepção e transdução de sinais do ambiente para o simplasto (meio intracelular) (PECHANOVA *et al.*, 2010).

De acordo com SATTELMACHER (2001), endófitos bacterianos presentes no apoplasto promovem o crescimento da planta, especialmente por aumentar a resistência a fatores bióticos e abióticos e por ter ação direta na nutrição mineral das plantas. DOBEREINER, em 1992, já havia sugerido que bactérias diazotróficas endofíticas seriam beneficiadas por esse nicho por não existir competição por fontes de carbono e redução de oxigênio disponível o que importante para o funcionamento da nitrogenase. O fluido do apoplasto de cana-de-açúcar é constituído, principalmente, por sacarose, glicose, frutose e ácido aconítico, que podem ser utilizados pelos endófitos como fontes de carbono (DONG *et al.*, 1994; ASSIS JÚNIOR *et al.*, 2004). Já o caldo de cana também contém água e compostos

orgânicos dissolvidos, bem como enzimas conhecidas como invertases ácida e neutra nos vasos do xilema para acúmulo de sacarose (HATCH & GLASZIOU, 1963). Além disso, contém ácidos orgânicos como aconitato, citrato, malato, fumarato, oxalato e glicolato e açúcares como xilose, arabinose, galactose, frutose, glicose e sacarose (VICENTE *et al.*, 1991; BELLONE & BELLONE, 2006). Estes nutrientes estão presentes em todos os órgãos da parte aérea, contudo, sua concentração varia dentro da planta de acordo com o crescimento e desenvolvimento de regiões particulares (BELLONE & BELLONE, 2006). É sabido que a *B. tropica* estirpe Ppe8 utiliza várias fontes de carbono que podem estar presentes tanto no fluido do apoplasto quanto no caldo de cana-de-açúcar, tais como N-acetilglicosamina, DL-arabinose, D-arabitol, D-frutose, galactose, gluconato, D-glicose, glicerol, inositol, 2-cetogluconato, malato, manitol, D-manose, fenilacetato, sorbitol e D-xilose (REIS *et al.*, 2004). Porém ainda não se tem informações sobre a expressão gênica da bactéria na presença do fluido do apoplasto de cana-de-açúcar nem como a bactéria se comportaria na presença do caldo de cana ou das fontes de carbono que o compõem.

O método de transcrição reversa, seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) é considerado o método preferencial para estudos em expressão gênica diferencial de mRNA em diferentes condições (BUSTIN *et al.*, 2009) uma vez que é altamente sensível e específico (BUSTIN *et al.*, 2009). A RT-qPCR pode ser usada tanto para métodos independentes para análise de expressão quanto para validar dados em comparação a genes de referência, por exemplo, genes que possuem estabilidade de expressão sob várias condições experimentais (DALLAS *et al.*, 2005). Em um trabalho recente, foi mostrada uma lista de genes comumente empregados como referência: *16S* rRNA, *gyrA*, *recA*, *rpoB*, *rpoA*, *gyrB*, *gap*, *rho*, *ftsZ*, *secA*, *rpoC*, *gmk*, *adk*, *rpoD*, *dnaG*, *glnA*, *ldhD* e *recF* em estudos com bactérias cultivadas em diferentes condições (ROCHA *et al.*, 2015). A escolha correta do gene referência é muito importante em função das variações ambientais que podem levar a interpretações incorretas dos resultados (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Um estudo com o endófito diazotrófico *G. diazotrophicus* estirpe PAL5, indicou os genes *23S* rRNA, *rho* e *recA* como genes de referências apropriados para avaliar a expressão gênica durante o crescimento da bactéria em diferentes fontes de carbono (GALISA *et al.*, 2012). Similarmente, os genes *gyrA*, *glyA* e *recA* foram escolhidos para três estirpes de *A. brasilense* crescidas em diferentes tipos de meio de cultivo (MCMILLAN & PEREG, 2014). A seleção de genes de referência também tem sido realizada para várias bactérias não diazotróficas, incluindo *Bacillus cereus* (REITER *et al.*, 2011), *Escherichia coli* (ZHOU *et al.*, 2011), *Clostridium difficile* (METCALF *et al.*, 2010), dentre outras. Contudo, não existem dados publicados usando genes de referência para *B. tropica* estirpe Ppe8. Para tanto, apesar de diversos trabalhos terem sido publicados com bactérias, não existem genes de referência comuns a todas e, portanto, o uso inapropriado desses genes pode levar a resultados incorretos (DHEDA *et al.*, 2005). Além disso, o conjunto de genes de referência devem ser validados dentro de uma condição experimental específica para posteriormente usá-los como normalizadores (DHEDA *et al.*, 2005).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho deste capítulo foi a seleção e validação de genes de referência para a bactéria diazotrófica *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada em diferentes fontes de carbono visando o seu emprego nos estudos de validação do transcriptoma da Ppe8 cultivada no líquido do apoplasto de cana-de-açúcar.

## 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1. Estirpe bacteriana, condições de crescimento e extração do RNA

A bactéria *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 (BR11366), obtida da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, foi cultivada em Erlenmeyers com capacidade de 250 ml contendo 100 ml de meio líquido JMV (0,5% de manitol e 10 mM de glutamato de sódio) (BALDANI *et al.*, 2014) (Anexos 1, 2 e 3), meio JMV modificado com fontes de carbono distintas: 0,5% de glicose, 0,5% de sacarose, 0,5% de frutose, 0,5% ácido aconítico ou 100% de caldo de cana-de-açúcar em triplicata biológica. Afim de se confirmar a bactéria taxonomicamente foram utilizados iniciadores espécie-específicos desenhados por Boa Sorte (2013) (Anexo 4). As células foram incubadas a 30°C, a 150 rpm por 18 horas. Foram centrifugados 5 ml das culturas ( $10^7$  células.ml<sup>-1</sup>) a 9.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sedimento celular foi usado para a extração do RNA total. A extração de RNA total foi realizada através da adição de 1 ml do reagente TRIzol® (Life Technologies, Cat. No. 15596) (previamente aquecido a 60°C), seguido de agitação vigorosa em *Vórtex* por 30 segundos e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de solução de clorofórmio, e as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida cuidadosamente com auxílio de micropipeta para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado e a mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi redissolvido em 1 ml de etanol 70% (v/v) e, posteriormente, centrifugado a 12.000 xg por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em 25 µl de água ultrapura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) (água ultrapura livre de RNases). O RNA total foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) em uma cuba de eletroforese com tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0) para análise da sua integridade e posteriormente quantificado por meio do protocolo Qubit™ Quantitation Platform, que se compõe do aparelho Qubit fluorímetro (Invitrogen) e dos reagentes do kit Quant-it (Invitrogen). A quantificação foi realizada a partir do preparo da solução de trabalho (*Working solution*) onde foram adicionados 199 µl de tampão a 1 µl de solução de fluoróforo. Para calibração do aparelho foram preparadas duas amostras padrão com 190 µl de solução de trabalho e 10 µl dos padrões: Padrão 1 (*Standard 1*) e Padrão 2 (*Standard 2*). De cada amostra de RNA, foi utilizado 1 µl, ao qual foram adicionados 199 µl de solução de trabalho. Todos os tubos foram homogeneizados em *Vórtex* e incubados à temperatura ambiente (25°C) por 2 minutos. As amostras foram então quantificadas no Qubit fluorímetro.

Uma alíquota de 10 µg das amostras de RNA extraído foi tratada com 2 µl de enzima DNase (*RNase-Free DNase I* – Epicentre® Cat. No. D9910K) e incubada a 37°C por 40 minutos e posteriormente, para inativar a enzima, 65°C por 5 minutos. O RNA foi submetido a uma PCR para verificação da eficiência do tratamento das amostras com Dnase, com os oligonucleotídeos iniciadores sintetizados, 5'-GGAATTCCGCTGAGAGGTGGA-3' (*Forward*) 5'-GGCTTGGCAACCCTCTGTTCC-3' (*Reverse*) (Boa Sorte, 2013), em que foi realizada a amplificação de regiões diferentes do 16S rRNA de *B. tropica*. A reação foi

constituída de 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão para Taq DNA polimerase 1X (1 mM de Tris-HCl, pH 9,0 e 5 mM de KCl) (Invitrogen, Cat. No. 11615-010), 120 nM de cada iniciador e 1 µl de RNA total extraído. As condições de temperatura empregadas nas reações de PCR foram: 5 minutos a 96°C (desnaturação), 1 minuto a 95°C (desnaturação), 15 segundos a 62°C (anelamento), 45 segundos a 72°C (polimerização), retorno 39 ciclos para a segunda etapa, 5 minutos a 72°C (extensão final) e, finalmente, 4°C. Para a verificação da amplificação, 5 µl dos produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose a 2% (m/v) em uma cuba de eletroforese com tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0) e submetidos a uma voltagem de 80 V por 90 minutos. O gel foi então corado com brometo de etídeo (5 g.ml<sup>-1</sup>) e visualizado sob luz ultravioleta a 254 nm, com o uso do fotodocumentador KODAK<sup>®</sup> Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. No. 172.8468). A análise do gel foi realizada com o programa de análise de imagens da KODAK<sup>®</sup> 1D Image Analysis (KODAK Molecular Imaging Systems, Cat. No. 811.2344). Como referência nas análises, foi empregado o marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Cat. No. 10787-018). Foi aplicado também como controle, 1 µl de DNA de Ppe8 a 100 ng como controle positivo.

#### 4.4.2. Síntese do cDNA

Após a confirmação da pureza do RNA total extraído através da não amplificação de uma banda de fragmento de 260 pb, a síntese do cDNA foi realizada. A primeira fita de cDNA foi sintetizada seguindo instruções do manual do fabricante usando o kit Superscript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat. No. 18080-093). Dez microgramas de RNA total foram utilizados na reação de síntese da primeira fita de cDNA. Ao RNA total foram adicionados 2 µl de solução de iniciadores aleatórios (*Random Primers*) a 250 ng.µl<sup>-1</sup> (Invitrogen, Cat. No. 48190-011), 2 µl de dNTP a 10mM e água ultra-pura tratada com DEPC até o volume final de 26 µl. A mistura foi aquecida a 65°C por 5 minutos e, posteriormente, incubada no gelo. O conteúdo foi brevemente centrifugado, e aos quais foram adicionados 8 µl de Tampão 5X (250 mM de Tris-HCl, 375 mM de KCl e 15 mM de MgCl<sub>2</sub>), 2 µl de solução de DTT a 100 mM, 2 µl de solução de inibidores de RNase *RNaseOUT*<sup>™</sup> a 40 U.µl<sup>-1</sup> e 2 µl de solução de *SuperScript*<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase a 200 U.µl<sup>-1</sup>. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e, em seguida, a 50°C por 60 minutos. A reação foi inativada a 70°C por 15 minutos, conforme as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído a uma proporção de 1:20 e, então empregado para a reação no RT-qPCR.

#### 4.4.3. Genes de referência candidatos e desenho dos iniciadores

Primeiramente para validar a expressão dos genes do transcriptoma por RT-qPCR, foram selecionados alguns genes comumente usados como normalizadores (GALISA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2015). As sequências foram desenhadas a partir do genoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 disponível em <http://bioinfo-ext.cnpab.embrapa.br/blast> através do programa (Primer3 plus) (ROZEN & SKALETSKY, 1999). Seis genes participantes de quatro diferentes subsistemas, identificados no genoma da *B. tropica* estirpe Ppe8, foram selecionados (Tabela 1). Os iniciadores desenhados apresentaram de 19-21 pb (pares de bases), um conteúdo de G/C acima de 50%, Tm (temperatura de anelamento) entre 60°C e

65°C, e comprimento do produto de PCR entre 100 e 170 pb. As sequências dos iniciadores encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 1.** Identificação e função dos genes usados para seleção de um controle interno nas reações de RT-qPCR.

Nome do gene	Produto do gene	Função essencial conhecida
<i>gyrB</i>	Subunidade B da girase	Replicação do DNA, superenovelamento do DNA cromossômico
<i>rpoA</i>	RNA polimerase, subunidade $\alpha$	Início da transcrição e síntese do RNA
<i>rpoB</i>	RNA polimerase, subunidade $\beta$	Síntese do RNA
<i>rpoD</i>	RNA polimerase, fator sigma 70	Início da transcrição e síntese do RNA
<i>recA</i>	Proteína recA	Recombinação homóloga do DNA
<i>lpxC</i>	UDP-3-O-acil,N-acetilglucosamina deacetilase	Cataliza o segundo passo da biosíntese no lipídeo A

**Tabela 2.** Características dos iniciadores desenhados para a normalização dos genes de referencia candidatos.

Gene	Forward (5'-3') primer Reverse (5'-3') primer	Tamanho do amplicon (pb)	Concentração usada (nmol)	Tm (°C)	Eficiência (%)
<i>gyrB</i>	GGCGATAGAAGAACGTCAGC CGGCAAGGAAGATTACAACC	116	500	62	85
<i>rpoA</i>	TGGTGTGCAAGAGGATGTGG CGGGTTGATGACTTCGCAGT	163	100	60	87
<i>rpoB</i>	TCAGGTTCGTGCGGCATCAGG CAACGGCAAGGGCGAAGTG	170	100	65	87
<i>rpoD</i>	GCACGCAGACATCAACGACC TGTAGACCTGCACGCCCATGT	100	300	62	88
<i>recA</i>	TCTGGACATTCGCCGTATCG GAGATGCCTTCGCCGTAGAG	141	500	60	90
<i>lpxC</i>	TGAAGACGGTCGGCATCGGC ACGGGGGTCGGCAAATCCAC	112	100	65	85

#### 4.4.4. Condições das reações de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas com amostras de cDNA diluídas 1:20, provenientes de três réplicas biológicas, utilizando o equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems<sup>TM</sup>) em placas de 96 poços (MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96, Applied



Biosystems™), com a utilização de 5 µl do cDNA diluído, 7,5 µl de SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems™ Cat. No. 4385612) e volume variado dos iniciadores direto e reverso, de acordo com a concentração de iniciador utilizado para cada gene e o volume final da reação foi completado para 15 µl com água ultrapura livre de nucleases. Todas as corridas de RT-qPCR foram realizadas usando três réplicas técnicas e um controle sem cDNA, bem como três sínteses de cDNA independentes.

A reação foi realizada utilizando o programa: 95°C por dois minutos, seguidos por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento e aquisição da fluorescência a 60°C por 30 segundos.

#### **4.4.5. Análise da expressão dos genes candidatos para uso como normalizadores**

Os valores de Cq (Ciclos de quantificação) dos seis genes avaliados neste estudo foram obtidos através do programa Miner (ZHAO & RUSSEL, 2005), os quais foram importados para o programa qBase v1.3.5 (HELLEMANS *et al.*, 2007) e convertidos em quantidades relativas não normalizadas, corrigidas pelos valores de eficiência de amplificação para cada gene, usando a fórmula  $Q = E^{\Delta Cq}$ , onde E corresponde a eficiência de amplificação do gene e  $\Delta Cq$  é a amostra com menor expressão entre o grupo de dados subtraída do valor de Cq da amostra de referência. Esses dados não normalizados foram independentemente importados para os programas geNorm v3.5 e NormFinder (ANDERSEN *et al.*, 2004), para determinar os genes de referência mais estáveis para as condições testadas, tanto em relação às fontes de carbono juntas quanto separadamente.

A análise do perfil de expressão dos genes alvos (Tabela 3) foi realizada com as mesmas amostras de cDNA dos genes de referência. As condições da RT-qPCR foram realizadas com os mesmos critérios aplicados para os genes de referência e com concentração de 500 nmol para todos os iniciadores. Os genes alvos foram selecionados no genoma de *Ppe8* sendo escolhidos os genes pertencentes à classe de metabolismo de carboidratos. As análises de quantificação relativa (RQ), Cq e valores de eficiência foram determinados usando o programa Miner (ZHAO & RUSSEL, 2005). Estes valores foram calculados para a expressão relativa com o programa qBase v1.3.5 (HELLEMANS *et al.*, 2007).

**Tabela 3.** Características dos iniciadores desenhados para os genes alvo

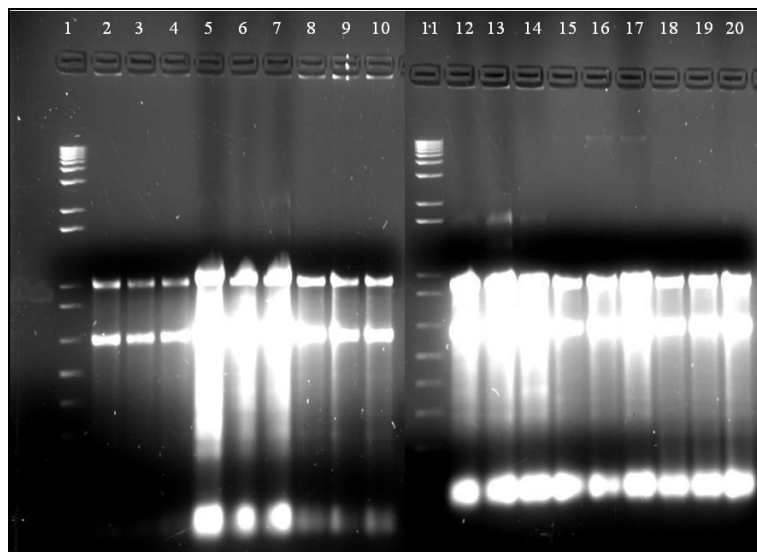
<b>Gene</b>	<b>Forward (5'-3') primer</b> <b>Reverse (5'-3') primer</b>	<b>Tamanho do amplicon (pb)</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Função do gene</b>
<i>glgC</i>	ACCTTTACGACCGCAACTG ACGACTTCACGACCACATTC	183	62	Glicose-1-fosfato-adeniltransferase
<i>glgB</i>	CCTCAATCACGAAACGCAG ATCCAGCCCATGTTCCACT	141	62	Enzima de quebra da 1,4 alfa-glucana
<i>treY</i>	GCGACTTCACGTATGCCAC TGAAATAGCGGTTGTCGGTC	117	62	Maltoglicosil trealose sintase
<i>treZ</i>	ACCTCGTTCGTGATGTTCC AGCCGTATTCCTCTTCCATG	166	60	Maltoglicosil trealose hidrolase
<i>glgA</i>	ATCCACAACCTCGCCTATC AAAGCTGACCGTAAACTCG	109	62	Sintase do glicogênio
<i>otsA</i>	CCACGACTACGAAGGCTATTG ACGGAATGTGCAGGAAGAAG	173	62	Trealose-6-fosfato-sintase
<i>sdhD</i>	TGCTCGTCCTCTTCTTTGG ACGGGCTTGATGTAGTCCA	163	62	Succinato desidrogenase
<i>ORF_6066</i>	GGATTTTCGCACGCTGTAT GAGAGTTCACCGTCATCGC	81	60	Gluconolactonase
<i>ORF_7487</i>	ATCTTCACGTTTCATCAGCG CCATCACCAGTCCCATTC	139	62	Transportador de açúcar do tipo ABC



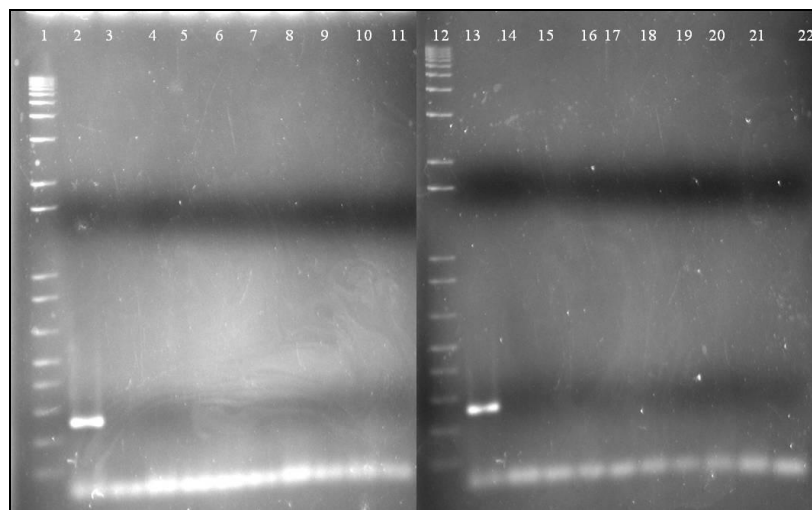
## 4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1. Obtenção do RNA bacteriano

Através da eletroforese em gel de agarose 2%, foi possível observar que a extração do RNA total foi realizada com eficiência já que não houve degradação do RNA ribossomal (rRNA) (Figura 1). Em adição, mostra que o tratamento com DNase foi eficiente pois não houve amplificação do fragmento de 260 pb do 16S rRNA bacteriano (Figura 2).



**Figura 1.** RNA total extraído de *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada em meio JMV suplementado com diferentes fontes de carbono Canaletas: 1 e 11 - marcador de peso molecular 1kb plus; 2, 3 e 4 - meio JMV com 0,5% sacarose; 5, 6 e 7 - meio JMV com 0,5% glicose; 8, 9 e 10 - meio JMV com 0,5% frutose; 12, 13 e 14 - meio JMV com 0,5% manitol; 15, 16 e 17 - meio JMV com 0,5% de ácido aconítico; e 18, 19 e 20 - caldo de cana-de-açúcar. Todos os tratamentos com triplicatas biológicas 1, 2 e 3.

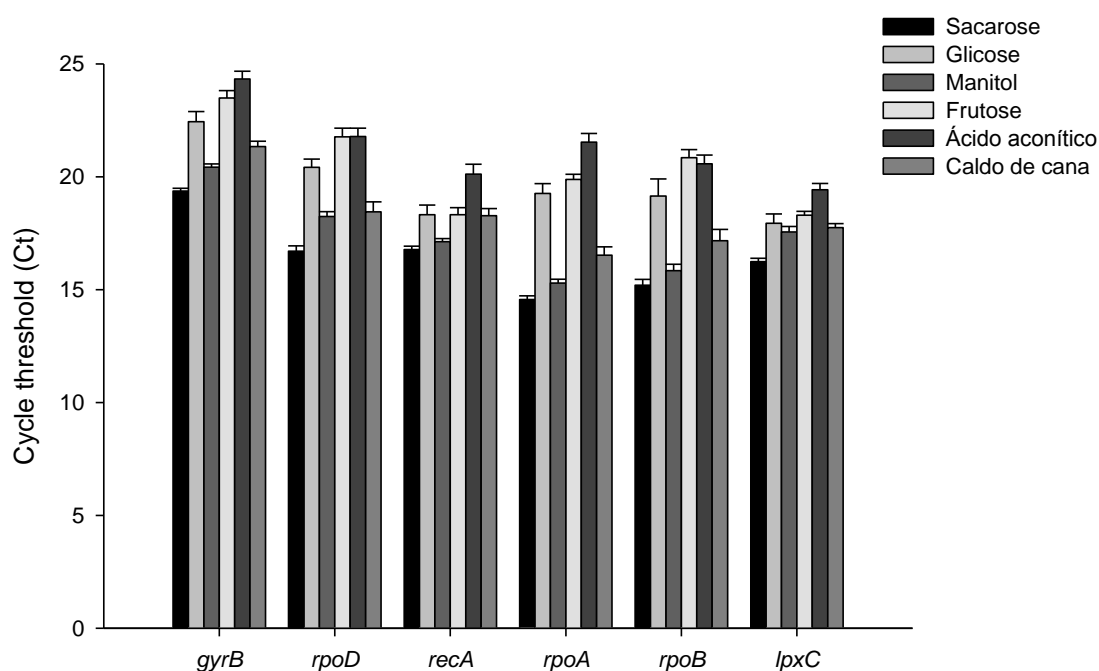


**Figura 2.** Produto de PCR amplificado com iniciadores específicos de *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada em meio JMV suplementado com 0,5% de diferentes fontes de carbono ou caldo de cana. Canaletas: 1 e 12 - marcador de peso molecular 1kb; 2 e 13 - controle positivo (DNA Ppe8); 3, 4 e 5 - sacarose; 6, 7 e 8 - glicose; 9, 10 e 11 - frutose; 14, 15 e 16 - manitol; 17, 18 e 19 - de ácido aconítico; e 20, 21 e 22 - caldo de cana-de-açúcar. Todos os tratamentos em triplicata biológica.

#### 4.5.2. Níveis de expressão dos genes de referência selecionados como candidatos

Para selecionar genes de referência confiáveis o RNA total foi isolado de *B. tropica* estirpe Ppe8 crescida em seis diferentes fontes de carbono e o cDNA foi produzido para comparar a expressão de seis genes. O valor de  $C_T$  (média de três réplicas) ficou na faixa de 14,6 a 24,3, indicando diferentes níveis de expressão (Figura 3). O gene *lpxC* apresentou valores de  $C_T$  médio de 16,24; 17,94; 17,55; 18,29; 19,42 e 17,74 nas fontes de carbono sacarose, glicose, manitol, frutose, ácido aconítico e caldo de cana-de-açúcar, respectivamente, já o gene *recA* apresentou valores de  $C_T$  médio de 16,77; 18,32; 17,12; 18,31; 20,12 e 18,28, respectivamente. Esses dois genes, pela análise do gráfico e valores de  $C_T$ , apresentaram resultados com variações reduzidas dentro das fontes de carbono usadas. Os valores variaram de 19,39 a 24,33 para o gene *gyrB*, de 14,56 a 21,53 para o gene *rpoA*, de 15,20 a 20,85 para o gene *rpoB* e de 16,70 a 21,78 para o gene *rpoD* (Figura 3).

RT-qPCR é um dos métodos de quantificação de ácidos nucleicos mais utilizados pois é uma técnica bastante específica e de alta sensibilidade (BUSTIN *et al.*, 2009). Um aspecto essencial de estudos de RT-qPCR é o uso de genes de referência para normalização de dados. Portanto, a escolha de genes de referência apropriados é bastante importante (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; GUÉNIN *et al.*, 2008; GUTIERREZ *et al.*, 2008). Alguns estudos têm mostrado que diferentes genes de referência podem modificar a conclusão dos resultados (GLARE *et al.*, 2002; DHEDA *et al.*, 2004; KRIEKOVA *et al.*, 2008). Vários genes são tradicionalmente conhecidos como constitutivos sendo amplamente utilizados, entretanto, mesmo genes envolvidos em processos celulares básicos podem apresentar variações significativas de expressão, não sendo apropriados para utilização como controles internos em determinadas situações (GUÉNIN *et al.*, 2008; GUTIERREZ *et al.*, 2008).

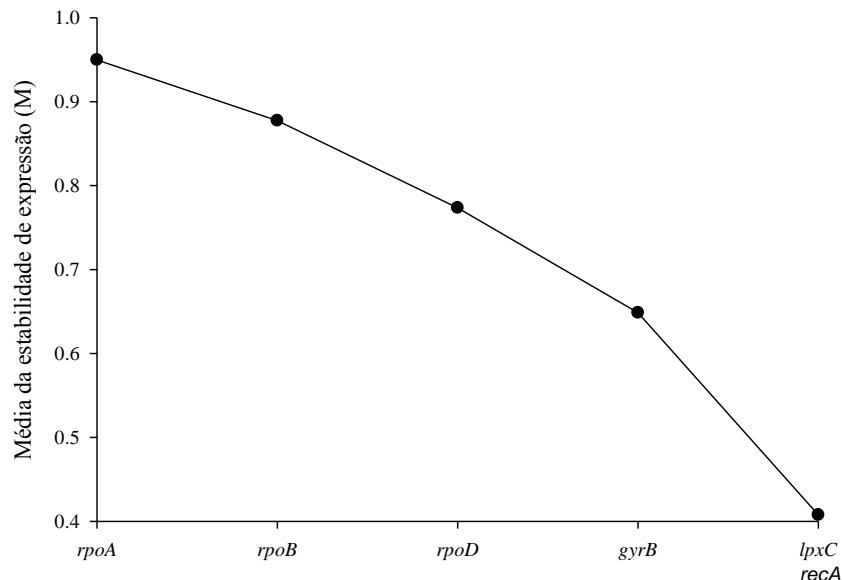


**Figura 3.** Valores de  $C_T$  de seis genes de referência determinados em *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada em seis diferentes fontes de carbono. Os valores de  $C_T$  foram mensurados de três réplicas biológicas. Barras significam o desvio padrão.

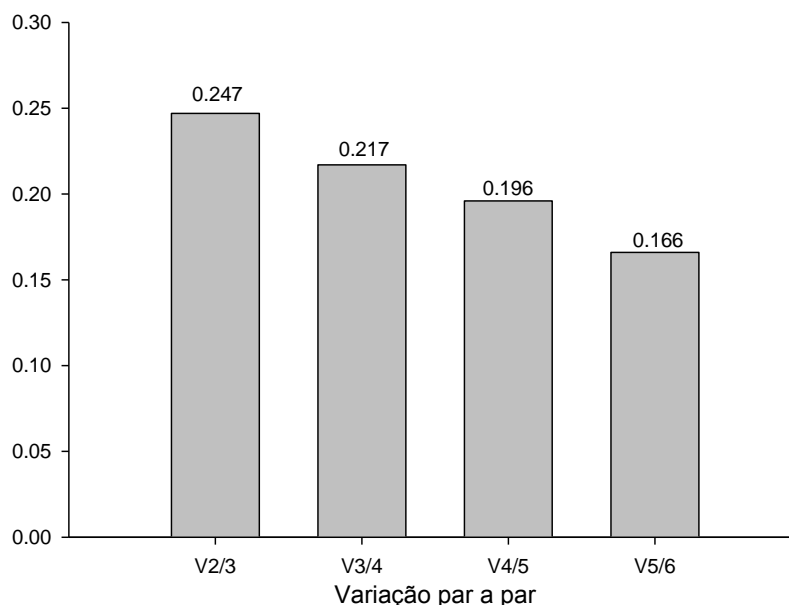
#### 4.5.3. Estabilidade dos genes de referência

Vários algoritmos estatísticos têm sido desenvolvidos para selecionar os genes de referência com expressões mais estáveis. Neste estudo foram utilizados dois programas mais comuns (GeNorm e NormFinder) para determinar os genes de referência mais estáveis. Tanto o GeNorm quanto o NormFinder empregam quantidades relativas derivadas do valor de  $C_T$  quando calculam a estabilidade (MCMILLAN & PEREG, 2014). A comparação de genes de referência usando diferentes algoritmos permite selecionar com maior precisão os genes que poderão ser usados como referência e reduz o risco de seleção artificial de transcritos co-regulados (CAPELLI *et al.*, 2008). O GeNorm analisa além do valor da estabilidade da expressão (M), o fator de normalização (NF) baseado na média geométrica do valor de expressão do conjunto de genes de referência testados. O gene com o menor valor de M é considerado de expressão mais estável enquanto aquele que apresentar o maior valor é considerado como tendo maior variabilidade de expressão nas condições testadas. Neste estudo, os genes *lpxC* e *recA* mostraram os menores valores de estabilidade (M) (0,4), seguido pelo gene *gyrB* (0,65) que foram indicados como os genes mais estáveis pelo GeNorm, seguido por *rpoD*, *rpoB* e *rpoA* (0,77, 0,88 e 0,94, respectivamente), indicado como menos estáveis. Os genes *rpoD*, *rpoB* e *rpoA* são considerados os genes menos estáveis entre os genes analisados através do GeNorm (Figura 4), embora o valor médio de estabilidade para todos os genes tenham ficado abaixo do valor de corte (1,5) proposto por VANDESOMPELE *et al.* (2002). Os menores valores indicam os genes mais estáveis (Figura 4). Portanto realizou-se uma análise do número ótimo de genes necessários para a normalização acurada dos dados pelo programa GeNorm que calcula a variação V. A variação par a par (*pair-wise*,  $V_n/V_{n+1}$ ) também é avaliada, a qual calcula o efeito da adição do próximo gene mais estável no NF e determina o número ótimo de genes para uma normalização acurada. O valor dessa variação foi de 0,247; 0,217; 0,196 e 0,166 para as variações par-a-par (2/3, 3/4, 4/5 e 5/6,

respectivamente) (Figura 5). Esses valores ficaram acima do recomendado (0,15) pelos desenvolvedores do GeNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Considerando este valor proposto, a utilização de três genes ainda não seria suficiente para uma normalização perfeita, e os valores mostram tendência para o uso de mais de seis genes. Em estudos de expressão de genes do peixe bacalhau do Atlântico durante diferentes temperaturas, os valores de *pair-wise* também ficaram acima de 0,15 (AURSNEs *et al.*, 2011). Em estudos de expressão de genes de *Sesamia inferens*, uma mariposa importante praga de arroz na China, durante vários estágios de crescimento, estresses abióticos e diferentes tecidos coletados, os valores de *pair-wise* também ficaram acima de 0,15 em todas as condições testadas, e os autores selecionaram, portanto, três genes para normalização (SUN *et al.*, 2015). DERVEAUX *et al.* (2010) sugerem que tipicamente entre três e cinco genes são necessários para uma normalização precisa. Três genes de referência foram considerados suficientes, *lpxC*, *recA* e *gyrB*, para fins de praticidade e redução de custos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; AURSNEs *et al.*, 2011). Além disso, independente dos valores, esses resultados são interessantes, pois não existem estudos na literatura mostrando genes normalizadores para esta estirpe bacteriana.



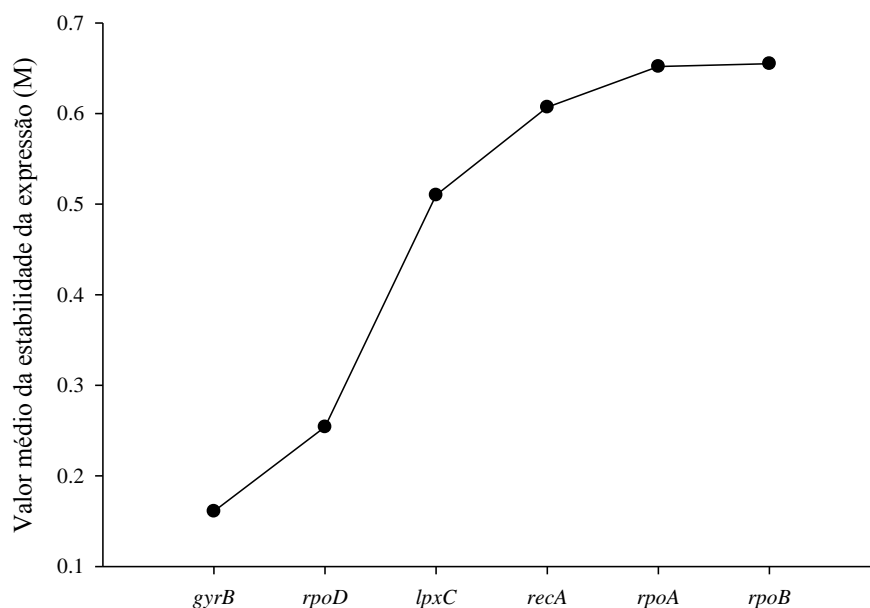
**Figura 4.** Análise da estabilidade de expressão de seis genes candidatos usando o programa GeNorm. Valor da estabilidade de expressão média (M), genes à direita são os mais estáveis e os genes à esquerda os menos estáveis.



**Figura 5.** Determinação do número ótimo de genes normalizadores. Cada barra representa alteração na precisão quando mais um gene é adicionado de acordo com a ordem estabelecida na Figura 8.

Adicionalmente às análises do GeNorm, os mesmos dados foram analisados com o programa NormFinder (ANDERSEN *et al.*, 2004) para determinar a estabilidade de expressão dos genes candidatos. A análise com o NormFinder sugeriu que os genes *gyrB*, *rpoD* e *lpxC* são os mais estáveis com valores de 0,16; 0,25 e 0,51, respectivamente e os genes *recA*, *rpoA* e *rpoB* os menos estáveis, com valores de 0,61; 0,65 e 0,66, respectivamente (Figura 6). Tanto o NormFinder quanto o GeNorm identificaram os genes *lpxC* e *gyrB* como genes mais estáveis e o gene *rpoA* e *rpoB* como os mais variáveis, apesar de todos os genes terem se mantidos com valores de  $M < 1,5$  conforme indicado por VANDESOMPELE *et al.*, (2002). Embora alguns autores concordem com a utilização de apenas um gene como controle (BRUNNER *et al.*, 2004; CZECHOWSKI *et al.*, 2005; GUTIERREZ *et al.*, 2008), alguns estudos sugerem a utilização de dois ou mais genes para a normalização dos dados por indicarem que isso resultaria em interpretações mais consistentes dos resultados (VANDESOMPELE *et al.*, 2002; TONG *et al.*, 2009; GALISA *et al.*, 2012). Por conta disso, optou-se pela utilização dos genes *lpxC*, *recA* e *gyrB* para normalização de acordo com o programa GeNorm pois o gene *recA* pareceu estar com os valores de  $C_T$  menos variáveis entre os tratamentos que *rpoD* (Figura 3).





**Figura 6.** Estabilidade da expressão dos genes para os seis genes candidatos a partir da análise com o programa NormFinder.

Os três genes mais estáveis selecionados para os testes de normalização de genes diferencialmente expressos durante o crescimento de *B. tropica* em diferentes fontes de carbono foram: a) *lpxC*, que codifica uma UDP-3-O-acil N-acetilglucosamina deacetilase que catalisa o segundo passo da via biossintética do lipídeo A (WHITTINGTON *et al.*, 2003), b) *recA* (recombinase A), que está envolvido na recombinação de seqüências de DNA homólogas e permite a troca de fragmentos de DNA (RICHERT *et al.*, 2007) e c) *gyrB* que codifica uma subunidade  $\beta$  da DNA girase uma topoisomerase II responsável por introduzir *supercoils* negativos em cromossomos bacterianos durante a replicação do genoma (RICHERT *et al.*, 2007). O gene *recA* também foi o mais estável quando *G. diazotrophicus* foi cultivada sob diferentes fontes de carbono (GALISA *et al.*, 2012). É um gene de cópia única presente em todas as bactérias, sendo essencial para a replicação do DNA (HUANG, 1996). Já foi verificado que enzimas envolvidas na via biossintética do lipídeo A, são significativamente reprimidas quando submetidas a estresse oxidativo, sugerindo que o *lpxC* se mantém estável enquanto outros genes da mesma via sofrem regulação diferencial (HOMMAIS *et al.*, 2011). Além disso, a expressão do gene *recA* já foi descrita como sendo a mais estável em outras bactérias tais como *Pectobacterium antrosepticum*, *A. brasilense*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Vibrio parahaemolyticus* (TAKLE *et al.*, 2007; CRAWFORD *et al.*, 2014; MCMILLAN & PEREG, 2014; MA *et al.*, 2015) enquanto que o gene *gyrB* foi mais estável em *Staphylococcus pseudintermedius*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Xanthomonas citri* (JACOB *et al.*, 2011; CRAWFORD *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2014; SIHTO *et al.*, 2014). Porém, *lpxC* e *gyrB* foram encontrados menos estáveis quando *G. diazotrophicus* foi cultivada em diferentes fontes de carbono (GALISA *et al.*, 2012). Estes resultados indicam que o padrão de expressão dos genes pode ser variável em procariontos dependendo das condições experimentais e espécies bacterianas.

A comparação dos dois programas, GeNorm e NormFinder, para cada fonte de carbono analisada em separado, mostrou que os genes mais estáveis para as fontes de carbono foram: ácido aconítico - *rpoA*, *rpoB* e *recA* (GeNorm e NormFinder); Glicose - *rpoA*, *gyrB* e *recA* (GeNorm e NormFinder); Frutose - *gyrB*, *rpoD* e *recA* (GeNorm) e *rpoA*, *lpxC* e *recA*

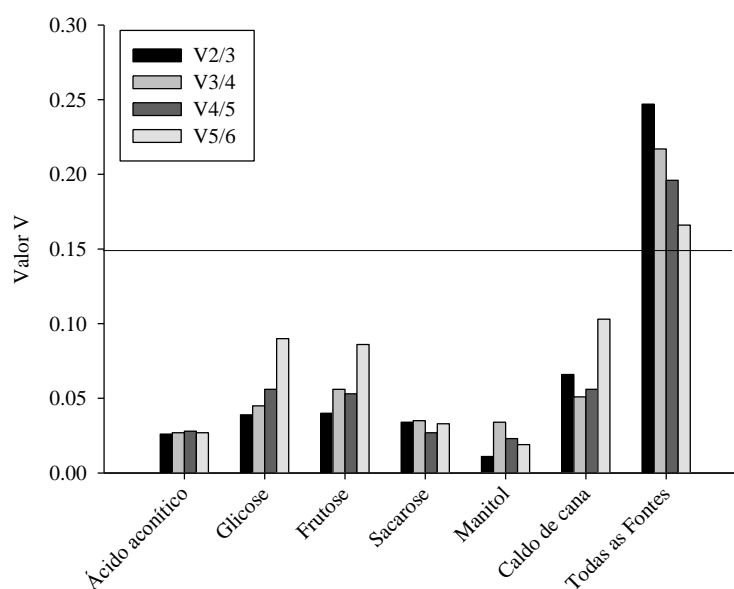
(NormFinder); Sacarose - *rpoA*, *gyrB* e *recA* (GeNorm) e *rpoA*, *recA* e *gyrB* (NormFinder); Manitol - *rpoA*, *gyrB* e *recA* (GeNorm) e *gyrB*, *rpoD*, *lpxC* e *rpoA* (GeNorm) e Caldo-de-cana - *gyrB*, *recA* e *lpxC* (GeNorm) e *rpoA*, *recA*, *lpxC* e *gyrB* (NormFinder) (Tabela 4). Esses resultados são interessantes, pois possibilitam o uso de genes de referência em ensaios com fontes de carbono específicas. É importante salientar que houve pouca variação entre os programas testados e que embora tenhamos citado sempre os três mais estáveis, todos os genes foram estáveis dentro de cada fonte de carbono independentemente do programa testado, pois apresentaram valores de estabilidade (M)<1,5.

**Tabela 4.** Comparação dos programas GeNorm e NormFinder no cálculo da estabilidade dos genes em cada fonte de carbono.

Fontes de carbono	GeNorm						NormFinder					
	<i>lpxC</i>	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>	<i>lpxC</i>	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>
ACO	0.109	0.054*	0.082	0.132	0.007*	0.007*	0.081	0.076*	0.08	0.111	0.002*	0.002*
GLI	0.195	0.048*	0.095*	0.139	0.048*	0.31	0.245	0.017*	0.035*	0.106	0.017*	0.37
FRU	0.209	0.108*	0.078*	0.078*	0.167	0.312	0.074*	0.09*	0.122	0.199	0.039*	0.352
SAC	0.153	0.085*	0.047*	0.13	0.047*	0.116	0.133	0.042*	0.037*	0.112	0.016*	0.089
MAN	0.099	0.026*	0.01*	0.081	0.01*	0.107	0.055*	0.062	0.05*	0.054*	0.055*	0.077
CALDO	0.12*	0.12*	0.178*	0.236	0.202	0.365	0.064*	0.042*	0.064*	0.258	0.13*	0.426

\* genes mais estáveis; ACO=Ácido aconítico; GLI=Glicose; FRU=Frutose; SAC=Sacarose; MAN=Manitol; CALDO=Caldo-de-cana

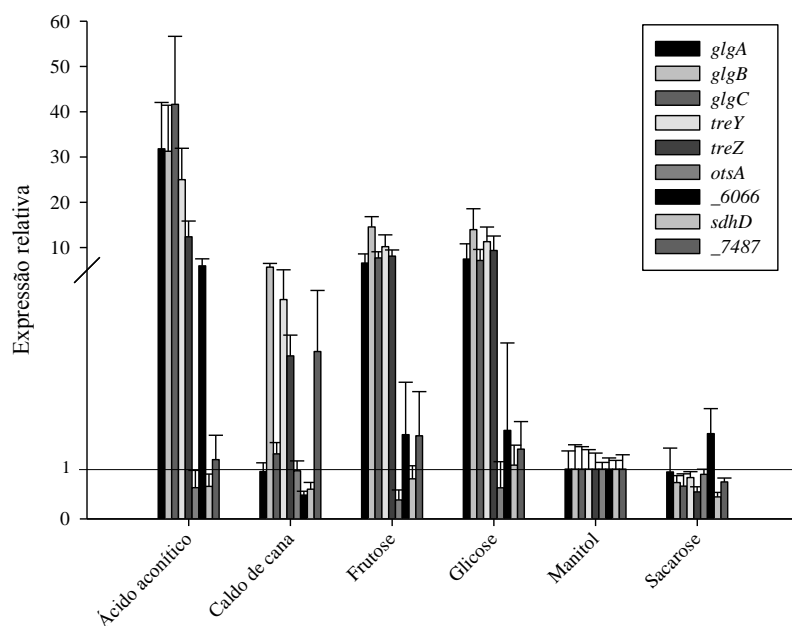
A partir dos resultados obtidos acima, realizamos o teste de variação par-a-par para cada fonte de carbono separadamente (Figura 7). Verificamos que para todas as fontes de carbono o valor  $V < 0,15$  em  $V2/3$  indicando a possibilidade do uso de apenas dois genes de referência para cada fonte de carbono testada em separado, sem a necessidade do uso de um terceiro gene.



**Figura 7.** Determinação do número ótimo de genes normalizadores nas fontes de carbono separadamente e todas juntas.

#### 4.5.4. Quantificação relativa (RQ) dos genes alvos

Foram escolhidos nove genes alvos para a validação dos genes normalizadores participantes do metabolismo de carboidratos. O nível dos transcritos desses genes foi mensurado por RT-qPCR durante a metade da fase exponencial de crescimento da estirpe PPe8 nas diferentes fontes de carbono. Os genes *recA*, *lpxC* e *gyrB* foram usados como genes normalizadores. O manitol foi usado como calibrador (RQ=1.0) para quantificação relativa (Figura 8), pois é a fonte de carbono usada no meio original para o isolamento e crescimento da espécie *B. tropica* (BALDANI *et al.*, 2014).



**Figura 8.** Expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos em *B. tropica* estirpe PPe8 cultivada no meio JMV suplementado com diferentes fontes de carbono e caldo de cana. Os níveis de expressão dos genes foram quantificados usando RT-qPCR e a expressão relativa usando a fórmula  $Q = E^{-\Delta Cq}$  usando o programa qBase v1.3.5. Os genes *lpxC*, *recA* e *gyrB* foram usados como referência para a normalização dos dados e a expressão em células cultivadas com manitol foi usada como calibrador (controle) igual a 1 (RQ=1). Barras indicam o desvio padrão.

Os níveis de expressão de todos os genes foram afetados pela fonte de carbono usada quando comparados ao controle manitol (Figura 8). Quando *B. tropica* estirpe PPe8 foi cultivada no meio JMV suplementado com ácido aconítico como fonte de carbono, a expressão dos genes *glgA*, *glgB* e *glgC*, que são enzimas envolvidas na biossíntese do glicogênio, foi aumentada de 31,2 a 41,6 vezes. Já quando frutose, glicose, caldo de cana-de-açúcar e sacarose foram usadas como fonte de carbono, a expressão de *glgA* foi de 6,5; 7,4; 0,9 e 0,9, respectivamente, de *glgB* foi 14,5; 13,9; 5,6 e 0,7, respectivamente e de *glgC* foi 7,7; 7,1; 1,3 e 0,6, respectivamente (Figura 8). Pode-se perceber que a fonte de carbono altera os níveis de expressão dos genes relacionados a biossíntese do glicogênio.

A biossíntese do glicogênio é a principal estratégia de armazenamento de energia e muitos microrganismos acumulam carbono em condição de falta de energia presente no

ambiente (WILSON *et al.*, 2010). Embora *B. tropica* possa crescer nestas fontes de carbono, o alto nível de expressão desses genes pode indicar falta de fonte de energia durante a fase de avaliação. Outra hipótese é que os níveis de glicogênio são maiores quando há excesso de carbono no meio (IGLESIAS & PREISS, 1992). Além disso, o glicogênio pode prevenir a degradação de proteínas e RNA quando células bacterianas estão sob condições de falta de nutriente indicando que o glicogênio fornece carbono e energia para a sobrevivência da célula sob estresse (IGLESIAS & PREISS, 1992). A síntese de glicogênio também parece estar envolvida com a fixação biológica de nitrogênio. Quanto maior a síntese de glicogênio e o seu armazenamento, menor a quantidade de fontes de carbono direcionada para a fosforilação oxidativa e conseqüentemente menor produção de ATP, reduzindo assim a fixação biológica de nitrogênio (GLICK, 2012). Mutantes na região do gene *glgA* de *Rhizobium tropici* defectivos na capacidade de síntese do glicogênio, apresentaram performance simbiótica superior em plantas de feijão (MARROQUI *et al.*, 2001). As plantas apresentaram massa seca significativamente maior quando comparadas às plantas inoculadas com as estirpes selvagens e o controle (sem a bactéria), além de apresentarem maior número de nódulos e nódulos com maior massa (MARROQUI *et al.*, 2001). Portanto, o aumento da eficiência da simbiose pode se dar função de dois fatores: ausência na produção de glicogênio e/ou aumento no potencial respiratório (que aumenta a síntese de ATP auxiliando a fixação, uma vez que demanda um alto gasto energético e reduz o nível de oxigênio disponível, molécula esta que inibe a enzima responsável pela fixação, a nitrogenase) (MARROQUI *et al.*, 2001). Com isso, o uso de ácido aconítico como fonte de carbono, claramente aumentou o nível de expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de glicogênio, indicando que tal fonte de carbono pode não ser a ideal em termos de estímulo da fixação biológica de nitrogênio ou que a concentração do ácido orgânico usada tem de ser menor quando comparada as demais, ou ainda, pode estar ocasionando alguma condição estressante. Além disso, parece que a sacarose pode então reduzir a biossíntese do glicogênio e com isso favorecer a fixação biológica de nitrogênio. Outra informação importante é que os genes *glgA* e *glgC* participam do mesmo *operon*, significando que este *operon* é regulado nas fontes de carbono, já o gene *glgB* participa de um outro *operon* e isto pode explicar a espessão relativa diferencial deste gene em relação aos outros dois.

Com relação aos genes *treZ* e *treY*, os quais participam da biossíntese de trealose, apresentaram níveis de expressão variando de 12,4 a 24,9, respectivamente, no cultivo em ácido aconítico (Figura 8). Já em glicose, frutose, caldo de cana-de-açúcar e sacarose, os aumentos foram menos pronunciados sendo de 9,3; 8,1; 3,2 e 0,5, respectivamente, para o gene *treZ* (Figura 8). Já para o gene *treY*, os aumentos foram de 11,3; 10,2; 4,4 e 0,8 respectivamente (Figura 8). Tais valores estão de acordo com a expressão dos genes relacionados a biossíntese de glicogênio pois cada uma participa de um passo subsequente na síntese de trealose. Além do mais, participam do mesmo *operon* indicando que o mesmo é regulado. Com relação a via *treY/treZ*, que usa o glicogênio como substrato inicial, foi observado que os níveis de expressão de ambos os genes são maiores nos tratamentos em que os genes da biossíntese desse substrato (glicogênio) é maior. Esses dois genes participam de forma subsequente da produção de trealose na via *treY/treZ*. A trealose é um açúcar chave em microorganismos (ARGÜELLES, 2000; PAUL *et al.* 2008) e está particularmente envolvida com a resistência a estresses, como o osmótico (PURVIS *et al.* 2005), oxidativo (CAO *et al.* 2008) e térmico (KANDROR *et al.* 2002, 2004). Além de ser uma molécula universal de estresse, a trealose também pode ser usada como fonte de carbono e energia. Foi verificado que com exceção da sacarose, a expressão desses genes foi aumentada em todas as outras fontes de carbono usadas. Esse resultado corrobora com o resultado anterior, onde foi possível

verificar que a sacarose reprime a expressão de genes relacionados à biossíntese de glicogênio e portanto isto pode influenciar nos genes seguintes que utilizam o glicogênio como substrato inicial. Esse resultado vai de encontro com os obtidos por TZVETKOV *et al.* (2003) que verificaram redução na biossíntese de trealose através da via *treY/treZ* quando glicogênio estava reduzido em *Corynebacterium glutamicum*. Esses mesmos autores verificaram ainda que em concentrações baixas de sacarose no meio (aproximadamente 0,5%), a produção de glicogênio e posterior biossíntese de trealose foi reprimida drasticamente quando em comparação ao meio com 10% de sacarose, indicando que a sacarose pode afetar a síntese de trealose por esta via.

Outro gene alterado em função das fontes de carbono utilizadas, foi o *otsA* que também participa da biossíntese de trealose, porém em outra via. O gene *otsA* codifica a enzima trealose-6-fosfato sintase que catalisa a transferência da glicose da UDP - glicose para a glicose-6-fosfato, formando a trealose-6-fosfato, que posteriormente é hidrolisada pela enzima trealose-6-fosfato fosfatase (*otsB*) gerando trealose (REINA-BUENO *et al.*, 2012). A expressão de *otsA* foi 0,62; 0,97; 0,38; 0,62 e 0,89 nas fontes de carbono ácido aconítico, caldo de cana-de-açúcar, frutose, glicose e sacarose, respectivamente, indicando que possivelmente esta via pode ser reprimida em todas as fontes de carbono usadas (Figura 8). Já foi verificado que a trealose fosfato pode ser um precursor da síntese de lipídeos da parede celular de bactérias (SHIKIMATA & MINATOGAWA, 2000 e TZVETKOV *et al.*, 2003). Precursores da biossíntese de parede celular podem ativar a defesa de plantas contra microrganismos (NEWMAN *et al.*, 2002; ERBS & NEWMAN, 2003; MISHINA & ZEIER, 2007; PETROCELLI *et al.*, 2012). Talvez esta repressão de *otsA* seja uma maneira de contornar as defesas da planta quando colonizando endofiticamente, já que as fontes de carbono utilizadas no trabalho são componentes do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar, bem como a sacarose é vista como o açúcar em maior concentração no apoplasto (ASSIS JÚNIOR *et al.*, 2004). Outra hipótese é de que a via *treY/treZ* foi ativada nas fontes de carbono ácido aconítico, caldo de cana, glicose e frutose, pois provavelmente estariam fornecendo excesso de substrato e energia fazendo com que a bactéria privilegiasse esta via em detrimento a *otsA*. Já foi visto que a síntese de trealose em *Corynebacterium glutamicum* é governada por duas ou mais vias de síntese deste dissacarídeo presumidamente de forma coordenada, pois quando mutantes defectivos na biossíntese de trealose em somente uma via foi crescido em meio contendo 1% de sacarose, a produção de trealose foi continuada, porém em mutantes defectivos nas vias *otsA* e *treY/treZ*, a capacidade de síntese de trealose caiu drasticamente indicando que essas duas vias são primordiais neste organismo (TZVETKOV *et al.*, 2003). A partir desses resultados pode-se supor que essas duas vias de biossíntese do dissacarídeo trealose estão presentes no genoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 e que ambas as vias são reprimidas na presença de sacarose, ou por redução de uma condição estressante ou pela concentração do açúcar no meio.

Com relação à ORF \_6066 que codifica uma gluconolactonase também houve diferença na expressão desse gene. A expressão dessa ORF foi 5,98; 0,48; 1,69; 1,77 e 1,71 nas fontes de carbono ácido aconítico, caldo de cana, frutose, glicose e sacarose, respectivamente (Figura 8). Foi possível perceber que apenas o caldo-de-cana reprimiu a expressão desse gene. Esta ORF também foi reprimida na presença do líquido do apoplasto (dados do transcriptoma). Grande parte das células vivas consome glicose via glicólise para produção de piruvato que é oxidado na via do ácido cítrico gerando NADH (CHEN *et al.*, 2008). No entanto, a glicose não apenas serve como molécula energética, mas também pode ser catabolisada para produzir compostos cruciais à sobrevivência das células como através da via da pentose fosfato que forma ácidos nucleicos, a síntese de D-gluconato que é

importante na detoxificação e excreção de compostos orgânicos externos e a síntese de L-ácido ascórbico ou vitamina C (LINSTER & SCHAFTINGEN, 2007). Nessa via catabólica secundária, uma  $\alpha$  lactona ou uma  $\gamma$  lactona é formada e uma lactonase é requerida para interconverter as formas cíclicas e lineares destas lactonas intermediárias (CHEN *et al.*, 2008). A redução da expressão deste gene pelo caldo de cana pode indicar que toda a fonte de energia no caldo está sendo usada para armazenamento de energia em função de algum estresse pela bactéria (o caldo de cana tende a se oxidar durante o cultivo), que pode ser para proteção contra degradação de proteína e RNA, proteção contra estresses, como verificado, a bactéria nesta fonte de carbono superexpressou genes relacionados à síntese de glicogênio e reduziu a expressão de gene relacionado ao ciclo do ácido cítrico, *sdhD*, (abaixo), indicando que a redução na síntese do piruvato na via glicolítica, pela preferência na produção de glicogênio, pode ter afetado a expressão do gene ou talvez essa redução também no *sdhD* seja para que toda a energia seja armazenada na forma de glicogênio. Ou o pico de expressão desse gene tenha ocorrido em momento anterior e no momento de coleta a biossíntese do glicogênio se tornou prioritária.

O gene *sdhD* que codifica uma proteína de membrana succinato desidrogenase, também apresentou expressão relativa diferencial. A expressão desse gene foi de 0,65; 0,60; 0,80; 1,08 e 0,44 nas fontes de carbono ácido aconítico, caldo de cana, frutose, glicose e sacarose, respectivamente (Figura 8). Somente a fonte de carbono glicose apresentou expressão relativa semelhante ao calibrador manitol. Em todas as demais fontes de carbono, a expressão desse gene foi reprimida. Essa enzima cataliza a oxidação do succinato a fumarato na via do ácido cítrico com a redução de ubiquinona (MASSUNG *et al.*, 2008). Provavelmente, a glicose é a fonte de carbono que fornece maiores concentrações dos precursores do succinato. Se for levada em consideração a via glicolítica, que emprega como substrato inicial a glicose, que após várias etapas gera duas moléculas de piruvato e por fim a sua entrada no ciclo do ácido cítrico (NELSON & COX, 2011), essa afirmação é verdadeira. Esse resultado está de acordo com os demais, uma vez que havendo redução de precursores para esta via, pela alta expressão de genes da biossíntese e assimilação de glicogênio, reduz-se também o substrato inicial, piruvato, para a via do ácido cítrico. Outra hipótese é que o gene *sdhD* participa do complexo II da cadeia transportadora de elétrons na fosforilação oxidativa (MASSUNG *et al.*, 2008) indicando que este complexo seja menos ativo nesta etapa nas diferentes fontes de carbono estudadas. Genes relacionados à via de fosforilação oxidativa foram ativados em *B. phytofirmans* sob condição de estresse à seca (SHEIBANI-TEZERJI *et al.*, 2015), indicando que este gene é importante na proteção contra estresse.

A ORF que codifica um sistema de transporte de açúcar do tipo ABC, (ORF\_7487) também apresentou expressão diferencial na presença de diferentes fontes de carbono. A expressão dessa ORF foi de 1,19; 3,36; 1,67; 1,40 e 0,74 em comparação ao manitol nas fontes de carbono ácido aconítico, caldo-de-cana, frutose, glicose e sacarose, respectivamente (Figura 8). Aparentemente, a fonte de carbono que induziu cerca de três vezes a expressão dessa ORF foi o caldo de cana. Isto pode ser em função dos diferentes açúcares e ácidos orgânicos contidos no caldo de cana (ASSIS JÚNIOR *et al.*, 2004; TEJERA *et al.*, 2006) e também em função dos diferentes tipos de açúcares que Ppe8 pode metabolizar (REIS *et al.*, 2004). Já na presença de sacarose, essa ORF foi reprimida, entretanto, com este resultado, não se pode concluir que o açúcar não esteja sendo metabolizado pela bactéria pois a mesma cresce bem na presença da sacarose. Todavia, REIS *et al.* (2004) não observaram a utilização de sacarose como fonte de carbono por Ppe8, além disso existem inúmeros transportadores de açúcar que não foram testados neste trabalho.

Esses resultados indicam que existe uma regulação específica no metabolismo de energia celular o que poderia explicar as alterações observadas em cada gene. Já é sabido que *B. tropica* é capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono como ácido aconítico, sacarose, glicose, frutose, manitol (REIS *et al.*, 2004) e sacarose (dados não mostrados).

#### 4.6. CONCLUSÕES

- ✓ Neste estudo, foi possível selecionar genes de referência estáveis em diferentes fontes de carbono para *B. tropica* estirpe Ppe8.
- ✓ Os genes *lpxC*, *recA* e *gyrB* de *B. tropica* são genes de referência estáveis para avaliar a expressão diferencial de genes por RT-qPCR durante o cultivo da bactéria em diferentes fontes de carbono.
- ✓ Este estudo fornece um conjunto de genes de referência que podem ser aplicados para avaliar a expressão de genes alvo nesta bactéria quando cultivada em diferentes condições fisiológicas.
- ✓ Este é o primeiro estudo que envolve a identificação e seleção de genes normalizadores para análise de expressão gênica de *B. tropica* estirpe Ppe8.





## 4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; BARAKAT, M.; MARTEL, M.; HEULIN, T. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p.787-794, 1999.
- AIZAWA, T.; VE, N.B.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, p.1152-1157, 2010.
- AIZAWA, T.; VIJARNSORN, P.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acid-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.61, p.1645-1650, 2011.
- ANDERSEN, C.; JENSEN, J.; ØRNTOFT, T. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied. *Cancer Research*, v.64, p.5245-5250, 2004.
- ANGUS, A.A.; AGAPAKIS, C.M.; FONG, S.; YERRAPRAGADA, S.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; YANG, P.; SONG, N.; KANO, S.; CABALLERO-MELLADO, J.; DE FARIA, S.M.; DAKORA, F.D.; WEINSTOCK, G.; HIRSCH, A.M. Plant-associated symbiotic burkholderia species lack hallmark strategies required in Mammalian pathogenesis. *PloS One*, v.9, p.1-12, 2014.
- ARGÜELLES, J.C. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology*, v.174, p.217-224, 2000.
- ASSIS JÚNIOR, A.; KATSUKI, A.; AKAO, S. N<sub>2</sub> fixation in sugarcane and population of N<sub>2</sub>-fixing endophytes in stem apoplast solution. *Philippine Journal of Crop Science*, v.29, p.45-58, 2004.
- AURSNES, I.A.; RISHOVD, A.L.; KARLSEN, H.E.; GJØEN, T. Validation of reference genes for quantitative RT-qPCR studies of gene expression in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) during temperature stress. *BMC Research Notes*, v.4, p.1-8, 2011.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, v.384, p.413-431, 2014.
- BELLONE, S.C.; BELLONE, C.H. Presence of endophytic diazotrophs in sugarcane juice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.22, p.1065-1068, 2006.
- BEUKES, C.W.; VENTER, S.N.; LAW, I.J.; PHALANE, F.L.; STEENKAMP, E.T. South african papilionoid legumes are nodulated by diverse Burkholderia with unique nodulation and nitrogen-fixation Loci. *PloS one*, v.8, p.e68406, 2013.
- BOA SORTE, P.M.F. Estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar cultivada em duas regiões do Brasil. Seropédica: UFRRJ, 2013, 107p. (Tese de Doutorado).
- BOURNAUD, C.; DE FARIA, S.M.; DOS SANTOS, J.M.F.; TISSEYRE, P.; SILVA, M.; CHAINTREUIL, C.; GROSS, E.; JAMES, E.K.; PRIN, Y.; MOULIN, L. Burkholderia species are the most common and preferred nodulating symbionts of the Piptadenia group (tribe Mimoseae). *PloS one*, v.8, p.e63478, 2013.
- BRUNNER, A.M.; YAKOVLEV, I.A.; STRAUSS, S.H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology*, v.4, p.14, 2004.

- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v.55, p.611-22, 2009.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; SANTOS, P.E.-D.-L. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.1165-1172, 2004.
- CAO, Y.; WANG, Y.; DAI, B.; WANG, B.; ZHANG, H.; ZHU, Z.; XU, Y.; CAO, Y.; JIANG, Y.; ZHANG, G. Trehalose is an important mediator of Cap1p oxidative stress response in *Candida albicans*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.31, p.421-425, 2008.
- CAPPELLI, K.; FELICETTI, M.; CAPOMACCIO, S.; SPINSANTI, G.; SILVESTRELLI, M.; SUPPLIZI, A.V. Exercise induced stress in horses: selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization. *BMC Molecular Biology*, v.9, p.49, 2008.
- CHEN, W.-M.; DE FARIA, S.M.; CHOU, J.-H.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J.P.W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.58, p.2174-2179, 2008.
- CHEN, W.-M.; DE FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; LIN, K.-Y.; CHOU, J.-H.; SHEU, S.-Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, p.1055-1059, 2007.
- CHEN, W.-M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.-H.; BARRIOS, E.; DE FARIA, S.M.; ELLIOTT, G.N.; SHEU, S.-Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.56, p.1847-1851, 2006.
- COENYE, T.; HOLMES, B.; KERSTERS, K.; GOVAN, J.R.; VANDAMME, P. *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al. 1960) Gillis et al. 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami et al. 1994 are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi et al. 1993 and *Burkholderia plantarii* (Azegami et al. 1987) Urakami et al. 1994, respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p.37-42, 1999.
- COENYE, T.; LAEVEN, S.; WILLEMS, A.; OHLÉN, M.; HANNANT, W.; GOVAN, J.R.; GILLIS, M.; FALSÉN, E.; VANDAMME, P. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.1099-1107, 2001.
- COMPANT, S.; KAPLAN, H.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; AIT BARKA, E.; CLÉMENT, C. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology Ecology*, v.63, p.84-93, 2008.
- CRAWFORD, E.C.; SINGH, A.; METCALF, D.; GIBSON, T.W.G.; WEESE, S.J. Identification of appropriate reference genes for qPCR studies in *Staphylococcus pseudintermedius* and preliminary assessment of *icaA* gene expression in biofilm-embedded bacteria. *BMC Research Notes*, v.7, p.451, 2014.
- CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.-R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v.139, p.5-17, 2005.
- DALLAS, P.B.; GOTTARDO, N.G.; FIRTH, M.J.; BEESLEY, A.H.; HOFFMANN, K.; TERRY, P.A.; FREITAS, J.R.; BOAG, J.M.; CUMMINGS, A.J.; KEES, U.R. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics*, v.6, p.59, 2005.

- DE OLIVEIRA-LONGATTI, S.M.; MARTINS DE SOUSA, P.; MARCIANO MARRA, L.; AVELAR FERREIRA, P.A.; DE SOUZA MOREIRA, F.M. *Burkholderia fungorum* promotes common bean growth in a dystrophic oxisol. *Annals of Microbiology*, v.65, p.1825-1832, 2015.
- DE OLIVEIRA CUNHA, C.; GODA ZULETA, L.F.; PAULA DE ALMEIDA, L.G.; PRIOLI CIAPINA, L.; LISTRINO BORGES, W.; PITARD, R.M.; BALDANI, J.I.; STRALIOTTO, R.; DE FARIA, S.M.; HUNGRIA, M.; SOUSA CAVADA, B.; MERCANTE, F.M.; RIBEIRO DE VASCONCELOS, A.T. Complete genome sequence of *Burkholderia phenoliruptrix* BR3459a (CLA1), a heat-tolerant, nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa flocculosa*. *Journal of Bacteriology*, v.194, p.6675-6676, 2012.
- DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, v.50, p.227-230, 2010.
- DHEDA, K.; HUGGETT, J.; BUSTIN, S. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, v.37, 2004.
- DHEDA, K.; HUGGETT, J.F.; CHANG, J.S.; KIM, L.U.; BUSTIN, S.A.; JOHNSON, M.A.; ROOK, G.A.W.; ZUMLA, A. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry*, v.344, p.141-143, 2005.
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, v.13, p.1-13, 1992.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). *Plant Physiology*, v.105, p.1139-1147, 1994.
- ELLIOTT, G.N.; CHEN, W.-M.; CHOU, J.-H.; WANG, H.-C.; SHEU, S.-Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN, L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J.M.; BESSI, R.; DE FARIA, S.M.; TRINICK, M.J.; PRESCOTT, A.R.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *The New phytologist*, v.173, p.168-80, 2007.
- ERBS, G.; NEWMAN, M.-A. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.421-425, 2003.
- FU, X.; LIANG, W.; DU, P.; YAN, M.; KAN, B. Transcript changes in *Vibrio cholerae* in response to salt stress. *Gut Pathogens*, v.6, p.47, 2014.
- GALISA, P.S.; DA SILVA, H.A.P.; MACEDO, A.V.M.; REIS, V.M.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L. Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. *Journal of Microbiological Methods*, v.91, p.1-7, 2012.
- GILLIS, M.; VAN, T.V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.274-289, 1995.
- GLARE, E.; DIVJAK, M.; BAILEY, M.; WALTERS, E.  $\beta$ -Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, v.57, p.765-770, 2002.
- GLICK, B. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, v.2012, p.1-15, 2012.
- GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN, J.F.; TIEDJE, J.M.; VANDAMME, P. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.1677-1681, 2004.

- GUÉNIN, S.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; VAN WUYTSWINKEL, O.; BELLINI, C.; GUTIERREZ, L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany*, v.60, p.487-493, 2009.
- GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUÉNIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J.-F.; LOUVET, R.; RUSTERUCCI, C.; MORITZ, T.; GUERINEAU, F.; BELLINI, C.; VAN WUYTSWINKEL, O. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal*, v.6, p.609-18, 2008.
- HASLAM, R.P.; DOWNIE, A.L.; RAVETON, M.; GALLARDO, K.; JOB, D.; PALLETT, K.E.; JOHN, P.; PARRY, M.A.J.; COLEMAN, J.O.D. The assessment of enriched apoplastic extracts using proteomic approaches. *Annals of Applied Biology*, v.143, p.81-91, 2003. LPNS, 2016. Acessado em: 05/01/2016. Disponível em:<<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>>
- HATCH, M.D.; GLASZIOU, K.T. Sugar accumulation cycle in sugar cane. II. Relationship of invertase activity to sugar content & growth rate in storage tissue of plants grown in controlled environments. *Plant Physiology*, v.38, p.344-348, 1963.
- HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, v.8, p.R19, 2007.
- HOMMAIS, F.; ZGHIDI-ABOUZID, O.; OGER-DESFEUX, C.; PINEAU-CHAPELLE, E.; VAN GIJSEGEM, F.; NASSER, W.; REVERCHON, S. *lpxC* and *yafS* are the most suitable internal controls to normalize real time RT-qPCR expression in the phytopathogenic bacteria *Dickeya dadantii*. *PloS one*, v.6, p.e20269, 2011.
- HUANG, W.M. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annual Review of Genetics*, p.79-107, 1996.
- IGLESIAS, A.; PREISS, J. Bacterial glycogen and plant starch biosynthesis. *Biochemical Education*, v.20, p.196-203, 1992.
- JACOB, T.R.; LAIA, M.L.; FERRO, J.A.; FERRO, M.I.T. Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*. *Biotechnology Letters*, v.33, p.1177-1184, 2011.
- JOO, M.Y.; SHIN, J.H.; JANG, H.-C.; SONG, E.S.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Expression of SAP5 and SAP9 in *Candida albicans* biofilms: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Medical Mycology*, v.51, p.892-896, 2013.
- KANDROR, O.; BRETSCHNEIDER, N.; KREYDIN, E.; CAVALIERI, D.; GOLDBERG, A.L. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2 4-Dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Molecular Cell*, v.13, p.771-781, 2004.
- KANDROR, O.; DELEON, A.; GOLDBERG, A.L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.99, p.9727-9732, 2002.
- KRIEGOVA, E.; ARAKELYAN, A.; FILLEROVA, R.; ZATLOUKAL, J.; MRAZEK, F.; NAVRATILOVA, Z.; KOLEK, V.; DU BOIS, R.M.; PETREK, M. PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. *BMC Molecular Biology*, v.9, p.69, 2008.
- LINSTER, C.L.; VAN SCHAFTINGEN, E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS Journal*, v.274, p.1-22, 2007.

- LIU, X.Y.; WU, W.; WANG, E.T.; ZHANG, B.; MACDERMOTT, J.; CHEN, W.X. Phylogenetic relationships and diversity of  $\beta$ -rhizobia associated with Mimosa species grown in Sishuangbanna, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.61, p.334-342, 2011.
- LPNS, 2016. Acessado em: 26/01/2016. Disponível em:<<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>>
- MA, Y.-J.; SUN, X.-H.; XU, X.-Y.; ZHAO, Y.; PAN, Y.-J.; HWANG, C.-A.; WU, V.C.H. Investigation of reference genes in *Vibrio parahaemolyticus* for gene expression analysis using quantitative RT-PCR. *PloS one*, v.10, p.e0144362, 2015.
- MARROQUÍ, S.; ZORREGUIETA, A.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F.; SOBERÓN, M.; MEGÍAS, M.; DOWNIE, A. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants. *Journal of Bacteriology*, v.183, p.854-864, 2001.
- MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; SALAZAR-SALAZAR, C.; MÉNDEZ, R.D.; CABALLERO-MELLADO, J.; HIRSCH, A.M.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M.S.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.104, p.1063-1071, 2013.
- MATTOS, K.A.; PÁDUA, V.L.M.; ROMEIRO, A.; HALLACK, L.F.; NEVES, B.C.; ULISSES, T.M.U.; BARROS, C.F.; TODESCHINI, A.R.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.80, p.477-493, 2008.
- MASSUNG, R.F.; HIRATZKA, S.L.; BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H.; LEE, K.N. Succinate dehydrogenase gene arrangement and expression in *Anaplasma phagocytophilum*. *Gene*, v.414, p.41-48, 2008.
- MCMILLAN, M.; PEREG, L. Evaluation of reference genes for gene expression analysis using quantitative RT-PCR in *Azospirillum brasilense*. *PloS One*, v.9, p.e98162, 2014.
- METCALF, D.; SHARIF, S.; WEESE, J.S. Evaluation of candidate reference genes in *Clostridium difficile* for gene expression normalization. *Anaerobe*, v.16, p.439-443, 2010.
- MISHINA, T.E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, v.50, p.500-513, 2007.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 5ª Edição, São Paulo: Sarvier. p.1273, 2011.
- NEWMAN, M.-A.; ROEPENACK-LAHAYE, E.V.; PARR, A.; DANIELS, M.J.; DOW, J.M. Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal*, v.29, p.487-495, 2002.
- ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; CHUEIRE, L.M.O.; TIEDJE, J.M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Genome sequences of *Burkholderia* sp. strains CCGE1002 and H160, isolated from legume nodules in Mexico and Brazil. *Journal of Bacteriology*, v.194, p.6927, 2012.
- PAUL, M.J.; PRIMAVESI, L.F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, v.59, p.417-441, 2008.
- PECHANOVA, O.; HSU, C.-Y.; ADAMS, J.P.; PECHAN, T.; VANDERVELDE, L.; DRNEVICH, J.; JAWDY, S.; ADELI, A.; SUTTLE, J.C.; LAWRENCE, A.M.; TSCHAPLINSKI, T.J.; SÉGUIN, A.; YUCEER, C. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. *BMC genomics*, v.11, p.674, 2010.
- PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J.I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a

diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.56, p.1931-1937, 2006.

PETROCELLI, S.; TONDO, M.L.; DAURELIO, L.D.; ORELLANO, E.G. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. *PloS one*, v.7, p.e40051, 2012.

PURVIS, J.E.; YOMANO, L.P.; INGRAM, L.O. Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, p.3761-3769, 2005.

REINA-BUENO, M.; ARGANDOÑA, M.; SALVADOR, M.; RODRÍGUEZ-MOYA, J.; IGLESIAS-GUERRA, F.; CSONKA, L.N.; NIETO, J.J.; VARGAS, C. Role of trehalose in salinity and temperature tolerance in the model halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *PloS one*, v.7, p.e33587, 2012.

REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v.54, p.2155-62, 2004.

REITER, L.; KOLSTØ, A.-B.; PIEHLER, A.P. Reference genes for quantitative, reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. *Journal of Microbiological Methods*, v.86, p.210-217, 2011.

RICHERT, K.; BRAMBILLA, E.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16SrRNA genes. *Systematic and Applied Microbiology*, v.30, p.102-108, 2007.

ROCHA, D.J.P.; SANTOS, C.S.; PACHECO, L.G.C. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 108, p. 685-693, 2015.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols*, v.132, p.365-386, 1999.

SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*, v.149, p.167-192, 2001.

SHEIBANI-TEZERJI, R.; RATTEI, T.; SESSITSCH, A.; TROGNITZ, F. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *mBio*, v.6, p.1-11, 2015.

SHEU, S.-Y.; CHOU, J.-H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; GROSS, E.; DOS REIS JUNIOR, F.B.; MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.-M. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, v.63, p.435-441, 2013.

SHEU, S.-Y.; CHOU, J.-H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; GROSS, E.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.-M. *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.62, p.2272-2278, 2012.

SHIMAKATA, T.; MINATOGAWA, Y. Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.380, p.331-8, 2000.

SIHTO, H.-M.; TASARA, T.; STEPHAN, R.; JOHLER, S. Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in *Staphylococcus aureus* exposed to osmotic and

lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation. FEMS Microbiology Letters, v.356, p.134-140, 2014.

SUN, M.; LU, M.-X.; TANG, X.-T.; DU, Y.-Z. Exploring valid reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). PloS One, v.10, p.e0115979, 2015.

TAKLE, G.W.; TOTH, I.K.; BRURBERG, M.B. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. BMC Plant Biology, v.7, p.50, 2007.

TALBI, C.; DELGADO, M.J.; GIRARD, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; BEDMAR, E.J. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. Applied and Environmental Microbiology, v.76, p.4587-4591, 2010.

TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: some implications in the association with endophytes. Journal of Plant Physiology, v.163, p.80-85, 2006.

TONG, Z.; GAO, Z.; WANG, F.; ZHOU, J.; ZHANG, Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. BMC Molecular Biology, v.10, p.71, 2009.

TZVETKOV, M.; KLOPPROGGE, C.; ZELDER, O.; LIEBL, W. Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition. Microbiology, v.149, p.1659-1673, 2003.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Systematic and Applied Microbiology, v.512, p.507-512, 2002.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.D.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.D.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, v.3, p.1-12, 2002.

VICENTE, C.; MATEOS, J.; PEDROSA, M.; LEGAZ, M. High-performance liquid chromatographic determination of sugars and polyols in extracts of lichens and sugarcane juice. Journal of Chromatography, v.553, p.271-283, 1991.

WHITTINGTON, D.; RUSCHE, K.; SHIN, H.; FIERKE, C.; CHRISTIANSON, D. Crystal structure of *lpxC*, a zinc-dependent deacetylase essential for endotoxin biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.100, p.8146-8150, 2003.

WILSON, W.A.; ROACH, P.J.; MONTERO, M.; BAROJA-FERNÁNDEZ, E.; MUÑOZ, F.J.; EYDALLIN, G.; VIALE, A.M.; POZUETA-ROMERO, J. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. FEMS Microbiology Reviews, v.34, p.952-985, 2010.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia*. Microbiology and Immunology, v.36, p.1251-1275, 1991.

ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. International Journal of Systematic and Evolutionary, v.50, p.743-749, 2000.

ZHAO, S.; FERNALD, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. Journal of Computational Biology, v.12, p.1047-1064, 2005.

ZHOU, K.; ZHOU, L.; LIM, Q.E.; ZOU, R.; STEPHANOPOULOS, G.; TOO, H.-P. Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. BMC Molecular Biology, v.12, p.18, 2011.





## 5. CAPÍTULO II

**Perfil transcricional de *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 em resposta ao fluido do apoplasto de cana-de-açúcar da variedade RB867515**

## 5.1. RESUMO

Bactérias diazotróficas podem colonizar tanto a rizosfera como o interior dos tecidos das plantas principalmente através do apoplasto que é um local extremamente dinâmico, que vai da raiz até as folhas, compreendendo também os vasos xilemáticos. O fluido do apoplasto de cana-de-açúcar contém diferentes açúcares e ácidos orgânicos que podem suprir total ou parcialmente a demanda por carboidratos pela bactéria. Além disso, também pode conter aminoácidos e íons orgânicos. Algumas bactérias diazotróficas tais como *B. kururiensis* e *G. diazotrophicus* já foram encontradas no apoplasto de plantas de arroz e cana-de-açúcar, respectivamente. *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 é uma importante bactéria diazotrófica que está incluída em um gênero bastante versátil quanto a hospedeiros e nichos. Contudo, pouco se conhece da interação desta estirpe bacteriana com plantas da família das *Poaceae* principalmente a cana-de-açúcar. A transcriptômica é uma importante ferramenta que possibilita o estudo de diferentes conjuntos gênicos que são expressos em um determinado ambiente em comparação a outro e pode gerar relevantes informações como por exemplo da interação planta-bactéria. Portanto o trabalho deste capítulo teve como objetivo conhecer mais detalhadamente a interação e a influência do fluido do apoplasto de cana-de-açúcar sobre a expressão de genes pela *B. tropica* estirpe Ppe8. Neste sentido, foi realizado um experimento comparando-se o crescimento da bactéria em três condições distintas: meio JMV completo (MM), meio JMV diluído com 50% de água destilada estéril (MA) e meio JMV com 50% de fluido do apoplasto (MLA) - extraído de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515. O RNA total foi extraído, o rRNA foi removido, o mRNA enriquecido e bibliotecas de cDNA construídas para sequenciamento em sequenciador Ion Torrent em parceria com a UFPR. Os dados do sequenciamento foram analisados e processados com o programa CLC. Os resultados da análise dos dados mostraram que 503 genes foram reprimidos e 157 genes foram induzidos na presença do fluido do apoplasto (MLA) em comparação ao meio completo (MM), enquanto que 703 e 387 genes foram reprimidos e induzidos, respectivamente na presença do apoplasto em comparação ao meio diluído (MA). Esses genes diferencialmente expressos pertencem a diferentes classes de acordo com suas funções. O interessante a observar foi que genes relacionados à quimiotaxia e ao movimento foram reprimidos na presença do fluido do apoplasto indicando que a bactéria não precisa de um movimento ativo em função de um gradiente de nutrientes no apoplasto. Outro ponto importante a destacar foi a repressão de genes que poderiam induzir respostas de defesa na planta, indicando que a estirpe Ppe8 reconhece o fluido do apoplasto. Dentre esses genes, destacamos os envolvidos na biossíntese de lipopolissacarídeos (LPS), exopolissacarídeos (EPS) e peptídeoglicano. Foi verificada também expressão diferencial de genes envolvidos com o metabolismo de carboidratos, aminoácidos, íons orgânicos, lipídeos e produção e conversão de energia dentre outras classes, indicando que o metabolismo da estirpe Ppe8 é mais ativo quando na presença do fluido do apoplasto. Sete genes (*bceE*, *fliP1*, *icmF1*, *nifE*, *paaF*, *secD* e *tsf*) foram selecionados aleatoriamente para a validação dos dados de RNA-seq através da RT-qPCR, sendo os genes *lpxC* e *recA*, previamente testados, usados como genes de referência. Os resultados de RT-qPCR confirmaram a robustez das análises dos dados de RNA-seq. Conclui-se, portanto, que *B. tropica* estirpe Ppe8 tem a capacidade de modular a expressão de genes em função da presença do fluido do apoplasto principalmente para suprir o seu metabolismo e não induzir os mecanismos de defesa da planta. Este é um estudo pioneiro do entendimento

molecular da expressão de genes da bactéria diazotrófica endofítica *B. tropica* estirpe Ppe8, em contato com o líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Transcriptômica, genômica funcional, expressão gênica, bactéria diazotrófica.

## 5.2. ABSTRACT

Diazotrophic bacteria colonize both the rhizosphere and internal tissues of the plants mainly through the apoplast that is an extremely dynamic place, ranging from root to leaves, and comprising the xylem vessels. The fluid of sugarcane apoplast contain different sugars and organic acids that may fully or partially meet the demand for carbohydrate by the bacteria. Furthermore, it may also contain amino acids and organic ions. Some nitrogen-fixing bacteria such as *B. kururiensis* and *G. diazotrophicus* have been found in the apoplast of rice plants and sugarcane, respectively. *Burkholderia tropica* Ppe8 strain is an important diazotrophic that is included in a versatile genus in relation to hosts and niches. However, little is known about the interaction of this bacterial strain with family Poaceae plants mainly sugarcane. The transcriptome is an important tool that allows the study of different gene pools expressed in a given environment in comparison to others and can generate relevant information such as the plant-bacteria interaction. Therefore, this chapter aimed to know in more details the interaction and influence of apoplast fluid of sugarcane on the differential expression of genes by *B. tropica* Ppe8 strain. In this sense, an experiment was conducted comparing the growth of bacteria in three different conditions: complete JMV (MM), JMV diluted with 50% of sterile distilled water (MA) and a JMV with 50% apoplast fluid (MLA) - extracted from plants of sugarcane variety RB867515. Total RNA was extracted, the rRNAs were removed, enriched mRNAs and cDNA libraries was made and sequenced with Ion Torrent sequencer in collaboration with UFPR. The results of sequencing were analysed with the CLC program. The data analysis showed that 503 genes were repressed and 157 genes were induced in the presence of apoplast fluid (MLA) as compared to the complete medium (MM) while 703 and 387 genes were repressed and induced, respectively in the apoplast presence as compared to the diluted medium (MA). These differentially expressed genes belonging to different classes in the genome of the bacterium. It was interesting to note that genes related to chemotaxis and movement were repressed in the presence of apoplast, indicating that the bacteria do not need an active movement due to a nutrient gradient in the apoplast. Another important point to emphasize is the repression of genes that could induce defense responses in the plant, indicating that the strain Ppe8 recognizes the fluid apoplast. Among these genes, we highlight those involved in lipopolysaccharide biosynthesis (LPS), exopolysaccharides (EPS) and peptidoglycan. They were also checked for differential expression of genes involved in the metabolism of carbohydrates, amino acids, organic ions, lipids and energy production and conversion among other classes, indicating that metabolism of strain Ppe8 is active in the presence of apoplast fluid. Seven genes (*bceE*, *fliP1*, *icmF1*, *nifE*, *paaF*, *secD* e *tsf*) were randomly selected for validation of RNA-seq data by RT-qPCR, and the *lpxC* and *recA* genes, previously tested, were used as reference genes. The results of RT-qPCR analysis confirmed the robustness of the RNA-seq data. These results suggest that *B. tropica* strain Ppe8 alters the expression of genes in the presence of the apoplast liquid mainly to make use of compounds present in the apoplast fluid as well as to avoid the induction of the defense mechanisms of the plant. This is a pioneering study allowing to understand the molecular expression of genes in the strain Ppe8 growing in presence of carbon compounds present in sugarcane plants.

**KEY-WORDS:** Transcriptome, functional genomic, genic expression, diazotrophic bacteria.

### 5.3. INTRODUÇÃO

O apoplasto representa um compartimento altamente dinâmico que serve como um contínuo que vai da raiz, passando pelo caule e chegando até as folhas, sendo bastante importante no que tange à percepção e transdução de sinais do ambiente para o simplasto (PECHANOVA *et al.*, 2010). Acredita-se que bactérias diazotróficas preferam o apoplasto das plantas, pois o simplasto apresenta uma barreira a íons, açúcares e outros solutos principalmente pela permeabilidade da membrana (STEUDLE & FRESCH 1996).

Endófitos no apoplasto podem auxiliar no crescimento das plantas principalmente pelo aumento da resistência a fatores bióticos ou abióticos, e por contribuir diretamente com a nutrição mineral da planta (SATTELMACHER, 2001). DONG *et al.* (1994) verificaram a presença de uma bactéria diazotrófica, *G. diazotrophicus*, habitando o líquido apoplástico de plantas de cana-de-açúcar e, mais tarde, em 1999, Fuentes Ramirez e colaboradores confirmaram a presença desta bactéria no interior do xilema e apoplasto de cana-de-açúcar. DONG *et al.* (1997) e MCCULLY (2001) também verificaram que o apoplasto é o nicho mais adequado para as bactérias endofíticas. Além de redução de competição, o apoplasto contém vários compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos.

O líquido do apoplasto de plantas de cana-de-açúcar pode conter açúcares, aminoácidos, proteínas, amônio, nitrato e nitrito que são variáveis de acordo com a variedade e tipo de manejo da planta (ASSIS JÚNIOR *et al.*, 2004; TEJERA *et al.*, 2006). Dentre os ácidos orgânicos são encontrados o aconitato, o malato e o citrato e com relação aos açúcares, pode-se observar a presença de sacarose, glicose e frutose. ASSIS JÚNIOR *et al.* (2004) detectaram o aconitato e a sacarose em predominância aos demais ácidos orgânicos e açúcares presentes em diferentes cultivares e, também, em diferentes fases de desenvolvimento (idade). Provavelmente esses ácidos orgânicos e fontes de açúcares sejam essenciais para bactérias endofíticas diazotróficas em troca do nitrogênio fixado como fonte de energia em qualquer porção do caule e em qualquer idade da planta.

O gênero *Burkholderia* compreende um grupo de bactérias bastante versátil quanto às características e nichos ocupados, como rizosfera de plantas, nódulos de leguminosas, solos e espaços internos das plantas não leguminosas onde colonizam endofiticamente. Como já enfatizado, este gênero tem 96 espécies descritas com 20 capazes de fixar nitrogênio atmosférico sendo que parte delas podem colonizar a rizosfera e/ou ambiente endofítico de uma ampla gama de hospedeiros, tais como: milho, sorgo, cana-de-açúcar, abacaxi e café enquanto que outras realizam a nodulação em algumas plantas da família das leguminosas (GILLIS *et al.*, 1995; ACHOUAK *et al.*, 1999; COENYE *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2000; COENYE *et al.*, 2001; VANDAMME *et al.*, 2002; CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004; GORIS *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006; PERIN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; ELLIOTT *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2008; AIZAWA *et al.*, 2010; AIZAWA *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA CUNHA *et al.*, 2012; SHEU *et al.*, 2012; MARTÍNEZ-AGUILAR *et al.*, 2013; SHEU *et al.*, 2013). Bactérias deste gênero também podem promover o crescimento de plantas e apresentar atividade antagônica a *Fusarium verticillioides*, *Xanthomonas albilineans*, *Rhizoctonia solani* e *Verticillium dahliae* (LUVIZOTTO *et al.*, 2010; GASSER *et al.*, 2011).

*Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 foi isolada de colmos de cana-de-açúcar no Brasil e compõe atualmente o inoculante desenvolvido pela Embrapa para *Poaceae*, juntamente com outras quatro bactérias (REIS *et al.*, 2004). Esta estirpe cresce bem numa faixa de pH que varia de 4,5-6,5, de uma forma mais lenta numa faixa de pH de 7,0-7,5 sendo que tem uma faixa ótima de crescimento em torno de 5,0-5,8. Portanto, o experimento de DONG e colaboradores (1994), o qual relata que o pH do fluido está em torno de 5,5, indica que provavelmente este seja o nicho ideal de *B. tropica* se for considerado apenas o fator pH. REIS *et al.* (2004) também verificaram que *B. tropica* pode utilizar diversas fontes de carbono como fonte de energia como, por exemplo, açúcares e ácidos orgânicos. *Burkholderia tropica* já foi encontrada colonizando endofiticamente plantas de tomate e possui potencial em aumentar o rendimento de frutos e também já foi verificado que *B. tropica* possui grande potencial em biocontrole tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TENORIO-SALGADO *et al.*, 2013; BERNABEU *et al.*, 2015). Durante interações benéficas entre planta e bactéria, pode haver a promoção de crescimento e um maior desenvolvimento da planta por efeitos diretos como a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de sideróforos e também por efeitos indiretos como controle biológico. Porém, ainda não se conhece o diálogo molecular de *B. tropica* estirpe Ppe8 e plantas de cana-de-açúcar, contudo, já existem informações indicando como espécies deste gênero são capazes de reconhecer a planta e responder através da indução ou repressão de genes (KIM *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014; SHEIBANI-TEZERJI *et al.*, 2015).

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi investigar o papel do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar no padrão de expressão gênica de *B. tropica* estirpe Ppe8 para identificar genes bacterianos regulados pelos componentes do fluido do apoplasto durante a interação.

## 5.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.3. Coleta do líquido do apoplasto

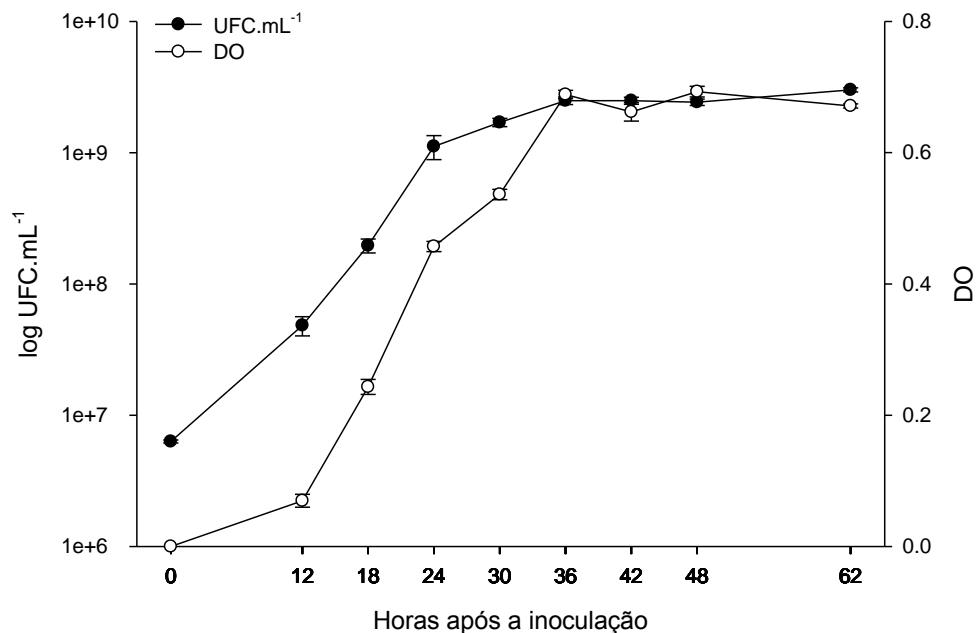
O líquido do apoplasto foi coletado de plantas de cana da variedade RB 867515 com 10 meses de idade, cultivadas em um Argissolo, no campo experimental da Embrapa Agrobiologia localizado no município de Seropédica (latitude -22°44'49.33'' e longitude -43°40'15.75'') conforme metodologia proposta por DONG *et al.* (1994). Os colmos foram coletados no campo com o auxílio de um facão e os mesmos foram transportados para laboratório. Os colmos foram lavados com água e sabão e realizou-se uma esterilização com álcool 70% seguida de flambagem. Posteriormente foram descascados com o auxílio de um facão previamente esterilizado e cortados em comprimentos proporcionais ao tubo falcon, seguida de uma flambagem para evaporação do líquido do simplasto. Uma ponteira de 300 µl foi inserida na extremidade basal para se evitar o contato do líquido com o colmo após a centrifugação. Os tubos foram mantidos em gelo para reduzir a oxidação do material até o momento da centrifugação. Os tubos foram balanceados e centrifugados a 3000 xg por 20 minutos a 4°C. O líquido do apoplasto foi filtrado em membranas Millipore (0,22 µm) e depois foi transferido para tubo falcon estéril e armazenado em freezer -70°C.

### 5.4.4. Cultivo bacteriano

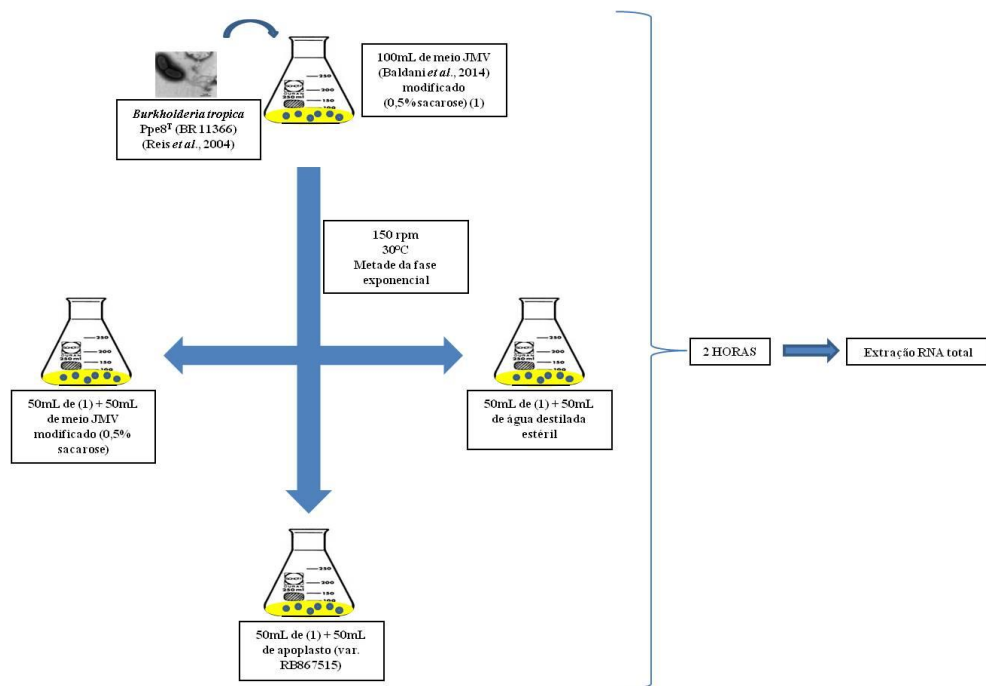
*Burkholderia tropica* estirpe Ppe8, foi crescida em erlenmeyers com capacidade para 250 ml contendo 100 ml de meio JMV a 30°C e 150 rpm (Anexos 1, 2 e 3) (BALDANI *et al.*, 2014). O meio JMV foi modificado pela substituição do manitol pela sacarose como fonte de carbono e na mesma proporção (0,5%) e 10 mM de glutamato de sódio como fonte de N. Anteriormente foi realizada uma curva de crescimento da *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada no meio JMV suplementado com sacarose (0,5%) (Figura 9). A bactéria foi cultivada em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio DYGS por 24 h, seguido da coleta de 1 ml e centrifugação a 2370 xg por 5 min a 4°C com o objetivo de sedimentar as células bacterianas. As células foram ressuspensas em 1 ml de solução salina para diluição e, posteriormente, submetidas a contagem do número de células através de câmara de Neubauer. Em seguida, foi inoculada uma alíquota da suspensão inicial em frascos de vidro contendo 100 ml de meio JMV suplementado com 0,5% de sacarose e pH ajustado para 5,5 obtendo-se uma concentração de  $10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup> ou seja,  $10^6$  unidade formadora de colônia (UFC) por ml, com três repetições biológicas. Os frascos foram mantidos em agitador com rotação de 150 rpm e temperatura de 30°C. Foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-6}$ . A metodologia utilizada foi à técnica de microgota proposta por ROMEIRO (2001). Uma gota de 10 µl da suspensão de cada diluição, com três repetições técnicas, foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura JMV sólido com os respectivos pH e 0,5% de sacarose as 0, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 62 horas após a inoculação (hai) e foi realizada a contagem das colônias com o auxílio de um microscópio estereoscópio modelo boe3500 (Boeco Germany®). Foi coletado 1 ml em triplicata de cada repetição biológica para verificar a absorbância a 595 nm. Quando as células atingiram a metade da fase exponencial (20 horas após a inoculação) (Figura 9), os cultivos foram homogeneizados e divididos em volumes de 50 ml para posteriormente serem adicionados os tratamentos que constituíram de: a) um volume de 50 ml de JMV modificado



(MM); b) um volume de 50 ml de água destilada estéril (MA) e, c) um volume de 50 ml de líquido do apoplasto de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (MLA) com três réplicas biológicas para cada tratamento. Após duas horas, 5 ml da suspensão celular foram coletadas para extração do RNA (Figura 10).



**Figura 9.** Curva de crescimento da *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 cultivada em meio JMV suplementado com sacarose e pH 5,5. Os dados representam a média de três repetições em cada intervalo. Barras representam o desvio padrão da média.

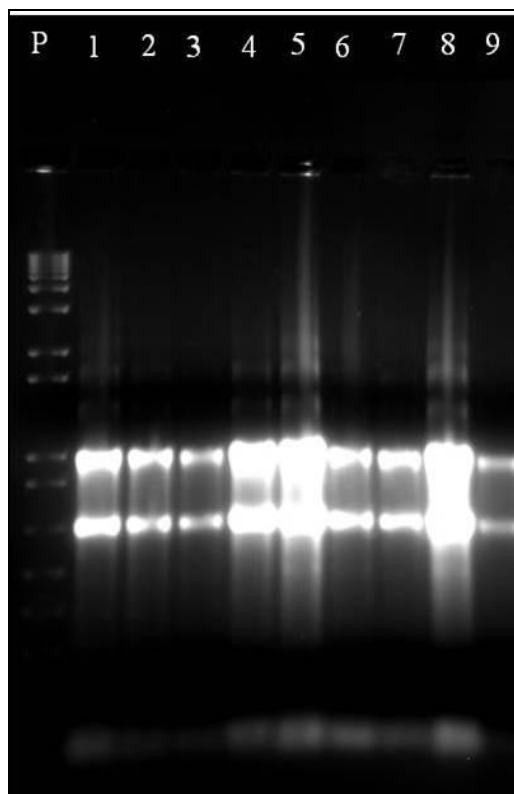


**Figura 10.** Metodologia do cultivo de Ppe8. O experimento foi conduzido em triplicata biológica.

#### 5.4.5. Análises do perfil transcriptômico

Um volume de 5 mL de cultura coletada para extração de RNA foi centrifugado a 9000  $\times g$  por 10 minutos a 4°C. Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas a extração de RNA. A extração de RNA total foi realizada através da adição de 1 ml do reagente TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies, Cat. No. 15596) (previamente aquecido a 60°C), seguido de agitação vigorosa em *Vórtex* por 30 segundos e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu$ l de clorofórmio, e as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 12.000  $\times g$  por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida cuidadosamente com auxílio de micropipeta para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado e a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12.000  $\times g$  por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em 1 ml de etanol 70% (v/v) e, posteriormente, centrifugado a 12.000  $\times g$  por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em 25  $\mu$ l de água ultra-pura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) (água ultra pura livre de RNases). O RNA total foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) em uma cuba de eletroforese com tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0) para análise da sua integridade (Figura 11) e posteriormente quantificado por meio do protocolo Qubit<sup>™</sup> Quantitation Platform, que se compõe do aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen) e dos reagentes do kit Quant-it (Invitrogen). A quantificação foi realizada a partir do preparo da solução de trabalho (*Working solution*) onde foram adicionados 199  $\mu$ l de tampão a 1  $\mu$ l de solução de fluoróforo. Para calibração do aparelho foram preparadas duas amostras padrão com 190  $\mu$ l de solução de trabalho e 10  $\mu$ l dos padrões: Padrão 1 (*Standard 1*) e Padrão 2 (*Standard 2*). De cada amostra de RNA, foi utilizado 1  $\mu$ l, ao qual foram adicionados 199  $\mu$ l de solução de trabalho. Todos os tubos foram homogeneizados em *Vórtex*

e incubados à temperatura ambiente (25°C) por 2 minutos. As amostras foram então lidas no Qubit fluorômetro. Uma alíquota de 10 µg dos RNAs extraídos foi tratada com 2 µl de enzima DNase (*RNase-Free DNase I* – Epicentre® Cat. No. D9910K) e incubada a 37°C por 40 minutos e posteriormente, para inativar a enzima, 65°C por 5 minutos.



**Figura 11.** RNA total extraído de *B. tropica* Ppe8 cultivado nos diferentes meios P-Marcador 1kb plus. Triplicatas biológicas: 1, 2 e 3 - Tratamento JM+JM; 4,5 e 6 - Tratamento JM+água; 7, 8 e 9 - tratamento JM+líquido do apoplasto.

#### 5.4.6. Depleção do rRNA

##### 5.4.6.1. Anelamento do RNA e captura da mistura de oligonucleotídeos

Foram pipetados 200 µl de tampão de ligação (*Binding Buffer*) em tubo de 1,5 mL de volume. A este tubo, foram adicionados 7 µl (7 µg) de RNA total e posteriormente foi agitado. Foram adicionados 4 µl de uma mistura de captura de oligonucleotídeos (*Capture Oligo Mix*) seguido de agitação. A mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos para desnaturar a estrutura secundária do rRNA 16S e 23S. Este aquecimento facilita a máxima hibridização do rRNAs aos oligonucleotídeos capturados. Após esse período o material foi incubado em banho-maria a temperatura de 37°C por 15 minutos. É importante que esta etapa se realize no mesmo equipamento para que o material permaneça no equipamento conforme a temperatura reduz gradativamente, pois isto aumenta a eficiência da depleção.

#### **5.4.6.2. Preparo dos *Oligo Mag Beads***

Para cada amostra de RNA foi utilizado 50 µl de suspensão de esferas magnéticas contendo oligonucleotídeos (*Oligo Mag Beads*). O volume a ser usado para todas as amostras foi calculado e os *Oligo Mag Beads* foram colocados em tubo de 1,5 mL. O tubo contendo os *Oligo Mag Beads* foi colocado em estante magnética e após 3 minutos o sobrenadante foi removido com cuidado. Água livre de nuclease foi adicionada em igual volume no tubo e os *Oligo Mag Beads* foram resuspendidos. Novamente o tubo foi colocado na estante magnética e após 3 minutos o sobrenadante foi novamente removido. Tampão de ligação foi adicionado em igual volume no tubo e os *Oligo Mag Beads* foram novamente resuspendidos. O tubo foi colocado na estante novamente e após 3 minutos o sobrenadante foi removido. Foi adicionado novamente tampão de ligação, o material foi homogeneizado e mantido a 37°C.

#### **5.4.6.3. Captura do rRNA e recuperação do mRNA enriquecido**

Foram adicionados 50 µl da suspensão de *Oligo Mag Beads* em cada amostra e o material foi homogeneizado. Posteriormente o material foi incubado a 37°C por 15 minutos (neste passo a sequência de oligonucleotídeos no *Oligo Mag Beads* se anela à mistura de captura de oligonucleotídeos, e o mesmo permanece hibridizado ao rRNA 16S e 23S). As amostras foram então colocadas nas estantes magnéticas e o sobrenadante contendo o mRNA enriquecido foi transferido para novos tubos de 1,5 mL. Nesta etapa foi recuperado um total de 255 µl.

#### **5.4.6.4. Precipitação e ressuspensão do mRNA enriquecido**

Foram adicionados 10% do volume de solução de acetato de sódio 3M, 1/50 volume de glicogênio a 5 mg.ml<sup>-1</sup> e 3 volumes de etanol 100% gelado e, posteriormente, homogeneizado. O material foi incubado a -20°C por 2 horas e 30 minutos e a seguir, o material foi centrifugado a 10.000 xg por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. O material foi então lavado por duas vezes como segue: Foram adicionados 750 µl de solução de etanol 70% (v/v) gelado e o material foi centrifugado a 10.000 xg por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. A seguir, o excesso de etanol foi aspirado e o material foi seco a vácuo por 10 minutos. O sedimento correspondente de RNA mensageiro foi redissolvido em 12 µl de água livre de nuclease e reidratado por 15 minutos a temperatura ambiente. O material foi homogeneizado e os tubos foram colocados nas estantes magnéticas para remoção dos *Oligo Mag Beads* restantes por 3 min. O sobrenadante foi colocado em novos tubos de 1,5mL e o mRNA foi analisado no Agilent® 2100 Bioanalyser (Agilent) para verificação da eficiência da remoção do rRNA e enriquecimento do mRNA.

### **5.4.7. Preparo de cDNA**

#### **5.4.7.1. Fragmentação do mRNA**

Para a fragmentação do mRNA foi empregado o protocolo conforme o manual do Ion Total RNA-Seq Kit v2 como descrito a seguir. A 10 µl de solução contendo o mRNA foi adicionado 1 µl de tampão de reação RNase III 10 X concentrado (*10X RNase III Reaction Buffer*) e 1 µl de solução de RNase III em tubos de PCR com capacidade de 0,2 ml. O material foi misturado bem com auxílio de micropipeta por 5 vezes. A reação foi incubada em termociclador a 37°C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionadas à reação 20 µl de água livre de nuclease e a reação foi incubada no gelo.

#### **5.4.7.2. Preparo dos beads para purificação do mRNA**

As esferas magnéticas que se ligam aos ácidos nucleicos (*Nucleic Acid Binding Beads*) foram gentilmente homogeneizadas para completa ressuspensão. Foram adicionados 5 µl de suspensão de esferas magnéticas e 90 µl de solução concentrada de ligação (*Binding Solution Concentrate*) misturada-se através de pipetagem por 10 vezes. Aos tubos contendo as esferas magnéticas foram adicionados 30 µl de solução de mRNA fragmentado e a mistura foi colocada na estante magnética. Foram adicionadas à reação 150 µl de etanol 100% (a ponteira foi previamente umedecida com etanol 100% por 3 vezes). A mistura foi homogeneizada com pipeta por 10 vezes. As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente nas estantes magnéticas. O sobrenadante foi removido e descartado. Posteriormente foram adicionados 150 µl de solução de lavagem concentrada (*Wash Solution Concentrate*) com etanol para cada amostra. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 segundos e mantidas nas estantes magnéticas. O sobrenadante foi removido e descartado e as esferas magnéticas foram secas ao ar para remoção de qualquer traço de etanol remanescente. Os tubos contendo as esferas magnéticas foram removidos das estantes e foram adicionados 12 µl de água livre de nuclease pré-aquecida (37°C) em cada amostra e a mistura foi homogeneizada por pipetagem de 10 vezes. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto. Os tubos foram novamente colocados nas estantes magnéticas e após a solução ficar clara (5 minutos aproximadamente) o sobrenadante foi coletado.

#### **5.4.7.3. Construção da biblioteca de cDNA**

A mistura para a hibridização foi preparada no gelo. Essa mistura foi composta de 2 µl de mistura de adaptadores (*Ion Adaptor Mix v2*) e 3 µl de solução de hibridização (*Hybridization Solution*) para cada amostra. Foram adicionados 5 µl dessa mistura a 3 µl de solução do RNA mensageiro (mRNA) fragmentado. A solução foi misturada gentilmente com pipeta por 10 vezes. A reação de hibridização foi realizada em termociclador a temperatura de 65°C por 10 minutos seguido de 30°C por 5 minutos. Após, foram adicionados em cada amostra 10 µl de tampão de ligação 2X concentrado e 2 µl de mistura de enzima de ligação. A solução foi misturada através de pipetagem por 5 vezes e incubada em termociclador a 30°C por 1 hora. Posteriormente em banho de gelo foi preparada uma mistura para realização da transcrição reversa. Essa mistura foi composta de 2 µl de água livre de nuclease, 4 µl de tampão de transcrição reversa 10X concentrado, 2 µl de solução de dNTP 2,5 mM e 8 µl de Ion RT Primer v2 para cada reação de ligação. Essa mistura (16 µl) foi adicionada aos 20 µl da reação de ligação e, gentilmente homogeneizada. Essa reação foi incubada em termociclador a 70°C por 10 minutos e após esse tempo a reação foi colocada no gelo. Posteriormente foram adicionados 4 µl de 10X SuperScript<sup>®</sup> Enzyme Mix, a reação foi gentilmente homogeneizada e incubada em termociclador a 42°C por 30 min.

#### **5.4.7.4. Purificação do cDNA**

Esta etapa foi realizada conforme protocolo SOLiD<sup>®</sup> Total RNA-Seq Kit como segue e tem como finalidade a seleção de fragmentos de 100 pb ou maiores. Foram adicionados 72 µl de Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP Reagent a cada 40 µl de amostra e, posteriormente, homogeneizado. A solução (112 µl) foi transferida para microplacas de 96 poços com suporte magnético. A solução foi incubada por 5 min a temperatura ambiente. A placa foi colocada no suporte magnético por 2-5 minutos para separar as esferas magnéticas da solução. Após a deposição das microesferas, o sobrenadante foi removido e descartado. Posteriormente, as

esferas magnéticas foram lavadas com 200 µl de solução de etanol 70% (v/v), e a solução foi incubada à temperatura ambiente por 30 segundos. Após este tempo, o etanol foi aspirado e descartado. A placa foi retirada da estante magnética e foram adicionados 40 µl de água livre de nuclease em cada amostra para eluir o cDNA. A placa foi novamente colocada na estante magnética para separar as esferas da solução por 2-5 minutos. Após a solução ficar clara, 40 µl do sobrenadante foram transferidos para novo poço vazio para uma segunda rodada de purificação e seleção do tamanho de fragmentos de 150 pb ou mais. A placa foi então removida da estante. Foram adicionados 64 µl de Agencourt® AMPure® XP Reagent a cada 40 µl de amostra. A solução foi misturada com pipeta por 10 vezes. A mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para os produtos de cDNA se ligarem às esferas magnéticas. A placa foi colocada na estante magnética por 2-5 minutos para separar as esferas magnéticas da solução. Após a solução ficar clara o sobrenadante foi aspirado e descartado. Ainda com a placa na estante magnética, foram adicionados 200 µl de etanol 70% (v/v) para cada amostra e incubado por 30 segundos à temperatura ambiente. Após a solução ficar clara, o sobrenadante foi aspirado e descartado. A placa foi retirada da estante magnética e as esferas magnéticas foram secas por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 40 µl de água livre de nuclease a cada amostra e a mistura foi homogeneizada por 10 vezes para eluir o cDNA. A placa foi então novamente colocada na estante magnética por 2-5 minutos para separar as esferas magnéticas da solução. Após a solução ficar clara, 40 µl foram transferidos para tubo com capacidade de 0,2 ml.

#### **5.4.7.5. Amplificação do cDNA**

Para cada amostra de cDNA, foi preparada uma mistura de PCR composta por: 33,4 µl de água livre de nuclease; 5 µl de tampão para PCR 10X concentrado (*10X PCR Buffer*), 4 µl de solução de dNTP; 1 µl de oligonucleotídeos 5' (*SOLiD 5' PCR Primer*) e 0,6 µl da enzima DNA polimerase (AmpliTaq® DNA Polymerase) totalizando um volume de 44 µl. Um total de 5 µl de cada amostra de cDNA foi transferida para tubos de PCR com capacidade de 0,2 ml. Posteriormente, 44 µl da mistura de PCR foram adicionados às amostras de cDNA. Para cada amostra foi adicionado 1 µl de 3' PCR Primer diferente. As reações de PCR foram realizadas em termociclador como segue: uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos; 18 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação); 62 °C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão) e extensão final por 72°C por 7 minutos.

#### **5.4.7.6. Purificação do DNA amplificado**

Um total de 50 µl de produto de PCR foi transferido para tubos novos com capacidade de 1,5 mL. Foram adicionados 200 µl de tampão de ligação (*Binding Buffer*) ao tubo e então homogeneizados. A amostra (250 µl) foi colocada em PureLink® Micro Kit Column e os tubos foram centrifugados a 10.000 xg por 1 minuto. O eluato passado pela coluna foi então descartado. A coluna foi retornada para o tubo e 600 µl de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) foram adicionados à coluna e submetida a uma nova centrifugação a 10.000 xg por 1 minuto. O eluato foi novamente descartado, a coluna foi novamente colocada no tubo e realizado uma centrifugação na coluna a 14.000 xg por 1 minuto. Após, a coluna foi colocada em um tubo de eluição PureLink®, adicionados 10 µl de tampão de eluição (*Elution Buffer*) no centro da membrana. Após 1 minuto de incubação, a coluna foi centrifugada a 14.000 xg por 1 minuto. Após, foram novamente adicionados 10 µl de tampão de eluição no centro da membrana e

após 1 minuto, a coluna foi centrifugada a 14.000 xg por 1 minuto. A concentração do DNA purificado foi quantificada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> 2000.

#### 5.4.7.7. Quantificação da biblioteca de DNA

A quantificação do DNA foi realizada através de qPCR seguindo o manual KAPA Library Quantification Kits como segue. Foi preparado uma mistura com 1 ml de iniciadores 10X (*Illumina Primer Premix 10X*) e 5 mL de KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Master Mix (2X). A biblioteca de DNA foi diluída 1:10 e 1:100 em solução composta de 10mM de Tris-HCl pH 8,0 e 0,05% de Tween 20. A placa de qPCR foi montada com 12 µl de KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Master Mix contendo Primer Mix, 4 µl de água de PCR e 4 µl de DNA diluído ou DNA padrão. A corrida foi feita com a etapa de ativação inicial a 95°C por 5 min; e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg e anelamento e extensão a 60°C por 45 seg.

#### 5.4.7.8. PCR em emulsão do cDNA purificado

Este passo foi realizado conforme protocolo Ion One Touch<sup>™</sup> 200 Template Kit v2 DL como segue. Em um tubo de 1,5 mL LoBind<sup>®</sup> foram adicionados os seguintes componentes: 280 µl de água livre de nuclease; 500 µl de Ion One Touch<sup>™</sup> 2X Reagent Mix; 100 µl de Ion One Touch<sup>™</sup> Enzyme Mix e 20 µl da biblioteca de DNA. A essa solução foram adicionados 100 µl de Ion OneTouch<sup>™</sup> 200 Ion Sphere<sup>™</sup> Particles (ISPs) totalizando um volume de 1.000 µl. Esse volume foi inserido na entrada de amostra do Ion OneTouch<sup>™</sup> Plus Reaction Filter Assembly e, posteriormente, foram adicionados 1.500 µl de Ion OneTouch<sup>™</sup> Reaction Oil no mesmo local. A PCR em emulsão foi então iniciada no equipamento. Após a corrida os tubos de recuperação foram removidos cuidadosamente do aparelho, o sobrenadante foi removido e o sedimento contendo os ISPs foi ressuspendido com a solução restante do tubo. Os ISPs ressuspendidos foram centrifugados a 15.500 xg por 2,5 minutos. O sobrenadante foi removido.

#### 5.4.7.9. Sequenciamento

Este passo foi realizado conforme protocolo Ion PI<sup>™</sup> Sequencing 200 Kit v2 como segue. Um volume de 5 µl de Ion PI<sup>™</sup> Control Ion Sphere foram adicionados aos ISPs previamente transferidos para tubos de PCR com capacidade de 0,2 ml. O material foi homogeneizado. O material foi centrifugado a 15.500 xg por 5 minutos e após, o sobrenadante foi removido. Foram adicionados 15 µl de Ion PI<sup>™</sup> Annealing Buffer, 20 µl de Ion PI<sup>™</sup> Sequencing Primer. O material foi homogeneizado e colocado em termociclador a 95°C por 2 minutos seguido de 37°C por 2 minutos. Após, foram adicionados 10 µl de tampão de corrida (*Ion PI<sup>™</sup> Loading Buffer*) e o material foi homogeneizado. Após o preparo do CHIP, a amostra foi inserida nele e o mesmo foi centrifugado na centrífuga do CHIP por 10 minutos. Posteriormente o CHIP foi colocado no Ion Proton Semiconductor Sequence (Life). As análises após o sequenciamento foram realizadas com o *software* CLC (CLC BIO, 2014).

Três réplicas biológicas de cada um dos três tratamentos foram usadas para preparar a biblioteca, resultando num total de 9 bibliotecas. Para as análises no CLC, foi usado o genoma de *Ppe8* que apresenta aproximadamente 8 MB, 134 *contigs* e 7779 sequências codificadoras de proteínas. Foi realizada a contagem do número total de *reads* após a retiradas dos rRNAs (16S, 23S e 5S). Após a remoção dos *reads* dos ribossomais, dos *reads* com 10pb ou menos e

as sequências dos *barcodes*, os *reads* foram mapeados contra o genoma de *B. tropica* estirpe Ppe8. Os valores de expressão RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*) foram calculados. A análise dos componentes principais (PCA) foi feita com base nos valores de RPKM. Foram determinados ainda a expressão diferencial dos genes dentro de cada combinação de tratamentos comparando a abundância de transcritos entre os pares de tratamentos. Os genes diferencialmente expressos ( $p$ -value < 0.05) induzidos e reprimidos (*fold change* > 2 e <-2 respectivamente) foram selecionados para análises posteriores. Esses genes foram anotados automaticamente através do software Blast2Go (CONESA & GÖTZ, 2008) e categorizados através do WebMGA (WU *et al.*, 2011). Para uma acurácia maior, os genes diferencialmente expressos estão sendo anotados manualmente através do *software* Artemis (RUTHERFORD *et al.*, 2000).

#### 5.4.8. RT-qPCR

A fim de validar os níveis de expressão gênica relativa por RT-qPCR dos genes diferencialmente expressos, foram selecionados sete genes diferencialmente expressos e pertencentes a sete classes diferentes de acordo com a categorização feita pelo COG. Iniciadores para RT-qPCR foram desenhados com comprimento em torno de 19-21 bases, um conteúdo de G/C aproximadamente de 50%, temperatura de anelamento (TM) em torno de 60°C e o comprimento do produto de PCR entre 69-150 pb (Tabela 5). O desenho dos iniciadores foi realizado com o auxílio do software (Primer3 plus) (ROZEN & SKALETSKY, 1999). As reações de RT-qPCR foram realizadas com amostras de cDNA diluídas 1:20, provenientes de três replicatas biológicas, utilizando o equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) em placas contendo 96 poços (MicroAmp® Optical 96), com a utilização de 5 µl do cDNA diluído, 7,5 µl de GoTaq® qPCR Master Mix, da empresa Promega (Lot 0000144031) e volume variado dos iniciadores direto e reverso, de acordo com a concentração de iniciador utilizada para cada gene e o volume final da reação foi completado para 15 µl com água ultrapura livre de nucleases. Os genes *lpxC* e *recA* foram utilizados como controle interno e o tratamento JMV+água usado como calibrador (RQ=1). A expressão relativa foi determinada com o programa qBase v.1.3.5 (HELLEMANS *et al.*, 2007).

A reação foi realizada utilizando o programa: 95°C por dois minutos, seguidos por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento e aquisição da fluorescência a 60°C por 30 segundos.



**Tabela 5.** Iniciadores usados na validação do RNA-seq por RT-qPCR.

<b>Gene</b>	<b>Sequência direta (5'-3')</b> <b>Sequência inversa (5'-3')</b>	<b>Tamanho do amplicon (pb)</b>	<b>Concentração utilizada (pmol)</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>
<i>bceE</i>	GACGGCACGATTTATTACCC CTTCTGGCTGCGATACGAC	150	300	62
<i>fliP1</i>	CATTCCGTTCCCTCATCATC GCGAGACCATCATCATAACC	71	500	62
<i>icmF1</i>	CCTCATTACGGGTTTCACG CTTCTCGTCGGGTTCTAG	97	500	62
<i>nifE</i>	CTATGGTGGTTATGAGGGCA CACACGGGGTTATGAATCG	69	500	62
<i>paaF</i>	TTACACCGCCAAGGACATC GCCATAGCCGTAACCTCACG	106	500	62
<i>secD</i>	GTATCGGCATCCTGACCTC GCGACTTGAGCTTCTTCTTG	93	500	62
<i>tsf</i>	AACAAGGCAAGCAAGGCAG AAGTCGGTTTCGCAGTTCAG	107	500	65
<i>lpxC</i>	TGAAGACGGTCGGCATCGGC ACGGGGTTCGGCAAATCCAC	112	100	65
<i>recA</i>	TCTGGACATTCGCCGTATCG GAGATGCCTTCGCCGTAGAG	141	500	60

## 5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Alterações no transcriptoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 em resposta à presença do fluido do apoplasto

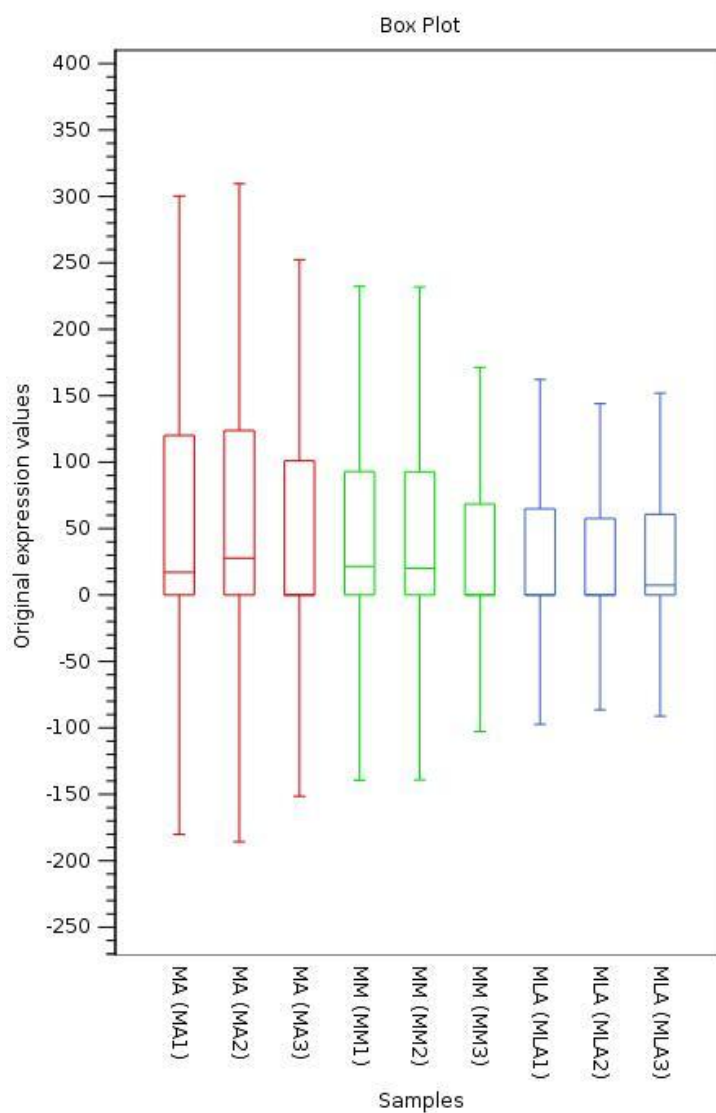
O perfil transcricional de *B. tropica* estirpe Ppe8 na presença e ausência do fluido apoplasto gerou aproximadamente 17 milhões de *reads* para os três tratamentos, sendo que cerca de 1,6 milhões; 1,7 milhões e 2,1 milhões foram mapeados unicamente ao genoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 nos tratamentos MA, MLA e MM, respectivamente, após a remoção dos rRNA, dos *reads* com 10pb ou menos e as sequências referentes aos códigos de barra (*barcodes*) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resumo dos dados de RNA-seq

Amostras	Número de <i>reads</i> nas réplicas biológicas	Total <i>reads</i>	Número de <i>reads</i> após remoção dos rRNAs	Número de <i>reads</i> mapeados unicamente no genoma de Ppe8	Total de <i>reads</i> mapeados unicamente em cada tratamento
MA R1	4194351	17950732	2503162	533610	1606924
MA R2	5278999		3055062	509590	
MA R3	8477382		2422989	563724	
MLA R1	4698029		1942888	346311	
MLA R2	7806802	16786088	4467387	920308	1765132
MLA R3	4281257		1633248	498513	
MM R1	3767829		1710185	629250	
MM R2	7444118	16236734	2671227	1088477	2158245
MM R3	5024787		2896158	440518	

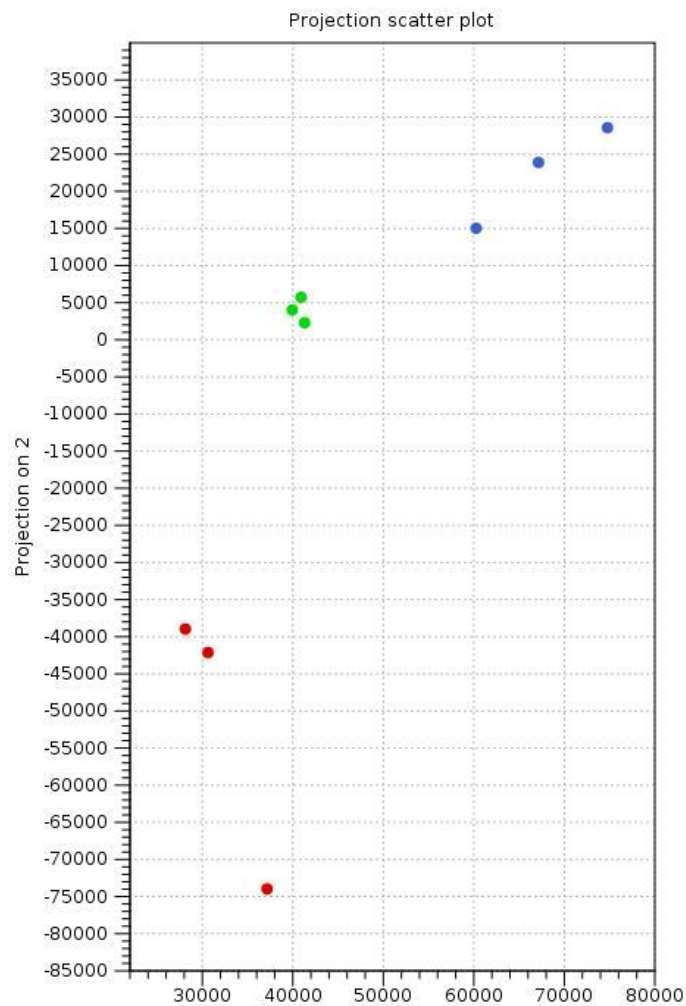
Os *reads* foram mapeados unicamente ao genoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 com o programa CLC Genomics Workbench 5.1, com um comprimento mínimo de 90% e similaridade de 80. Os números 1, 2 e 3 se referem às réplicas das amostras biológicas.

Em adição, foi realizada uma análise de qualidade das réplicas biológicas. O gráfico tipo *box plot* indica que a distribuição dos valores de expressão nas nove amostras foi similar, assim como a distribuição entre as réplicas biológicas de cada tratamento (Figura 12).



**Figura 12.** *Box plot* dos níveis de expressão (RPKM) dos genes nas nove amostras de *B. tropica* estirpe Ppe8.

Com relação à análise dos componentes principais (PCA) há uma clara separação entre os tratamentos, e as réplicas biológicas apresentaram padrão semelhante entre si (Figura 13).



**Figura 13.** Análise dos componentes principais dos valores dos níveis de expressão em RPKM do transcriptoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 em três condições de cultivo. Círculos vermelhos, verdes e azuis representam os tratamentos MA, MM e MLA, respectivamente.

A análise dos dados mostrou que um total de 503 genes tiveram seus níveis de expressão reprimidos e 157 genes induzidos na presença do fluido do apoplasto (MLA) em comparação com o meio completo (MM) enquanto que 703 e 387 genes foram reprimidos e induzidos respectivamente na presença do fluido do apoplasto em comparação com o meio diluído (MA) (Anexo 5). Estes resultados indicam que o fluido do apoplasto interfere na expressão gênica de Ppe8 em plantas de cana de açúcar. É conhecido que o fluido do apoplasto altera a expressão gênica de *Pseudomonas syringae* em associação com feijão, *Ralstonia solanacearum* com tomate e *Xanthomonas campestris* com repolho (JACOBS *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013; BERNONVILLE *et al.*, 2014).

Foram selecionados sete genes de forma aleatória, que segundo análise do RNA-seq, se mostraram com expressão diferencial entre os tratamentos. Os genes *icmF1*, *secD* e *tsf* tiveram seus níveis de expressão aumentados em 7,8; 7,8 e 6,8 vezes no tratamento MLA em relação a MA respectivamente e 14,2; 7,9 e 3,2 vezes no tratamento MM em relação a MA respectivamente. Os resultados obtidos por RT-qPCR mostraram que os genes *icmF1*, *secD* e *tsf* tiveram seus níveis de expressão aumentados em 1,71; 2,26 e 3,09 vezes no MLA em

relação a MA, respectivamente e em 1,81; 1,78 e 1,48 vezes no MM em relação a MA, respectivamente corroborando com os resultados do RNA-seq. O gene *paaF* teve seu nível de expressão reduzido em 15,7 e 12,5 vezes no MLA em relação a MA de acordo com os dados de RNA-seq e RT-qPCR respectivamente. Já o gene *nifE* não apresentou dados de expressão no MLA pelo RNA-seq, resultado confirmado por RT-qPCR onde MLA foi reprimido 50 vezes em comparação ao MA. O gene *fliP1* foi expresso 13,6 e 3,33 vezes a mais no MM que MA por RNA-seq e RT-qPCR respectivamente. Já o gene *bceE* não apresentou valor de *fold change* pois só foi expresso no tratamento MM de acordo com os dados de RNA-seq, resultado confirmado também por RT-qPCR que mostrou que o gene foi expresso 4,48 vezes a mais no MM que MA (Tabela 7). Portanto, a regulação dos genes *bceE*, *fliP1*, *icmF1*, *nifE*, *paaF*, *secD* e *tsf* foi confirmada por RT-qPCR, validando os dados de RNA-seq (Tabela 7).

**Tabela 7.** Genes de *B. tropica* estirpe Ppe8, diferencialmente expressos no MA (meio diluído) (calibrador=1) em relação ao MM (meio completo) ou MLA (meio com fluido do apoplasto).

Gene	RNA-seq		RT-qPCR <sup>a</sup>	
	MLA	MM	MLA	MM
<i>bceE</i>	SDS	*0	SDS	4.48
<i>fliP1</i>	SDS	13.6	SDS	3.33
<i>icmF1</i>	7.8	14.2	1.71	1.81
<i>nifE</i>	**0	SDS	-50	SDS
<i>paaF</i>	-15.7	SDS	-12.5	SDS
<i>secD</i>	7.8	7.9	2.26	1.78
<i>tsf</i>	6.8	3.2	3.09	1.48

Valores expressos em *fold change*

\*sem valor de *fold change* pois a expressão do gene só foi detectada no tratamento MM

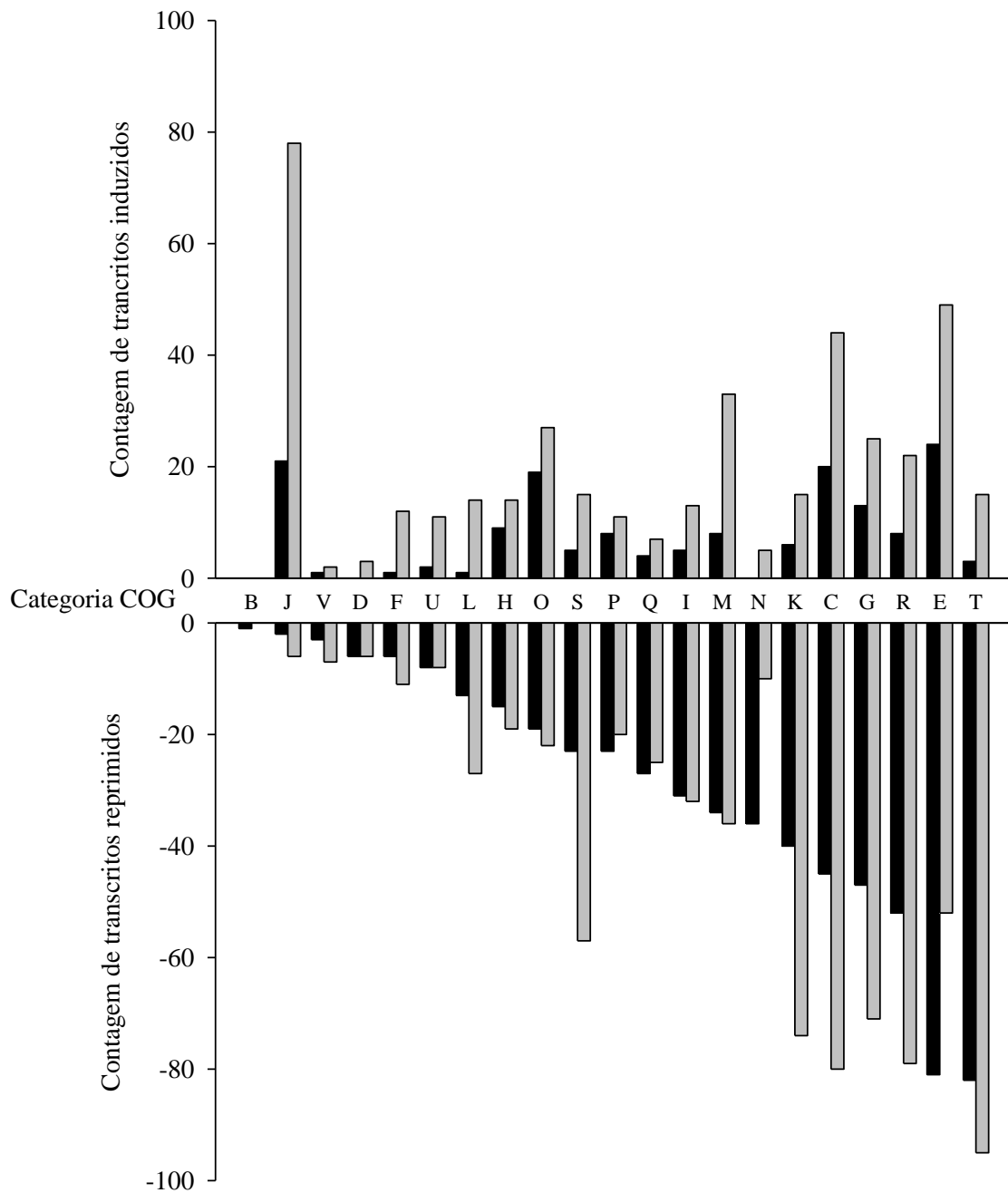
\*\*sem valor de *fold change* pois o gene só foi expresso em MA

sds = sem diferença significativa

<sup>a</sup> expressão relativa

A maioria dos genes reprimidos na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio completo pertence às seguintes classes: mecanismo e transdução de sinais (13%), seguido por metabolismo e transporte de aminoácidos (13%), funções gerais (8%), metabolismo e transporte de carboidratos (7%), produção e conversão de energia (7%), transcrição (6%), motilidade celular (6%), parede celular, membrana e biogênese do envelope (5%), dentre outras (Figura 14). Já em relação aos genes induzidos na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio completo os mesmos pertencem às classes, metabolismo e transporte de aminoácidos (15%), tradução, estrutura ribossomal e biogênese (13%), conversão e produção de energia (12%), modificação pós traducional, recuperação de proteínas e chaperonas (12%), metabolismo e transporte de carboidratos (8%) dentre outras (Figura 14). Contudo, quando se compara a presença do fluido do apoplasto em relação ao meio diluído verifica-se que a maioria dos genes reprimidos, pertencem às seguintes classes: mecanismo e transdução de sinais (13%), conversão e produção de energia (10%), funções gerais (10%), transcrição (10%), metabolismo e transporte de carboidratos (9%), dentre outras (Figura 14). Já para os genes induzidos na presença do fluido do apoplasto podem ser citadas

as classes: tradução, estrutura ribossomal e biogênese (19%), metabolismo e transporte de aminoácidos (12%), conversão e produção de energia (10%), parede celular, membrana e biogênese do envelope (8%), modificação pós traducional, recuperação de proteínas e chaperonas (6%), metabolismo e transporte de carboidratos (6%) dentre outras (Figura 15). Portanto, o perfil transcriptômico apresentado por *B. tropica* estirpe Ppe8, crescida na presença do fluido do apoplasto de cana-de-açúcar, sugere que a bactéria é metabolicamente ativa na planta.



**Figura 14.** Distribuição dos genes diferencialmente regulados de *B. tropica* estirpe Ppe8 pelo fluido do apoplasto de acordo com a categoria do COG. Genes diferencialmente expressos na presença do fluido do apoplasto quando comparado ao meio diluído apresentam barras em cor cinza e genes diferencialmente expressos na presença do fluido do apoplasto quando comparado ao meio completo apresentam barras em cor preta. B: Dinâmica e estrutura da cromatina, J: Tradução, estrutura ribossomal e biogênese, V: Mecanismos de defesa, D: Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo, F: Transporte e metabolismo de nucleotídeos, U: Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular, L:

Replicação, recombinação e reparo, H: Metabolismo e transporte de coenzimas, O: Modificação pós-transducional, recuperação de proteínas e chaperonas, S: Função desconhecida, P: Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, Q: Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, I: Metabolismo e transporte de lipídeos, M: Parede celular, membrana e biogênese do envelope, N: Motilidade celular, K: Transcrição, C: Produção e conversão de energia, G: Metabolismo e transporte de carboidratos, R: Funções gerais, E: Metabolismo e transporte de aminoácidos, T: Mecanismos de transdução de sinais.

Em função do objetivo principal do trabalho que foi avaliar a importância do fluido do apoplasto na expressão gênica de Ppe8 na colonização de plantas de cana-de-açúcar, dar-se-á uma maior ênfase nas principais classes induzidas ou reprimidas pela presença do apoplasto.

### **Classe - Mecanismos de transdução de sinais**

O padrão das classes dos genes diferencialmente expressas na presença do apoplasto em comparação ao meio completo ou ao meio diluído é semelhante. Por exemplo, foi verificado que os genes pertencentes à classe de mecanismo de transdução de sinais compuseram a maior parte dos genes reprimidos na presença do fluido do apoplasto tanto em comparação com o meio completo quanto meio diluído em que foram reprimidos 82 e 95 genes na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio completo e meio diluído, respectivamente. Esses genes incluem as histidina quinases (ORF\_4988, ORF\_1329, ORF\_5947, ORF\_6039, ORF\_6041, ORF\_3153, ORF\_2154, ORF\_5947), reguladores de respostas (ORF\_6699, ORF\_766, ORF\_2788, ORF\_6984), proteínas com domínio GGDEF, EAL, GAF ou PAS/PAC (ORF\_1546, ORF\_1307, ORF\_1225, ORF\_5752, ORF\_3201, ORF\_2855), serina-treonina (ORF\_1169), um autoindutor (*luxQ1*), dentre outros. É interessante observar que proteínas com domínio GGDEF ou EAL podem estar envolvidas na síntese ou hidrólise, respectivamente, de di-GMP-cíclico, um mensageiro secundário global envolvido em mecanismos de sinalização para adesão, motilidade, virulência e morfogênese celular (SIMM *et al.*, 2004; RÖMLING *et al.*, 2005; BOYD & O'TOOLE, 2012). Em *Azoarcus* cultivado sob condições de *quorum sensing*, foi observada a indução de genes que codificam proteínas com domínio GGDEF, EAL, GAF ou PAS/PAC indicando que os produtos desses genes podem estar envolvidos na sinalização bacteriana, o oposto do que ocorreu neste trabalho (HAUBERG-LOTTE, *et al.*, 2012). Já RÖMLING *et al.* (2005) verificaram que altos níveis de biossíntese de di-GMP-cíclico através da super expressão de proteínas com domínio GGDEF aumentaram a produção de biofilme e a super expressão de EAL reduzia o níveis de di-GMP-cíclico levando a um aumento na motilidade bacteriana. Ambos os domínios foram reprimidos na estirpe Ppe8 na presença do apoplasto indicando a repressão de sinalizadores para formação de biofilme e genes relacionados a motilidade. Domínios PAS/PAC são sensores que monitoram a alteração no ambiente de luminosidade, potencial redox, oxigênio ou pequenas moléculas no citossol (TAYLOR & ZHULIN, 1999) e a repressão dessas proteínas pode indicar que essas variáveis foram bem controladas no trabalho. Proteínas com domínios PAS/PAC podem interagir com proteínas *hrp* que participam da patogênese em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (ALEGRIA *et al.*, 2004). Isto pode indicar que esses domínios também tenham um papel específico em causar doenças em plantas e portanto a repressão desses genes pela estirpe Ppe8 seria uma forma de reconhecimento do apoplasto de cana-de-açúcar e não causar doenças nas plantas.



A capacidade da bactéria em responder a alterações ambientais pode ser uma vantagem seletiva. Esse sistema geralmente envolve receptores transmembrana que percebem sinais extracelulares e transmitem informações para componentes sinalizadores intracelularmente, os quais regulam as repostas elicitadas pela ativação de proteínas efetoras (GOUDREAU & STOCK, 1998). Essas proteínas efetoras podem elicitar respostas nas plantas as quais podem reconhecer microrganismos, sendo que a interação somente ocorrerá se o microrganismo for mais rápido do que a resposta induzida da planta, se elicitores não forem produzidos ou se supressores impedirem as reações de defesa da planta (METRAUX *et al.*, 2002). Isso pode significar que *B. tropica* estirpe Ppe8 reconhece o apoplasto de cana de açúcar, porém, para não ativar as respostas de defesa da planta, reprime em sua maioria, a transcrição de genes pertencentes à classe de mecanismos de transdução de sinais. Esta repressão pode significar um importante indício de reconhecimento específico em relação a variedade da cana. DROGUE *et al.* (2014) analisando o perfil do transcriptoma de duas estirpes de *Azospirillum* (4B e B510) inoculadas em duas cultivares de arroz (Cigalon e Nipponbare) verificaram que a estirpe B510 reprime um grande número de genes relacionados à ativação de respostas de defesa da planta como genes PRs (proteínas de resistência), genes que codificam peroxidases, fatores de transcrição, genes envolvidos na síntese de ácido salicílico, etileno, dentre outros que teriam potencial para ativar as respostas de defesa da planta. Em *Azoarcus* cultivado na presença e na ausência de exsudatos de raízes de arroz, foi verificado que genes envolvidos em mecanismos de transdução de sinais foram modulados indicando que os exsudatos podem influenciar no mecanismo de transdução de sinais na estirpe BH72 de *Azoarcus* sp. (SHIDORE *et al.*, 2012). Contudo, os mecanismos pelos quais plantas percebem estímulos endógenos e exógenos e respondem a esses estímulos dependem de proteínas receptoras as quais são classificadas de acordo com seu domínio estrutural (AFZAL *et al.*, 2008). Portanto, talvez *B. tropica* reconheça os componentes do apoplasto e reprima os genes relacionados aos mecanismos de transdução de sinais para não gerar um reconhecimento e posterior cascata de eventos na planta de cana, levando que a mesma a reconheça e expresse genes que possam inibir a colonização da bactéria. Este reconhecimento pode ser específico da variedade empregada de cana-de-açúcar, portanto, para verificar se ocorre o mesmo comportamento de Ppe8, há a necessidade de se testarem outras variedades (Figura 24).

### **Classe- Parede celular, membrana e biogênese do envelope**

Houve a expressão diferencial de genes pertencentes a esta classe quando se utilizou o fluido do apoplasto em comparação ao meio completo. Seis genes foram superexpressos no tratamento com líquido do apoplasto e 31 genes foram reprimidos. Dentre os genes reprimidos estão os genes *ompA* e as ORFs \_5598 e ORF\_5600, as quais codificam para a biossíntese de peptídeoglicano, exopolissacarídeo e lipopolissacarídeo, respectivamente. Com relação ao meio diluído, o apoplasto também reprimiu genes que codificam uma proteína envolvida na biogênese da membrana externa (ORF\_4492), biossíntese de exopolissacarídeos (ORF\_5483 e ORF\_5600), glicosiltransferases (ORF\_18, ORF\_1131 e ORF\_975), dentre outras. Outra ORF encontrada sendo reprimida nessa classe na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio diluído codifica uma GDP-manose 4,6-deidratase (ORF\_5484). Ela é relacionada a biossíntese de polissacarídeo extracelular e formação de biofilme (LERNER *et al.*, 2009). Polissacarídeos extracelulares têm um importante papel em interações planta-bactéria por promover uma ancoragem firme e irreversível às raízes das plantas (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). MENESES *et al.* (2011), verificaram

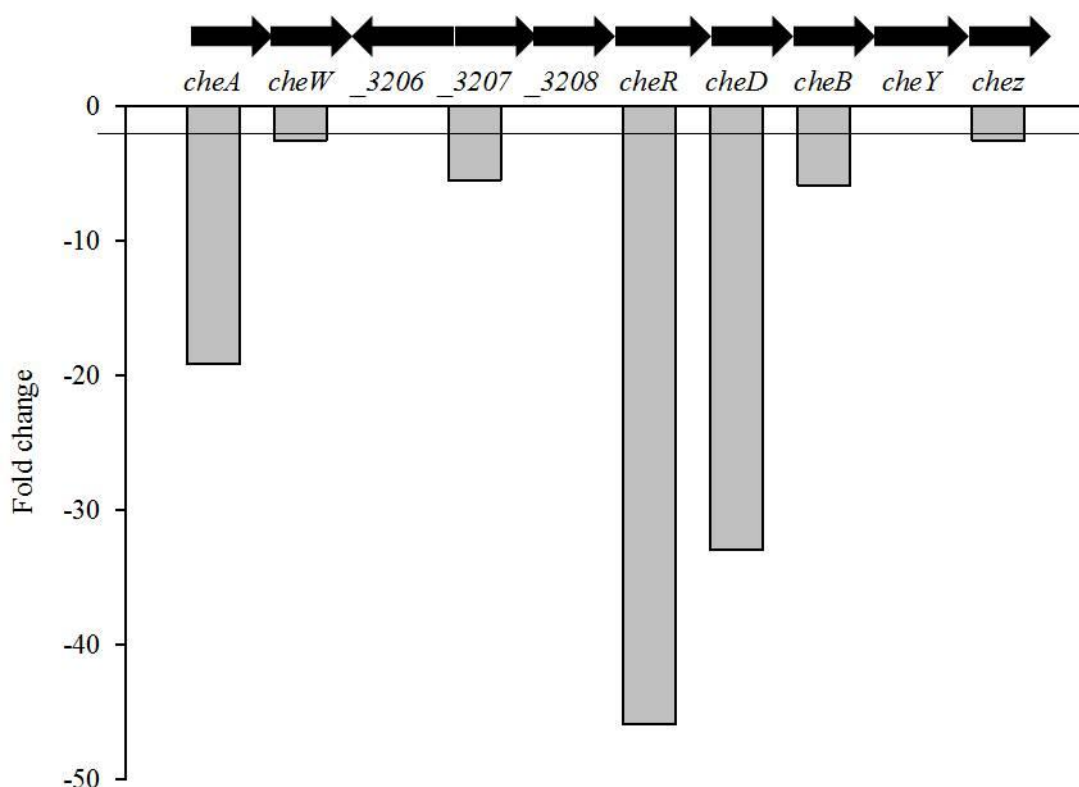
que mutante de *G. diazotrophicus* na capacidade de produzir EPS (exopolissacarídeos), apresentou adesão deficiente na superfície de raízes de plântulas de arroz, enquanto que o mutante complementado apresentou capacidade de adesão restabelecida e semelhante à estirpe selvagem indicando que EPS tem um importante papel nos passos iniciais de infecção, levando a uma colonização endofítica eficiente. MENESES *et al.* (2011) verificaram ainda que na ausência da fonte de carbono manitol, a estirpe selvagem Pal 5 de *G. diazotrophicus* apresentou aderência reduzida quando comparada à presença de manitol indicando que o reconhecimento planta-bactéria pode ser direcionado pelo status nutricional da planta (MENESES *et al.*, 2011). Plantas, em geral, podem reconhecer muitos PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns - padrões moleculares associados a patógenos) bacterianos. Os LPS que envolvem as células bacterianas são percebidos por uma série de espécies de plantas. Esses PAMPs podem ser conhecidos, como neste caso, MAMPs (Microbe-associated molecular pattern - padrões moleculares associados à micorganismos) por serem referentes a organismos que não causam doenças nas plantas. TADRA-SFEIR *et al.* (2015) também encontraram genes relacionados a biosíntese de LPS (lipopolissacarídeos) reprimidos quando *H. seropedicae* foi cultivada na presença de naringenina, um flavonóide derivado de plantas. Nossa hipótese é que a repressão desses genes seja parte da resposta da bactéria em função dos componentes do líquido do apoplasto os quais podem levar à modulação de LPS, EPS e peptídeoglicano evitando assim a elicitação da resposta de defesa da planta. Genes que participam destas vias fazem parte da síntese de biofilme que na interação planta-bactéria, pode ser fator de virulência de diversos patógenos (DANHORN & FUQUA 2007). A produção de EPS, especificamente, está envolvida na colonização epifítica e vascular de patógenos tais como *Erwinia amylovora* (KOCZAN *et al.* 2009) e em muitos casos pode levar ao bloqueio de vasos do xilema (GENIN & BOUCHER, 2002).

Genes que codificam glicosiltransferases foram reprimidos na presença do apoplasto. Glicosiltransferases transfere monossacarídeos para aceptores com açúcar ou sem resultando na formação de unidades repetidas de sacarídeo (LI & WANG, 2012). Finalmente essas unidades são polimerizadas e este polímero é exportado das células formando EPS, LPS, CPS (polissacarídeos capsulares), peptídeoglicano, glicolipídeos e glicosilação lipídica (LI E WANG, 2012). Mutantes de *X. citri* subsp. *citri* defectivos na capacidade de produzir glicosiltransferases apresentaram capacidade de biossíntese de EPS e LPS reduzida, bem como a motilidade, formação de biofilme e virulência em plantas de citrus (LI & WANG, 2012). Redução de virulência também foi verificada em mutantes defectivos em produzir EPS de *X. campestris* pv. *campestris* (LU *et al.*, 2007). Estes resultados indicam que glicosiltransferases são importantes também na virulência e portanto talvez esta seja a hipótese da repressão desses genes por Ppe8.

Como a estirpe bacteriana testada é uma diazotrófica endofítica, talvez em seu processo de colonização a expressão de genes que codificam tais componentes importantes de parede celular, membrana e envelope sejam reprimidos a fim de uma colonização eficiente e de sucesso com o intuito de desviar das respostas de defesa da planta. Os resultados sugerem que *B. tropica* é capaz de controlar a síntese de LPS em resposta a sinais dos componentes do fluido do apoplasto das plantas. LPSs são requeridos para a colonização de milho por *H. seropedicae*, pois estirpes deficientes na produção de LPS apresentaram redução na adesão na superfície radicular de milho ocasionando uma redução de mais de 90% de bactérias quando comparada à estirpe selvagem. Os autores concluíram que isso é uma consequência da adesão ineficiente e uma maior ativação das defesas da planta (BALSANELLI *et al.*, 2010). Assim, podemos sugerir que após a entrada da bactéria na planta, a mesma pode reprimir a expressão desses genes (Figura 24).

## Classe - Motilidade celular

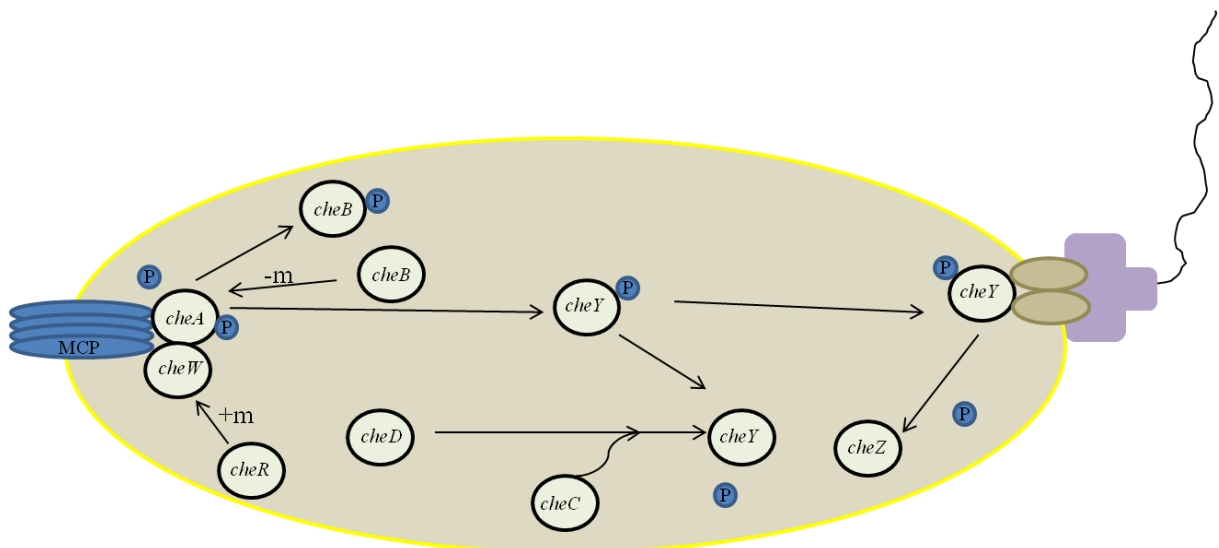
A colonização bacteriana é dependente de uma motilidade e quimiotaxia em busca de sinalizadores atrativos que podem ser compostos que ativam vias de sinalização específicas das bactérias (BASHAN *et al.*, 2004). Foram identificados alguns genes envolvidos na quimiotaxia, que são envolvidos na motilidade celular, estando reprimidos na presença do fluido do apoplasto quando comparado ao meio completo. São eles : *cheA*, *cheB*, *cheC*, *cheD*, *cheW*, *cheZ* e *cheR* (grupo conservado de um sistema de transdução de sinal) que codificam proteínas relacionadas com a quimiotaxia (Figura 15) e as ORFs: *\_7336*, *\_44*, *\_771*, *\_1234*, *\_2547*, *\_3207*, *\_3357*, *\_4185*, *\_4474*, *\_6857*, *\_7676* e *\_796* (conhecidas como MCPs ou *methyl-accepting proteins*), um grupo de quimiorreceptores transmembrana (Figura 16).



**Figura 15.** Genes reprimidos por Ppe8 na presença do apoplasto em comparação ao meio completo. Genes que não apresentam barras (*fold change*), não foram diferencialmente expressos.

Já em relação ao meio diluído a presença do fluido do apoplasto reprimiu *cheB* (regulador de resposta) e a ORF\_44, ORF\_46, ORF\_771 e ORF\_7336 (MCPs). Genes que codificam uma via central de transdução de sinais para a quimiotaxia, estão presentes nas bactérias móveis (SANT'ANNA *et al.*, 2011). O grupo de genes citado acima afeta a produção de exopolissacarídeos e a floculação em *Azospirillum brasilense* (EDWARDS *et al.*, 2011). Os genes que codificam MCPs podem estar relacionados à motilidade celular através da regulação da histidina quinase CheA que fosforila um regulador de resposta o qual controla a direção rotacional de um flagelo motor (FALKE *et al.*, 1997). A via de sinalização da atração

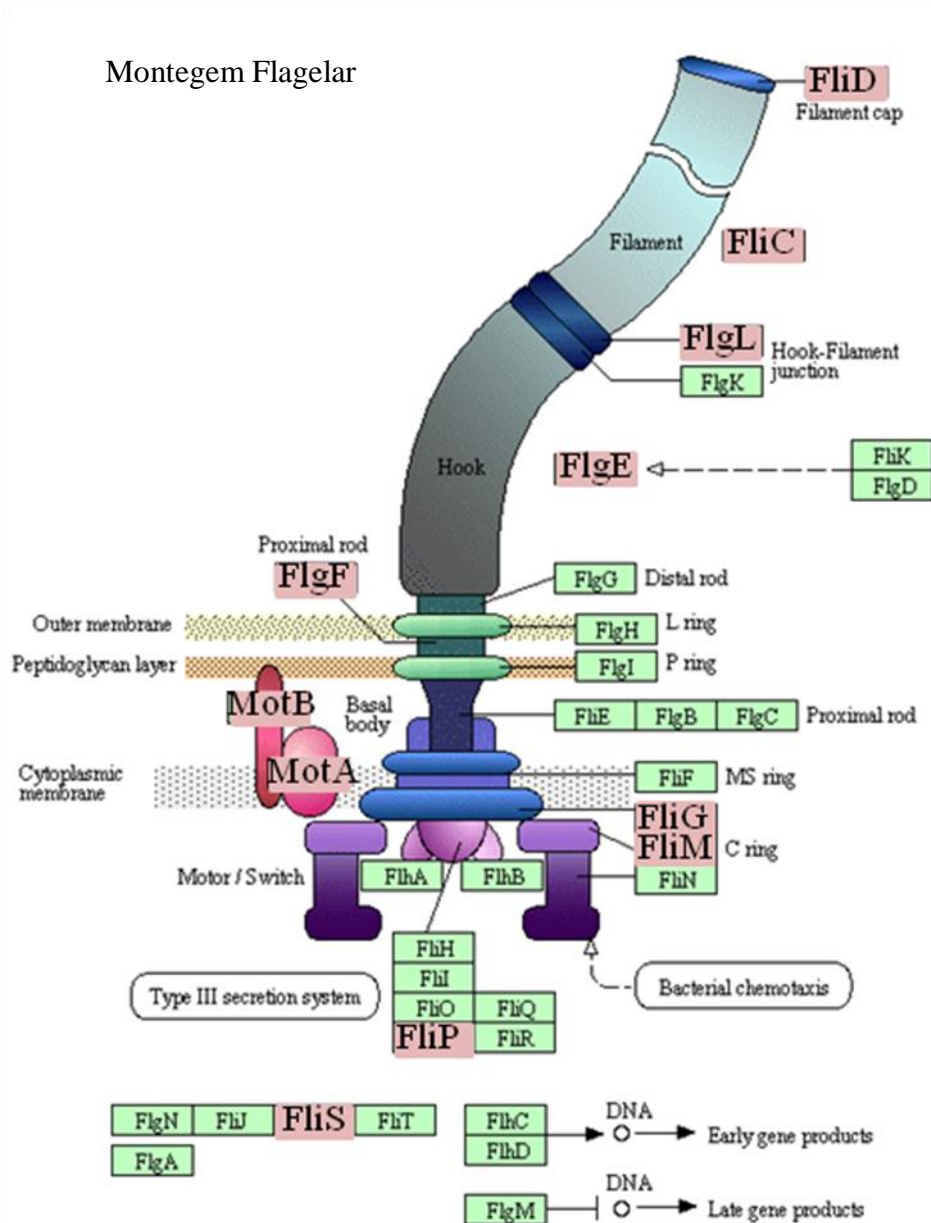
bacteriana por exsudatos de plantas envolve processo de fosforilação que transduz sinais de quimiorreceptores para motores flagelares (CELANI & VERGASSOLA, 2010) e causam alterações na direção da rotação do motor (WADHAMS & ARMITAGE, 2004). Esses receptores formam associações complexas com proteínas quimiotáticas do citoplasma incluindo a histidina quinase, CheA e uma proteína adaptadora CheW. Após a recepção do sinal, CheA torna-se autofosforilada em um resíduo de histidina conservado e se conecta a um regulador de resposta CheY. O CheY fosforilado controla as alterações na direção dos flagelos. A atividade de sinalização de quimiorreceptores é modulada por atividade antagônica de uma metiltransferase CheR e uma metilesterase CheB. CheR adiciona grupos metil a específicos resíduos de glutamato nas regiões C-terminal de receptores enquanto que CheB depende de CheA fosforilado (SOURJIK, 2004; WADHAMS & ARMITAGE, 2004). Esta transdução de sinais quimiotática é conservada tanto em espécies bacterianas próximas quanto mais distantes filogeneticamente. A repressão dos genes relacionados aos flagelos e à quimiotaxia indica que o apoplasto pode reduzir a motilidade de *B. tropica*. Genes relacionados à quimiotaxia são importantes principalmente para reconhecimento de exsudatos radiculares que ativam algumas vias de sinalização em bactérias e a atraem para posteriormente dar início ao processo de infecção (BASHAN *et al.*, 2004). TADRA-SFEIR *et al.* (2015) verificaram alguns genes relacionados à quimiotaxia que estavam reprimidos em *H. seropedicae* quando a bactéria foi crescida na presença de naringenina. Resultado semelhante foi obtido quando *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria importante no biocontrole de *P. fluorescens*, foi cultivada na presença de exsudatos radiculares da cultivar de baterraba Celt, onde os genes *cheY*, *cheA* e *pctA* foram reprimidos (MARK *et al.*, 2005). Genes envolvidos na quimiotaxia foram também reprimidos em *P. syringae* na presença do fluido do apoplasto de feijão (YU *et al.*, 2013). Isto sugere que um movimento ativo direcionado para um gradiente de nutrientes não deve ser necessário no apoplasto (Figura 24).



**Figura 16.** Cascata regulatória da quimiotaxia (Fonte: Adaptado de Russel, 2012). Os genes representados nas figuras foram reprimidos por Ppe8 na presença do fluido do apoplasto em comparação com o meio completo. MCPs ativam histidina kinases de CheA via uma proteína adaptadora CheW, CheA se autofosforila e transfere o fosfato para um regulador de resposta CheY que se difunde e interage com proteínas flagelares. Então CheY é desfosforilado por uma fosfatase CheZ, uma metiltransferase CheR adiciona grupos metil a resíduos de glutamato de receptores para modular a atividade de CheA, outro regulador de resposta CheB, é fosforilado por CheA ativando a atividade de metiltransferase para restaurar CheR através

da demetilação de CheA, em adição a deaminase CheD converte resíduos de glutamina conservados de receptores para glutamato, aumentando a disponibilidade de substratos para CheR e uma fosfatase CheC ativa CheD formando um complexo com CheY fosforilado.

Quanto aos genes responsáveis pelos flagelos, estes são regulados por alterações ambientais. Os genes *flgF*, *fliP1*, *fliD1*, *flgE*, *motA*, *motB*, *fliG*, *fliM*, *flgL*, *fliC* e *fliS* foram reprimidos na presença dos componentes do apoplasto em comparação ao meio completo e em comparação ao meio diluído. A ORF que codifica uma das proteínas que compõem o motor do flagelo (ORF\_1046) e apenas três ORFs, que codificam proteínas flagelares (ORF\_3053, ORF\_3227 e *flgE*) foram induzidas (Figura 17).



**Figura 17.** Proteínas envolvidas na montagem flagelar (Fonte:adaptado de KEGG Pathway). O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de

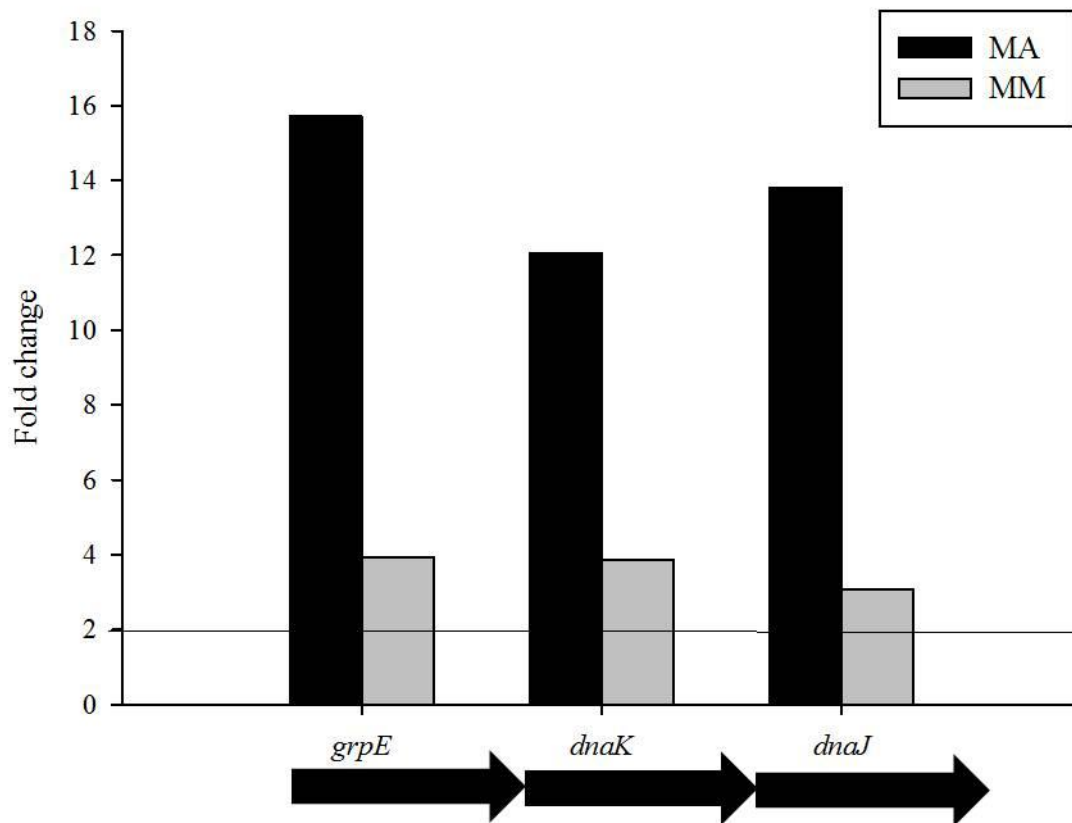
cor vermelho claro foram reprimidos em Ppe8 cultivada em meio contendo líquido do apoplasto em comparação ao meio completo.

XIE *et al.* (2015) obtiveram o transcriptoma de *Bacillus subtilis* em resposta ao contato com plântulas de arroz por 2 horas e verificaram que genes como *fliL* e *flgK* associados à motilidade, apresentavam-se reprimidos, porém ao avaliarem a expressão desses genes por RT-qPCR verificaram que os mesmos encontravam-se induzidos enquanto que genes envolvidos na formação de biofilme, *sfA* e *sinI*, somente até 15 minutos de contato, e chegaram a conclusão que provavelmente a bactéria pode ter paralisado a migração até a raiz até o momento de coleta (2 horas). Esta paralisação ou redução da expressão de genes relacionados a quimiotaxia e movimento pode ser em função de uma conservação de energia, o que mantém esses genes em baixos níveis (XIE *et al.*, 2015). O mesmo pode ter acontecido neste trabalho, onde, provavelmente os genes relacionados à quimiotaxia e movimento foram expressos mais rapidamente e, posteriormente, foram reprimidos para que a bactéria pudesse reduzir gastos com energia. Além do mais, flagelinas podem elicitar respostas de defesa nas plantas pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (FELIX *et al.*, 1999). A proteína flagelina, que é o maior componente estrutural do flagelo bacteriano é responsável basicamente pela motilidade e adesão bacteriana nas superfícies, e é reconhecida por muitas plantas (BOLLER & FELIX, 2009). As propriedades imunogênicas da flagelina residem na região altamente conservada da molécula localizada no N-terminal (ZAMIOUDIA & PIETERSE, 2012). O peptídeo sintético flg22 (que corresponde a 22 aminoácidos localizados na região conservada da proteína flagelina) elicitam respostas de defesa na maioria das espécies de plantas (FELIX *et al.*, 1999; LOPEZ-GOMEZ *et al.*, 2012). Como alguns desses genes envolvidos na biossíntese de flagelos também estão envolvidos na biossíntese de flagelinas, a repressão desses genes na presença dos componentes do apoplasto pode ser uma tentativa de escapar das respostas de defesa da planta. Isto também foi observado em *Azoarcus* sp. em resposta a exsudatos de raízes e em *H. seropedicae* quando cultivada na presença de naringenina (SHIDORE *et al.*, 2012 e TADRA-SFEIR *et al.*, 2015). Isto indica que o fluido do apoplasto pode afetar a motilidade de *B. tropica* e como a proposta do trabalho era mimetizar o que ocorre *in vivo*, talvez a bactéria não precise se movimentar em direção a diferença de gradientes de nutrientes, uma vez que a mesma já teria colonizado e já teria lançado mão da expressão de tais genes quando a mesma se encontra no solo ou rizosfera e rizoplano. Sendo assim, os dados obtidos neste trabalho, indicam que o movimento ativo é menos importante quando a população bacteriana está bem estabelecida no interior da planta (Figura 24). Nossos dados corroboram os de SHEIBANI-TEZERJI *et al.* (2015), que não encontraram genes diferencialmente expressos relacionados a motilidade no transcriptoma de *B. phytofirmans* quando crescidas no interior de plantas de batata.

### **Classe - Modificação pós traducional, recuperação de proteínas e chaperonas**

Foram encontrados 19 e 14 genes reprimidos no fluido do apoplasto em comparação ao meio diluído e completo, e, 26 e 19 genes induzidos no apoplasto em comparação ao meio diluído e completo, respectivamente (Anexo 5). Dentre eles, quatro genes que codificam chaperonas e dois genes que codificam proteínas de choque térmico (*heat shock protein*) foram induzidos na presença do fluido do apoplasto em relação ao meio completo. Chaperonas estão envolvidas em vários processos bacterianos como o enovelamento de proteínas recém-sintetizadas, secreção de proteínas, prevenção da agregação de proteínas no choque térmico e reparação de proteínas que foram danificadas ou desenoveladas por

estresses (HERNÁNDEZ-MORALES *et al.*, 2009). Os genes *groL* (chaperonina), *groS*, *dnaJ*, *dnaK* (genes que codificam chaperonas), *grpE* e *htpG* (genes que codificam proteínas de choque térmico) foram induzidos tanto em comparação ao meio completo quanto ao meio diluído. Normalmente, a indução de genes que codificam chaperonas é uma indicação de uma alta reciclagem de proteínas como produto de um metabolismo ativo ou mesmo de uma adaptação do metabolismo (LUND, 2001). O interessante neste trabalho foi verificar que um *operon* envolvido com a síntese de chaperonas foi induzido (Figura 18). O gene *grpE* codifica uma proteína de choque térmico e é localizado a montante do gene *dnaK* e *dnaJ* que também codificam proteínas relacionadas ao choque térmico (chaperonas moleculares). A superexpressão desses genes pode indicar que as células crescidas no fluido do apoplasto podem ter sofrido algum dano nas proteínas. Provavelmente algum composto presente no fluido do apoplasto pode ser responsável por isso, já que durante a execução do trabalho foi verificado que o fluido do apoplasto sofre uma tendência a oxidação durante o tempo de experimento o que poderia também influenciar as células de *B. tropica*. No processo de oxidação ocorre o acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação como melanina, suberina, lignina, cutina e calose (SATO *et al.*, 2001). É importante salientar que esta oxidação foi verificada visualmente pelo escurecimento do meio com fluido do apoplasto durante o crescimento da bactéria e não por alteração de pH, por exemplo, pois se manteve ao redor de 5,5 no final do experimento (dados não mostrados). Em *Acetobacter pasteurians* foi também registrado superexpressão dos genes *grpE-dnaK-dnaJ* na presença de etanol resultando numa melhora no crescimento bacteriano no meio contendo a substância (ISHIKAWA *et al.*, 2010). SAKURAI *et al.* (2011) também verificaram a superexpressão de genes envolvidos na síntese de chaperonas corroborando com o resultado deste trabalho. Três ORFs que codificam glutathione S transferase foram reprimidas na presença do fluido do apoplasto. As ORFs *\_3291* e *\_3550* foram reprimidas na presença do apoplasto em comparação tanto ao meio diluído quanto ao meio completo e a ORF *\_3031* foi reprimida na presença do apoplasto somente em comparação ao meio diluído. Essas enzimas têm a capacidade de detoxificar compostos endobióticos e xenobióticos através da ligação covalente da glutathione a substratos hidrofóbicos (VUILLEUMIER & PAGNII, 2002). Esta repressão pode ser uma indicação de que não está ocorrendo estresse na bactéria por espécies reativas de oxigênio.



**Figura 18.** Genes induzidos no *operon* do genoma de Ppe8 pelo fluido do apoplasto em comparação ao meio diluído (MA) e meio completo (MM).

### Classe - Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular

Dois genes que codificam proteínas relacionadas ao sistema de secreção do tipo VI (T6SS) foram superexpressos na presença do fluido do apoplasto quando comparado ao tratamento diluído. Os genes *icmF1* e *hcp1* foram superexpressos na presença do apoplasto quando em contraste com o meio diluído porém não houve diferença para esses dois genes entre os tratamentos apoplasto e meio completo. O T6SS é um sistema de secreção *injectisome-like* envolvido no transporte ativo de moléculas do citossol bacteriano para as células (MARCHI *et al.*, 2013). T6SS está envolvida na patogenicidade animal de *Proteobacteria* como *P. aeruginosa*, *B. mallei*, *Vibrio cholerae* (MOUGOUS *et al.*, 2006; SCHELL *et al.*, 2007; MIYATA *et al.*, 2011) e poucos estudos focam no papel de T6SS na interação planta-bactéria (ROEST *et al.*, 1997; MATTINEN *et al.*, 2008 e MARCHI *et al.*, 2013). O interessante é que T6SS já foi encontrado em espécies de *Pseudomonas*, PGPRs (*Plant growth-promoting rhizobacteria* - rizobactérias promotoras de crescimento de plantas) (BOYER *et al.*, 2009; BARRET *et al.*, 2011; MARCHI *et al.*, 2013). Em relação à proteína Hcp1 ela é ativamente secretada por isolados clínicos de *P. aeruginosa* e pacientes com fibrose cística desenvolvem anticorpos contra Hcp demonstrando que o sistema é ativo durante a infecção (MONGOUS *et al.*, 2006). Além desse gene, o T6SS é composto também por *icmF1* que codifica homólogos de proteínas pertencentes ao T4SS (sistema de secreção do tipo IV) (SEXTON *et al.*, 2004). Esse sistema já foi encontrado em outras espécies de *Burkholderia* como *B. pseudomallei*, *B. cenocepacia*, *B. mallei* e *B. thailandensis* (SHALOM

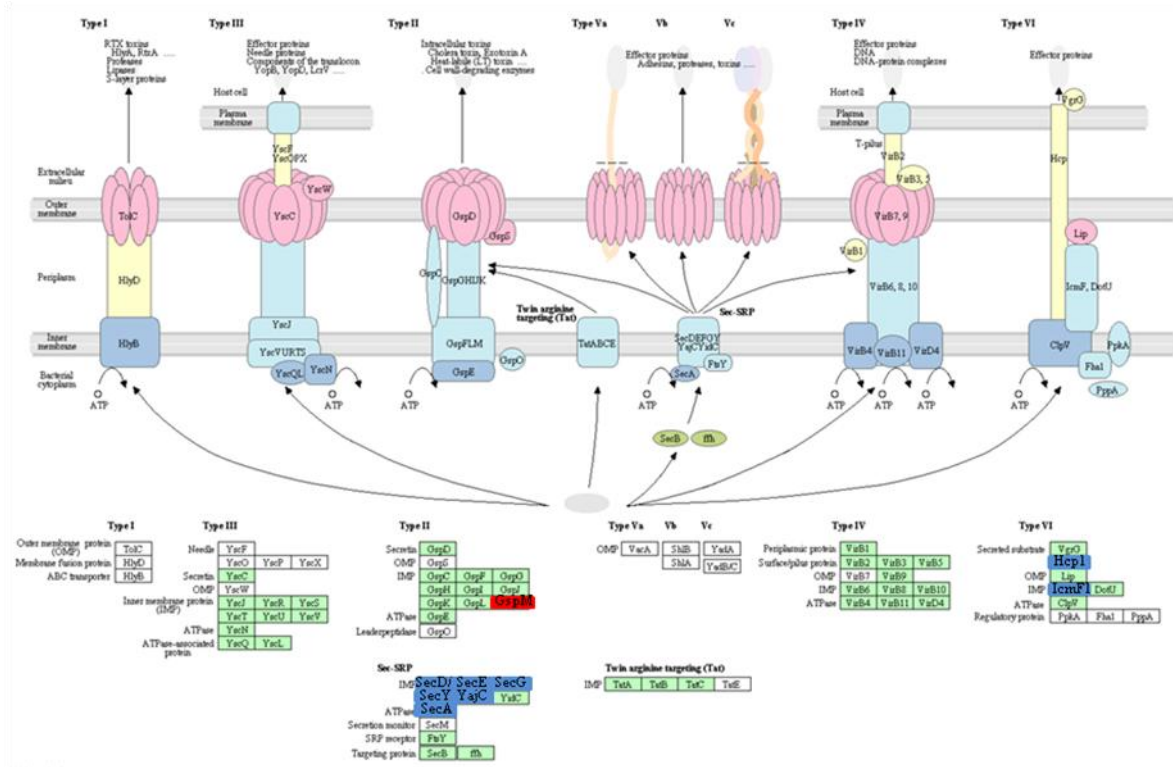


*et al.*, 2007; BURTNICK *et al.*, 2009; SCHWARZ *et al.*, 2010; ROSALES-REYES *et al.*, 2012 e CHIENG *et al.*, 2015). Genes envolvidos no T6SS foram induzidos em uma bactéria fitopatogênica, *Pectobacterium atrosepticum*, quando na presença de extratos de batata o que levaram os autores à conclusão de que os genes podem ter alguma função na interação com a planta (MATTINEN *et al.*, 2008). Em *Rhizobium leguminosarum* uma mutação no *locus* do sistema de secreção tipo VI incapacitou a estirpe de formar nódulos funcionais em ervilha afetando a infecção das plantas e a fixação de nitrogênio (BLADERGROEN *et al.*, 2003). Em *Agrobacterium tumefaciens* houve a expressão de Hcp, mas não houve sua secreção através de T6SS levando a sugestão que Hcp pode ter alguma função no interior de células bacterianas (WU *et al.*, 2008). Portanto, não se sabe exatamente a função dos genes T6SS neste caso, porém podem ter alguma função no interior de células de *B. tropica* ou mesmo na interação planta bactéria. Outra suposição é que, esses genes podem estar sendo transcritos e não traduzidos e que talvez o valor de expressão destes genes na presença do apoplasto como não apresentou diferença significativa na comparação ao meio completo talvez seja um valor basal e a bactéria em contato com o meio diluído (tratamento com a água), talvez por diluição dos componentes do meio, tenha reduzido a expressão desses genes no meio diluído (Figura 19).

Foi interessante observar que ORFs que codificam genes relacionados à montagem do *pillus* FLP foram reprimidas na presença do fluido do apoplasto, tanto na comparação do meio diluído (ORF\_5167 e ORF\_5168) quanto na comparação com o meio completo (ORF\_1815 e ORF\_4703). *Pillus* FLP são proteínas fimbriais de baixo peso molecular que constituem uma classe distinta de apêndices na bactéria (ANGELOV *et al.*, 2015). O *pillus* FLP pode ser necessário para adesão e formação de biofilme e pode ser essencial durante os passos iniciais de infecção (NYKYRI *et al.*, 2013). Mutantes de *Ralstonia solanacearum* defectivos na produção do *pillus* FLP foram capazes de colonizar plantas de batata, porém não causaram sintomas de murcha (WAIRUKI *et al.*, 2012). Estirpes mutantes *flp/tad* de *Pectobacterium* não foram capazes de desenvolver doença em plantas de batata, tendo sua capacidade restabelecida quando esses mutantes foram complementados (NYKYRI *et al.*, 2013). Esses resultados são mais um indicativo de que Ppe8 reprime a expressão desses genes pois provavelmente eles tenham a função ou estão associados com a indução de doença na planta. Além desses, ainda foram reprimidas na presença do fluido do apoplasto as ORFs que codificam sistema de secreção do tipo II (T2SS) e sistema de secreção do tipo IV (T4SS) (*gspM* e ORF\_4612, respectivamente). Proteínas de secreção que tem a capacidade de liberar efetores no hospedeiro podem ser usadas para suprimir as defesas da planta (JONES & DANGL, 2006). Por outro lado, efetores podem ser reconhecidos pelas plantas e levar a ativação da resposta imune (JONES & DANGL, 2006). Mutantes defectivos na produção do sistema de secreção do tipo III (T3SS) apresentaram uma maior colonização endofítica em plantas de *Arabidopsis* e trigo (INIGUEZ *et al.*, 2005). Os dados obtidos sugerem que a bactéria reprime a expressão desses genes quando em contato com o fluido do apoplasto de cana-de-açúcar, com o intuito de evitar que a planta ative seus mecanismos de defesa.

Embora *gspM* tenha tido sua expressão reprimida na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio diluído, houve também a indução de genes responsáveis por codificar *preprotein translocase* (*secY*, *secD*, *secF*, *secE*, *secA*, *secG* e *yajC*) na presença do fluido do apoplasto (Figura 19). Esses genes também foram induzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* em resposta a exsudatos de raízes de milho (FAN *et al.*, 2012). Essas proteínas são relacionadas ao T2SS (CECAGNO, 2013) e também estão presentes no genoma de *Nitrospirillum* (syn. *Azospirillum*) *amazonense* (CECAGNO, 2013). Vários genes relacionados ao T2SS foram superexpressos em *Azoarcus* cultivado em condições de fixação

de nitrogênio (SARKAR & REINHOLD-HUREK, 2014). Essas proteínas do sistema Sec transportam proteínas através da membrana plasmática e após, as proteínas tomam uma conformação competente no periplasma. Ao contrário do esperado, diversos genes que poderiam ativar as defesas da planta e também eliciar mecanismos de defesa foram induzidos na estirpe Ppe8, portanto, o papel desses genes na interação Ppe8-apoplasto de cana-de-açúcar permanece inconclusivo, contudo parece ter função importante na interação (Figura 24).



**Figura 19.** Proteínas constituintes dos sistemas de secreção bacteriano. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. O genes que estão em caixas de cores azul escuro e vermelho escuro indicam que foram induzidos e reprimidos por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio diluído respectivamente. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway.

### Classe - Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo

Foi possível verificar que o genoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 apresenta genes envolvidos no metabolismo de compostos aromáticos. No total, 27 genes foram diferencialmente expressos (Anexo 5). Dois genes, *pcaG* e *pcaH*, envolvidos no catabolismo de protocatecol foram encontrados super expressos na presença do apoplasto tanto em comparação com o meio diluído quanto no meio completo. O gene *pcaG* foi aumentado aproximadamente 660 e 42 vezes na presença do apoplasto em comparação com o meio diluído e meio completo, respectivamente. Já o gene *pcaH* foi aumentado cerca de 57 e 106 vezes em comparação ao meio diluído e meio completo respectivamente. Os genes *pcaH* e *pcaG* podem estar envolvidos na degradação de compostos presentes no apoplasto. O gene *pcaG* e outros envolvidos no metabolismo de compostos fenólicos também foram super expressos em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nos vasos do xilema de plantas de repolho indicando que pode estar envolvido na geração de precursores do ciclo do tricarboxilato para prover energia (BERNONVILLE *et al.*, 2014). TADRA-SFEIR *et al.*

(2015) também encontraram genes pertencentes a este metabolismo estando super expressos em *H. seropedicae* na presença de naringenina. As ORFS\_4594 (tolerância a tolueno), *paaB* (proteína de degradação ao ácido fenilacético) e ORF\_2800 (4-hydroxyphenilpyruvate dioxigenase) foram super expressos na presença de apoplasto em relação ao meio completo. SARKAR & REINHOLD-HUREK (2014) ao analisarem o transcriptoma de *Azoarcus* sob condição de fixação de nitrogênio, verificaram que genes envolvidos na degradação do ácido fenilacético estavam reprimidos. *Bradyrhizobium japonicum* inoculados em sementes de soja induziram genes envolvidos na degradação do ácido fenilacético, indicando que a bactéria pode utilizar flavonóides derivados da planta principalmente em condições de baixa concentração de oxigênio (LINDEMANN *et al.*, 2007). Nossa hipótese é que Ppe8 tem a capacidade de degradar diversos tipos de compostos aromáticos possivelmente presentes no fluido do apoplasto.

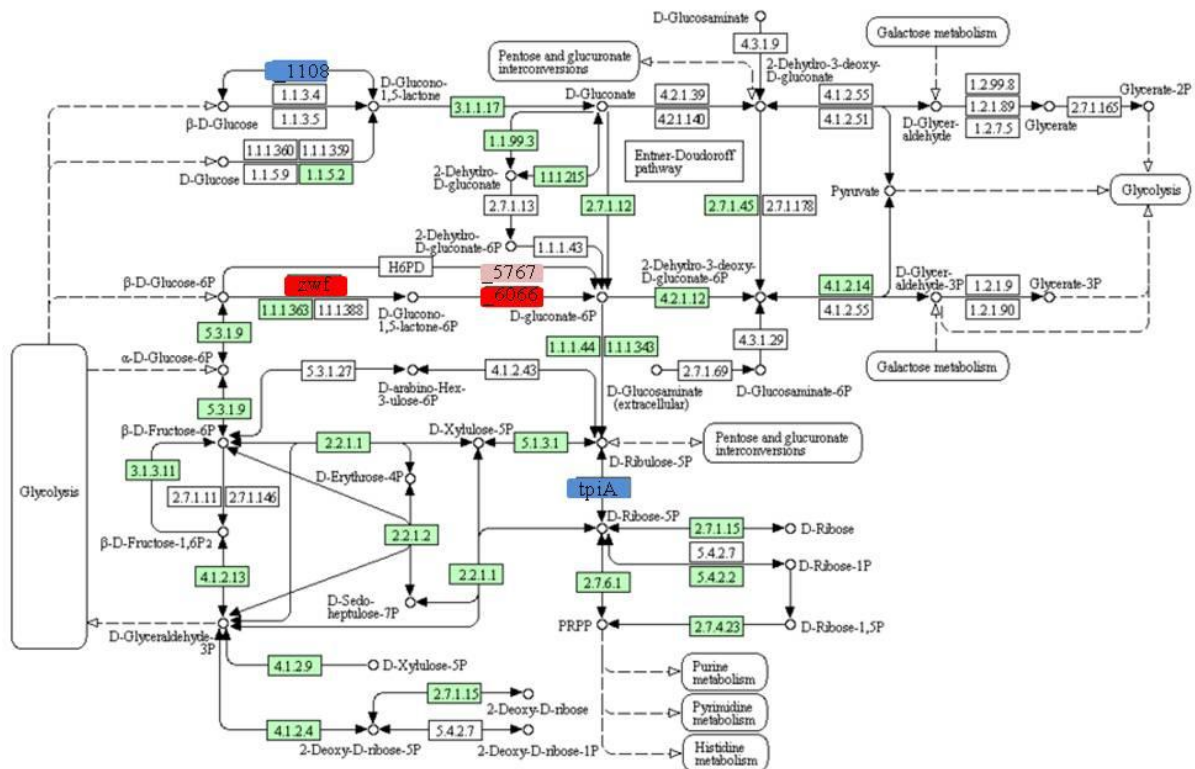
### **Classe - Metabolismo e transporte de aminoácidos, carboidratos, nucleotídeos, lipídeos e íons orgânicos e produção e conversão de energia**

O apoplasto induziu alguns genes envolvidos no metabolismo de carbono e nitrogênio sugerindo que a bactéria pode usar fonte de carbono e nitrogênio presentes no fluido do apoplasto. A *B. tropica* induziu a expressão de 58 genes e reprimiu 179 genes quando na presença do apoplasto em comparação ao meio completo. Já em relação ao meio diluído, a bactéria induziu 130 genes e reprimiu 214 genes na presença do apoplasto. Portanto, podemos verificar que o apoplasto pode modular o metabolismo da bactéria em função da presença de compostos.

SHIDORE *et al.* (2012) também verificaram um grande número de genes envolvidos na categoria de metabolismo e transporte de aminoácidos e conversão e produção de energia, quando a estirpe BH72 de *Azoarcus* sp. foi inoculada em arroz. Porém, verificaram que um maior número de genes foi expresso após uma hora de exposição quando comparado ao tempo de quatro horas, indicando que possivelmente o nível de indução é função da degradação de compostos presentes no meio. Evento similar pode estar acontecendo no presente trabalho, onde um maior número de genes foi reprimido após duas horas de contato com o apoplasto.

Vários genes pertencentes às classes de metabolismo e transporte de carboidratos tais como: ORF\_526, ORF\_7140 e ORF\_7142 (Sistema de transporte de açúcar do tipo ABC), ORF\_1108 (glicose desidrogenase), *tpiA* (triosefosfato isomerase), *gap* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase tipo I), *gpmA* (2,3-bifosfatoglicerato), *fbaA* (frutose-bifosfato aldolase), \_3485 (enolase) e *otsA* (trealose-fosfato sintase) foram induzidos na presença do apoplasto em comparação ao meio diluído. Já em comparação ao meio completo foram induzidos o gene *aepX* (fosfoenolpiruvato mutase) e as ORFs ORF\_526 e ORF\_7140 (Sistema de transporte de açúcar do tipo ABC), ORF\_1108 (glicose desidrogenase). Os genes *gap*, *gpmA*, *aepX* e *fbaA* e a ORF \_3485 codificam produtos que participam da via glicolítica mais precisamente da segunda parte, compensação, que gera no final do ciclo as duas moléculas de piruvato e o ATP. Já o gene *tpiA* e a ORF \_1108 codificam produtos que participam da via oxidativa da pentose fosfato (Figura 20).

## Via metabólica da Pentose Fosfato

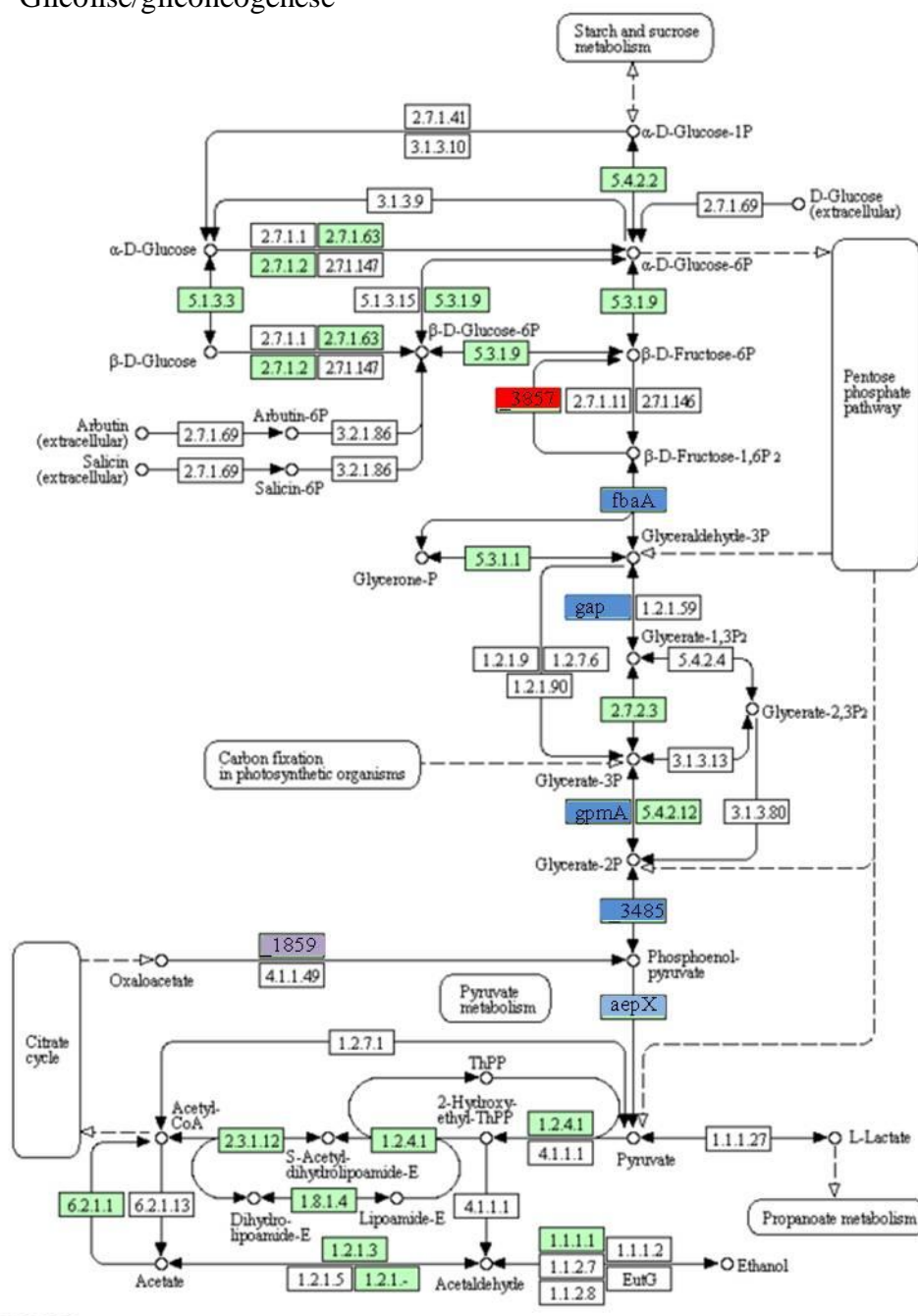


**Figura 20.** Via metabólica da pentose-fosfato. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cores azul escuro indicam que foram induzidos por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio diluído, os genes que estão em caixas em cores vermelho escuro e vermelho claro indicam que foram reprimidos no genoma de Ppe8 na presença do fluido apoplasto em comparação ao meio diluído e meio completo, respectivamente. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway.

Contudo, houve uma forte repressão de genes pertencentes a esta classe. Dos 88 genes reprimidos na presença do apoplasto em ambas as condições, 37 são transportadores de açúcar do tipo ABC. TADRA-SFEIR *et al.* (2015) também encontraram genes que codificam transportadores do tipo ABC reprimidos na presença de naringenina. Dentre outros genes reprimidos em comparação ao meio diluído estão ORF\_3857 (frutose-1,6-bifosfato aldolase) que codifica uma proteína do último passo da primeira fase da via glicolítica, que leva a gasto de ATP, ORF\_4930 e ORF\_6685 (trealose-6-fosfato sintase) que codifica uma proteína que é formada a partir de uma molécula de glicose com uma molécula de glicose-6-fosfato, ORF\_5129, ORF\_741 e ORF\_7496 (manose-6-fosfato isomerase) que codifica uma proteína que catalisa a conversão de frutose-6-fosfato em manose-6-fosfato podendo posteriormente participar na biossíntese de polissacarídeo capsular, *zwf* (glicose-6-fosfato-1-dehidrogenase), ORF\_6066 (glucololactonase), essas duas são enzimas chaves na conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfoglicerato na via da pentose fosfato, *glgA*, *glgB*, *glgC* e *glgX* que são genes que participam da biossíntese do glicogênio, *treS*, *treY* e *treZ* que são enzimas importantes na biossíntese de trealose.

Já em comparação ao meio completo, a presença do apoplasto reprimiu as ORFs pertencentes a via glicolítica, tais como ORF\_5129 e ORF\_741 (manose-6-fosfato isomerase) e ORF\_5767 (gluconolactonase). Foi possível perceber então que vias alternativas no uso de subprodutos da via glicolítica foram reprimidas (produção de glicogênio, manose e trealose), indicando que *B. tropica* na presença do apoplasto pode investir na via glicolítica como forma de geração de energia (ATP) (Figura 21). Porém, reprimiu enzimas iniciais da conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfoglicerato da via oxidativa da pentose fosfato indicando redução em produção de nucleotídeos e coenzima no momento da coleta (2 horas após indução om apoplasto).

## Glicólise/gliconeogênese



**Figura 21.** Via metabólica glicolítica. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de *Burkholderia* endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cores azul escuro e vermelho escuro indicam que foram induzidos e reprimidos respectivamente no apoplasto em comparação ao meio diluído e o gene em caixa roxa escura indica que foi reprimido no apoplasto tanto em comparação ao meio diluído quanto no meio completo. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway.

É importante salientar que *B. tropica* estirpe Ppe8 não apresentou genes diferencialmente expressos relacionados ao metabolismo de sacarose, que é o açúcar em

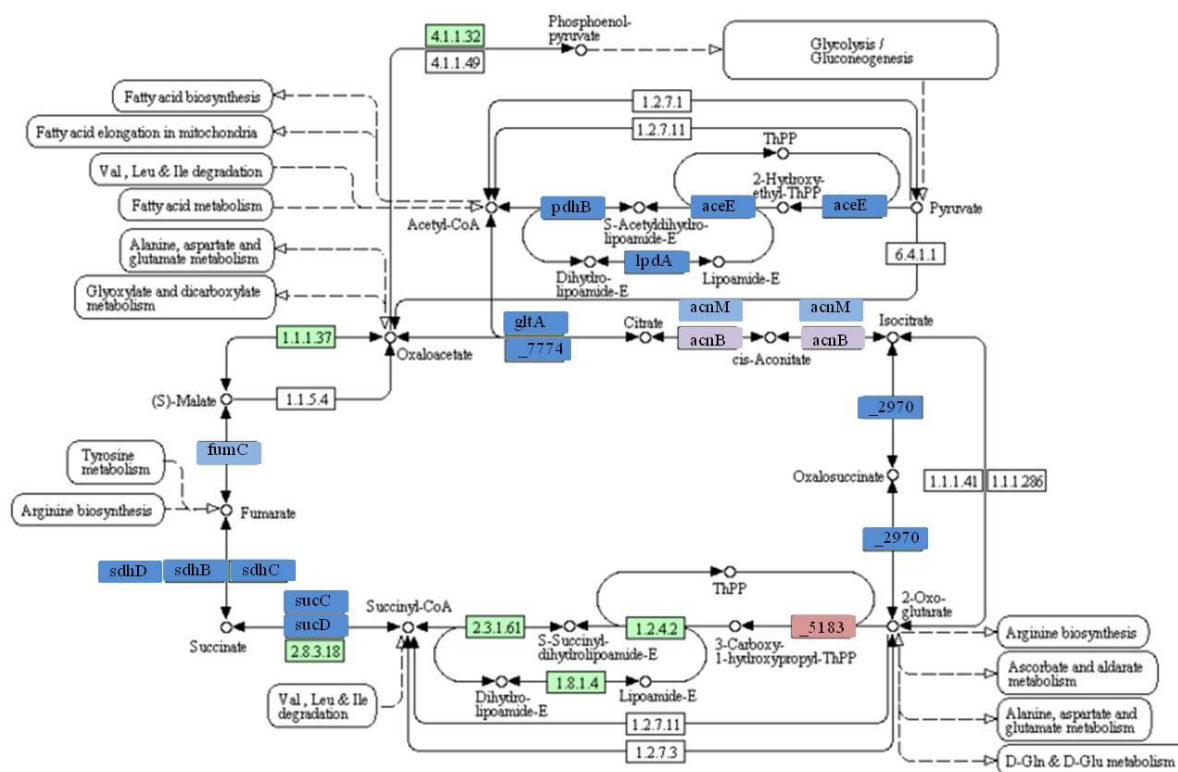
maior quantidade no apoplasto (ASSIS JÚNIOR *et al.*, 2004). Isto se deve ao fato de que todos os tratamentos apresentavam inicialmente 0,5% de sacarose de açúcar residual em sua composição, ou seja, o meio completo foi composto de 0,5 % de açúcar residual + 50 ml com 0,5% de sacarose, já o meio diluído foi composto de 0,5% de açúcar residual + 50 ml de água e o apoplasto de 0,5% de açúcar residual + 50 ml de apoplasto com 0,5% de sacarose (aproximadamente 11 g.L<sup>-1</sup> de sacarose - dados não publicados - TERRA, 2015).

Outro aspecto interessante foi que o líquido do apoplasto reprimiu a expressão de ORFs que codificam sistemas de transporte de xilose do tipo ABC (*xylF*), efluxo de permeases de arabinose (ORF\_2418, ORF\_5560, ORF\_5718 e ORF\_626) e componentes permeases do sistema de transporte do tipo ABC de ribose/xilose/arabinose/galactosidase (ORF\_1207, ORF\_4480 e ORF\_4883) em comparação ao meio diluído. Contudo também reprimiu em comparação ao meio completo o gene *xylF*, as ORFs que codificam efluxo permeases de arabinose (ORF\_175, ORF\_3318, ORF\_4607, ORF\_5150, ORF\_7147 e ORF\_7618), componentes permeases do sistema de transporte do tipo ABC de ribose/xylose/arabinose/galactosidase (ORF\_1644, ORF\_1092, ORF\_3095, e ORF\_4883) e genes para proteínas da via de dissimilação de fucose (ORF\_1087). Em plantas, arabinose e xilose são açúcares abundantes e componentes de parede celular (BURGET *et al.*, 2003; DESAI & RAO, 2009). Segundo SOUZA *et al.* (2012), glicose e xilose são os principais monossacarídeos presentes na parede celular de cana-de-açúcar, representando aproximadamente 60% e 34% respectivamente, além de células do colmo também conter fucose, galactose, arabinose, manose e ramnose em menores proporções. Isto pode significar, portanto, que a bactéria possa reprimir genes relacionados ao metabolismo desse açúcar na presença do fluido do apoplasto e não degrade os componentes de parede celular que circundam o apoplasto e, com isso, não se tornar fitopatogênica. A bactéria fitopatogênica *B. glumae* induziu a expressão desses genes no interior dos tecidos de arroz, pois fitopatógenos podem metabolizar esses monossacarídeos oriundos da degradação de polímeros da parede celular durante o crescimento da planta (KIM *et al.*, 2014). Arabinose e fucose podem induzir genes de virulência em *Agrobacterium tumefaciens* (CANGELOSI *et al.*, 1990).

A *Burkholderia tropica* estirpe PPe8 também expressou diferencialmente os genes pertencentes à classe de conversão e produção de energia na presença do apoplasto. Foram reprimidos 71 e 41 genes na presença do apoplasto em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente, e induzidos 41 e 18 genes em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente. Dentre os genes induzidos na presença do apoplasto podemos citar *lpdA*, *pdhB* e *aceE* (piruvato desidrogenase), *acnB* (aconitases), *gltA* (citrato sintase), ORF\_2970 (isocitrato desidrogenase), *sucC* e *sucD* (succinato-CoA ligase), *sdhB*, *sdhA* e *sdhD* (succinato desidrogenase), em comparação ao meio diluído (Figura 22). Já em relação ao meio completo, o apoplasto induziu os genes *acnM* e *acnB* (aconitases), *fumC* (fumarase) pertencendo ao ciclo do ácido cítrico que gera NADH para fosforilação oxidativa.



## Ciclo do citrato (Ciclo TCA)



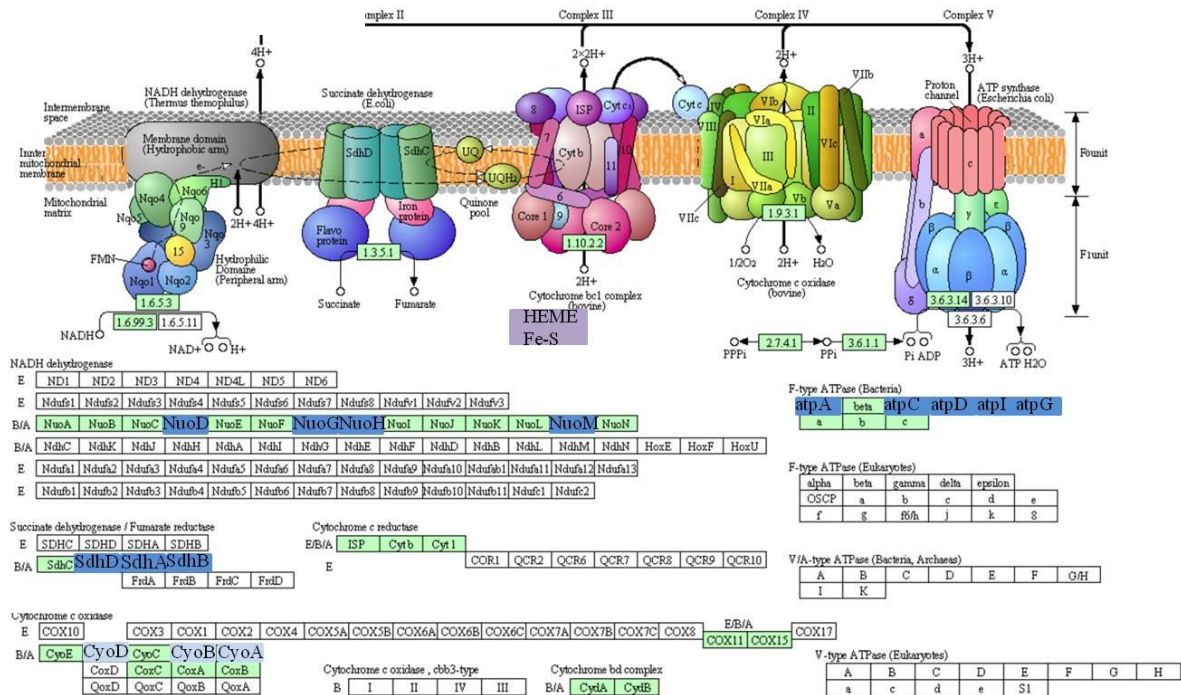
**Figura 22.** Via metabólica do ácido cítrico. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cores azul escuro e azul claro indicam que foram induzidos por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio diluído e no meio completo respectivamente, o gene em caixa roxo clara indica que foi induzido por Ppe8 no apoplasto tanto em comparação ao meio diluído quando no meio completo e o gene em caixa vermelha clara indica que foi reprimido por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio completo. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway.

Foi verificado também que o cultivo de *B. tropica* no meio com líquido do apoplasto induziu a expressão de vários genes envolvidos em vias metabólicas centrais bem como genes que codificam subunidades do complexo I de NADH Dehidrogenase (*nuoD*, *nuoG*, *nuoH* e *nuoM*), o primeiro componente da cadeia respiratória de elétrons, em comparação ao meio diluído. Isto indica uma forte ativação do metabolismo da respiração aeróbica fornecendo às células a energia necessária para um aumento da replicação bacteriana. CIRAULO *et al.* (2010) analisaram o transcriptoma da bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa* sob condições químicas baseadas no xilema (meio 3G10R) e verificaram também a indução dos genes citados acima. Em *P. syringae* pv. *phaseolicola* estirpe 1448A, quatro genes (*nuoE*, *nuoF*, *nuoG* e *nuoH*) foram induzidos em um operon composto por 13 genes, quando a bactéria foi cultivada na presença do fluido do apoplasto de feijão (HENÁNDEZ-MORALES *et al.*, 2009). Pertencentes também à via de fosforilação oxidativa, encontramos também induzidos na presença do apoplasto em comparação ao meio diluído, os genes *cyoA*, *cyoB1*, *cyoB*, *cyoC1*, *cyoC* e *cyoD* (citocromo o ubiquinol oxidase), *atpA*, *atpD*, *atpH*, *atpC*, *atpG*, *atpI* (ATP sintase). No processo de respiração celular, bactérias aeróbicas transferem elétrons de



substâncias oxidáveis para o oxigênio molecular via cadeia transportadora de elétrons. Essa liberação de energia é necessária para a produção de ATP por meio da fosforilação do ADP. SHEIBANI-TEZERJI *et al.* (2015) também encontraram genes pertencentes a fosforilação oxidativa sendo super expressos em *B. phytofirmans* inoculada em batata, porém relacionam esta indução à condição de estresse à seca à qual as plantas foram submetidas, o que não foi o caso deste trabalho (Figura 23).

## Fosforilação oxidativa



**Figura 23.** Via metabólica da fosforilação oxidativa. O conjunto de genes presentes no genoma de *B. phytofirmans* está representado em caixa de cor verde. Este genoma é um dos mais próximos filogeneticamente dentre as espécies de Burkholderias endofíticas de plantas e que está publicado. Os genes que estão em caixas de cores azul escuro e azul claro indicam que foram induzidos por Ppe8 no apoplasto em comparação ao meio diluído e meio completo respectivamente e os genes marcados em roxo escuro foram reprimidos no apoplasto em ambas as condições. Fonte: Adaptado de KEGG Pathway.

Com relação aos genes superexpressos pela presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio completo, podemos citar também *cyoA*, *cyoB1*, *cyoC1*, *cyoD* (citocromo o ubiquinol oxidase) e *narG*, *narH* e *narJ* (nitrito redutase). É importante salientar que a bactéria cresce ativamente na presença do fluido do apoplasto de cana-de-açúcar a 50% utilizando-o em seu metabolismo componentes nele presente para suprir sua demanda energética. TEJERA *et al.* (2006) verificaram que o aconitato predomina sobre os demais ácidos orgânicos presentes no apoplasto, e portanto a indução de genes que codificam aconitases no ciclo do ácido cítrico, indicam que a bactéria utiliza o ácido orgânico.

Contudo, diversos genes desta classe foram também bastante reprimidos na presença do fluido do apoplasto. Destacamos os genes que fazem parte do complexo III da fosforilação oxidativa, a qual é composta de dois grupos prostéricos (Heme e Fe-S), citocromo B e citocromo C que formam o complexo BC. Basicamente este complexo transfere elétrons da

ubiquinona reduzida até o citocromo C no espaço intermembrana, gerando prótons neste local. Este citocromo C, na etapa final, carrega elétrons até o oxigênio molecular gerando água. Contudo, o complexo I (NADH a ubiquinona), o complexo II (succinato a ubiquinona) e o complexo IV (citocromo C para O<sub>2</sub>) foram ativados na presença do apoplasto, indicando que em algum momento o complexo III possa ser ativo, gerando ATP. Porém, isto também pode ser um artefato bacteriano para reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio que podem ocorrer na etapa final. Outros genes importantes reprimidos são os genes que participam do complexo piruvato-desidrogenase. Este complexo remove um grupo carboxil do piruvato e os dois carbonos remanescentes são convertidos ao grupo acetil da acetil-coA. Este complexo requer a presença de cinco grupos prostéticos, dentre eles encontra-se NAD (nicotinamida-adenina), a qual também foi reprimida na presença do fluido do apoplasto. Já na presença do apoplasto em comparação ao meio diluído, dois genes (*lpdA* e *pdhB*) que codificam o complexo piruvato-desidrogenase foram induzidos, indicando que a transcrição desses dois genes seja suficiente para que os demais passos do ciclo do ácido cítrico ocorram, como verificamos com a indução de outros intermediários do ciclo.

*Burkholderia tropica* cultivada na presença do fluido apoplástico também expressou diferencialmente genes da classe metabolismo e transporte de aminoácidos. A bactéria induziu 31 e 15 genes na presença do apoplasto em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente, contudo, também reprimiu 34 e 59 genes na presença do fluido apoplasto em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente (Anexo 5). Dentre os genes induzidos, verificamos *glt1* (glutamato sintase), *hutH* (histidina amônia-liase), *aroE* (shiquimato 5-dehidrogenase), *argB* (acetilglutamato quinase), *aspB* (aspartato/tirosina/aromático aminotransferase), *opucA* (sistema de transporte prolina/glicina betaína), *thrA* (homoserina desidrogenase), *metH* (metionina sintase I), *thrC* (treonina sintase), *gcvP* (glicina desidrogenase), *gcvT* (glicina clivagem do sistema T proteína), ORF\_7463 (efluxo de treonina), ORF\_7488 (biodegradativo arginina decarboxilase), dentre outros. O apoplasto das variedades NCo310, RD 75-11 e PR 60-170 de cana-de-açúcar cultivada em Cuba apresenta os aminoácidos serina, prolina, alanina e ácido aspártico em sua grande maioria (cerca de 60% do conteúdo), e ácido glutâmico, tirosina, cisteína, metionina, glicina e lisina também fazem parte da composição do apoplasto, porém em concentrações menores e variando com a variedade utilizada e manejo (adubação) (TEJERA *et al.*, 2006). Foi verificada, portanto, a indução da expressão de genes envolvidos com o metabolismo dos aminoácidos presentes no fluido do apoplasto indicando que a bactéria é capaz de degradar esses aminoácidos. Além disso, compostos aromáticos provenientes de plantas podem ser usados como fonte de carbono por bactérias rizosféricas (RAMACHANDRAN *et al.*, 2011). É importante verificar que dois importantes genes foram citados pertencentes ao metabolismo do nitrogênio, histidina amônia-liase (*hutH*) e glutamato sintase (*glt1*). O gene *hutH* codifica uma amônia-liase que catalisa o primeiro passo da degradação da histidina para produzir ácido urocânico. E *glt1*, catalisa a síntese de glutamato por transferência redutiva do grupo amida da glutamina para a posição 2 do 2-oxoglutarato formando duas moléculas de glutamato. Tanto a amônia quanto o ácido urocânico são incorporados no metabolismo do glutamato sugerindo que esta via esteja ativa quando a bactéria é exposta ao fluido do apoplasto. HERNÁNDEZ-MORALES *et al.* (2009), também encontraram os genes de nitrato redutase e amônia-liase induzidas por *P. syringae* na presença do fluido do apoplasto de plantas de feijão.

Em contrapartida, o apoplasto também reprimiu genes envolvidos nesta classe. Dos 59 genes que foram reprimidos na presença do fluido apoplasto em comparação ao meio completo, 35 são transportadores do tipo ABC (Anexo 5). Transportadores do tipo ABC representam uma grande superfamília de transporte ativo de proteínas de membrana

apresentando um domínio conservado (ATPase) que se liga e hidrolisa ATP, para a entrada de vários nutrientes e extrusão de drogas e resíduos de metabólitos (NICOLÁS *et al.*, 2007). TADRA-SFEIR *et al.* (2015) também encontraram genes que codificam transportadores do tipo ABC estando reprimidos na presença de naringenina. Essa repressão pode ser um artefato da bactéria para economizar energia visto que o metabolismo dela está bastante ativo (indução de genes envolvidos na classe de tradução, proteínas ribossomais e biogênese). Outra hipótese é que esses transportadores em algum momento estavam ativos e com o intuito de redução no gasto energético, após a entrada de aminoácidos possíveis de serem metabolizados pela bactéria, a Ppe8 reprimiu a expressão deles (Figura 24). O fluido do apoplasto não induziu a expressão da ORF\_7498 que codifica uma glutamina sintetase (GS) sugerindo que provavelmente o amônio, seu principal inibidor, estivesse em quantidades relativamente maiores quando comparado ao meio diluído e ao meio completo. CORDEIRO *et al.* (2013) também verificaram a GS reprimida em *H. seropedicae* pela quantidade de amônio presente no meio de cultura.

*Burkholderia tropica* também regulou diferencialmente genes na presença do fluido do apoplasto, pertencentes ao metabolismo e transporte de nucleotídeos. No total, foram reprimidos 11 e 5 genes na presença do apoplasto em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente, contudo, foram induzidos 9 e 2 genes na presença do fluido do apoplasto em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente. Dentre os genes induzidos, podemos citar o *purB* (adenilosuccinato liase), *pyrG* (CTP sintase), *guaA* (GMP sintase), em comparação ao meio diluído e ORF\_7541 (nucleosídeo fosforilase) em comparação a ambos os tratamentos. E também reprimiu outros como ORF\_7070 (adenosina deaminase), ORF\_7118 (purina-citosina permease) em comparação ao meio diluído e ORF\_6981 (timidilato sintase) em comparação a ambos os tratamentos.

Outra classe influenciada pelo apoplasto foi a classe de metabolismo e transporte de lipídeos. *B. tropica* reprimiu 20 e 15 genes na presença do fluido do apoplasto em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente, e induziu 10 e 5 genes em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente (Anexo 5). Dentre os genes induzidos, estão os que codificam acetil-CoA (ORF\_3429 e ORF\_5790), acil-CoA desidrogenase (ORF\_2584 e ORF\_2585) em comparação ao tratamento diluído. Já em comparação ao tratamento com o meio completo, *B. tropica* induziu na presença do apoplasto um gene que codifica acil-CoA desidrogenase (ORF\_2585), acil-coenzima A (ORF\_3873), enoil-CoA hidratase (ORF\_4514), dentre outros. Verificamos que o fluido do apoplasto interferiu mais na repressão do que na indução dessa classe de genes. Na presença do fluido do apoplasto verificamos também ORFs que codificam acetil-CoA acetiltransferase (ORF\_7661), acil-CoA desidrogenases (ORF\_3402, ORF\_7014 e ORF\_917), enoil-CoA hidratase (ORF\_2356, ORF\_4514 e ORF\_4948) dentre outras em comparação ao meio diluído, reprimidas. Já em comparação ao meio completo, verificamos a repressão das ORFs que codificam enoil-CoA hidratase (ORF\_1685, ORF\_4948, ORF\_5685), acetil-CoA (ORF\_2357, ORF\_5010, ORF\_876), acil-CoA desidrogenases (ORF\_2984, ORF\_4490, ORF\_665) reprimidas.

Com relação ao metabolismo e transporte de íons inorgânicos *B. tropica* reprimiu 16 e 14 genes na presença do apoplasto em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente, e induziu 8 e 6 genes em comparação aos meios diluído e puro, respectivamente (Anexo 5). Foram verificadas principalmente três ORFs sendo induzidas na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio diluído, as que codificam basicamente transportadores de ferro (*feoB*, *tonB* e ORF\_1345). Em contrapartida foram reprimidas nessa mesma comparação as ORFs que codificam transportadores do tipo symporter de Na<sup>+</sup> (ORF\_4056 e ORF\_862), transportadores de Mg<sup>2+</sup> e Co<sup>2+</sup> (ORF\_4879), bacterioferritina (ORF\_3560 e *bfr*), catalase

(ORF\_2861 e ORF\_974). Bacterioferritina participa da homeostase do ferro, regulando seus níveis na célula da bactéria. É possível que a bactéria esteja assimilando absorvendo ferro, uma vez que transportadores estão ativos, pois faz parte de inúmeros componentes celulares como a proteínas Fe-S. Ao contrário do apresentado aqui, *B. phytofirmans* induziu em seu transcriptoma, genes que codificam homeostase do ferro quando plantas de batata foram crescidas em condições de estresse (seca), indicando possivelmente que esta proteína pode ter algum efeito na tentativa de minimizar o estresse (SHEIBANI-TEZERJI *et al.*, 2015). Já quando se comparou com o tratamento com meio completo, o fluido do apoplasto induziu a expressão das ORFs que codificam proteínas envolvidas no transporte de ferro (*tonB* e ORF\_1345) e permease de fosfato/sulfato (ORF\_2802) e reprimiu as ORFs que codificam os genes tipo simporter de Na<sup>+</sup> (ORF\_862), transportador de nitrato/nitrito (ORF\_7431) dentre outros indicando que a composição do fluido do apoplasto pode influenciar a modulação de genes pela bactéria. Catalases normalmente são responsáveis pela detoxificação de espécies reativas de oxigênio produzidas em função do metabolismo aeróbico, ou presença de ferro e/ou moléculas tóxicas nos extratos de plantas (KLOTZ & HUTCHESON, 1992; ANDREWS *et al.*, 2003). Algumas moléculas como metais, açúcares e oligossacarídeos empregam *tonB* para seu transporte pela membrana externa (SCHAUER *et al.*, 2008), portanto, isso pode explicar também a indução desse gene no fluido do apoplasto. Algumas bacterioferritinas podem auxiliar na proteção contra espécies reativas de oxigênio (HERNÁNDEZ-MORALES *et al.*, 2009). HERNÁNDEZ-MORALES *et al.* (2009) verificaram genes envolvidos na via de fosforilação oxidativa, bacterioferritinas e catalases estando induzidos em *Pseudomonas syringae* na presença de extratos de feijão e concluíram que em função da cadeia respiratória ativada, genes relacionados a detoxificação também estavam ativos. Nossos resultados mostram que tanto genes que codificam catalases, quanto genes que codificam bacterioferritinas foram reprimidos na presença do fluido do apoplasto em comparação ao meio diluído, indicando que o apoplasto não induz a produção de espécies reativas de oxigênio e, portanto, reduz danos relacionados ao estresse oxidativo. Embora, como já visto, a cadeia transportadora de elétrons esteja ativada na presença do apoplasto, talvez não seja o suficiente para causar um estresse oxidativo e consequentemente ativar genes envolvidos em detoxificação (Figura 24).

### **Classe - Tradução, estrutura ribossomal e biogênese**

A classe de tradução, estrutura ribossomal e biogênese foi fortemente induzida na presença do fluido do apoplasto quando comparado a ambos os tratamentos (com meio completo e com água). No total, 75 genes foram induzidos na presença do fluido do apoplasto onde cerca de 41 genes são responsáveis por codificar proteínas ribossomais. Isto pode indicar que o apoplasto afeta o crescimento de *B. tropica* e também corrobora com o metabolismo ativo da bactéria no momento de coleta das células (fase exponencial), indicando alta atividade metabólica. Em *Escherichia coli* cultivada em condições de limitação de fósforo, foi verificada que proteínas ribossomais foram reprimidas o que pode ter sido também por uma taxa de crescimento mais lento nessa condição (BAEK & LEE, 2007). É sabido que proteínas pertencentes ao metabolismo de aminoácidos e tradução, proteínas ribossomais e biogênese são reprimidas na fase estacionária de bactérias (OH *et al.*, 2006). O mesmo foi verificado no transcriptoma de *P. fluorescens* cultivada em condições limitantes de ferro (LIM *et al.*, 2012). Em *Azoarcus* cultivado em condições de fixação de nitrogênio, genes pertencentes a esta classe também foram fortemente reprimidos, o que reflete uma taxa de crescimento menor (SARKAR & REINHOLD-HUREK, 2014). Portanto, esse resultado confirma que a bactéria

estava com atividade metabólica elevada o que pode ser em função da resposta ao fluido do apoplasto aliado à condição fisiológica em que a mesma foi coletada (fase exponencial).

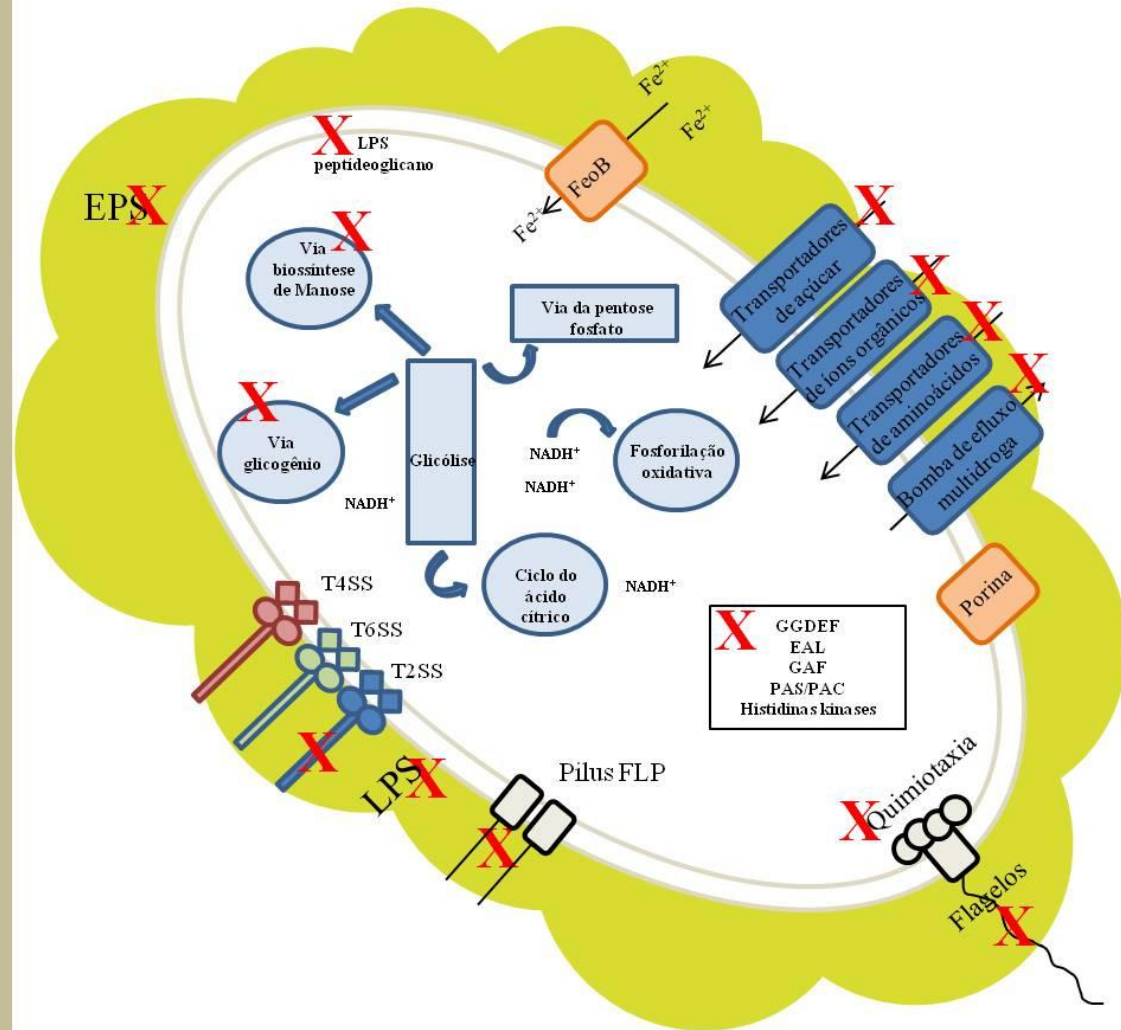
### **Classe - Mecanismos de defesa**

Interessantemente, genes relacionados à classe mecanismo de defesa foram pouco expressos, podendo indicar que essa classe de genes apresenta um papel menor na vida endofítica de *B. tropica* estirpe Ppe8. Uma explicação para isso é que o interior de plantas é um nicho onde bactérias escapam de uma alta pressão de competição comparado à rizosfera e solo, além do mais, o apoplasto utilizado foi esterilizado por filtração, eliminando, dessa forma, a possibilidade de competição com outros microrganismos que talvez poderiam estar presentes. Plantas de batata cultivadas por cultura de tecidos, livre de qualquer microrganismo, foi inoculada com *B. phytofirmans* e a bactéria não apresentou também genes diferencialmente expressos pertencentes a esta classe (SHEIBANI-TEZERJI *et al.*, 2015).

### **Outras classes de genes**

Outras classes também apresentaram genes diferencialmente expressos na presença do fluido do apoplasto como dinâmica e estrutura da cromatina (um gene sendo reprimido na presença do apoplasto em comparação ao meio completo), controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo (seis genes sendo reprimidos na presença do apoplasto em comparação ao meio completo e seis e três genes sendo reprimidos e induzidos respectivamente em comparação ao meio diluído). Dentre esses genes é importante destacar que o gene *mreB* foi induzido na presença do apoplasto em comparação ao meio diluído. Esse gene codifica uma proteína que constitui um homólogo de actina que é essencial para a segregação do cromossomo, manutenção da forma da célula, localização polar de várias proteínas bacterianas, montagem do peptidoglicano e motilidade (GITAI *et al.*, 2005; KRUSE *et al.*, 2005; DIVAKARUNI *et al.*, 2007). Essa proteína foi expressa exclusivamente em *H. seropedicae* cultivada na presença de extrato de cana-de-açúcar (CORDEIRO *et al.*, 2013). A mesma está envolvida provavelmente na interação entre bactéria e o hospedeiro, pois em *A. brasilense* um mutante *mreB* apresentou morfologia e superfície celular alterada (BIONDI *et al.*, 2004), sugerindo que é um gene importante na manutenção da forma da célula e portanto pode ter um papel na interação com a planta. Os genes de outras classes estão caracterizados no Anexo 5.

## Apoplasto



**Figura 24.** Modelo com as principais classes diferencialmente expressas por Ppe8 na presença do fluido do apoplasto. Classes com a letra "x" em vermelho indicam que foram reprimidas na presença do apoplasto e classes sem a letra "x" indicam que foram induzidas na presença do apoplasto.

## 5.6. CONCLUSÕES

- ✓ Apresentamos uma visão ampla e compreensiva do transcriptoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 cultivada na presença do apoplasto;
- ✓ Genes que poderiam ativar as respostas de defesa da cana-de-açúcar foram reprimidos indicando o reconhecimento do apoplasto pela bactéria;
- ✓ O metabolismo de Ppe8 mostrou-se bastante ativo pela indução de genes pertencentes às classes de metabolismo e transporte e indução de proteínas ribossomais;
- ✓ Não verificaram-se genes pertencentes ao metabolismo de sacarose provavelmente em função do açúcar estar presente nos três tratamentos;
- ✓ Este é um resultado pioneiro no estudo da interação entre *B. tropica* estirpe Ppe8 e o apoplasto de cana e que poderá apoiar a biotecnologia agrícola através da otimização do processo da FBN em plantas de cana de açúcar.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos sugerem que a expressão de genes em diversas condições é bastante complexa e envolve inúmeros genes cujas funções ainda não foram caracterizadas, podendo estar relacionada à interação bactéria-planta. Além disso, foi verificada a expressão diferencial de genes importantes do genoma de *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 na presença do fluido do apoplasto que estão relacionados provavelmente com o reconhecimento da bactéria. Esses genes participam principalmente da biossíntese de EPS, LPS e peptídeoglicano, os quais foram reprimidos pois provavelmente podem elicitar as respostas de defesa da planta, podendo ser uma estratégia de fuga para a bactéria. Outros genes importantes na interação são genes relacionados à quimiotaxia e montagem flagelar, bem como mecanismos de percepção de sinais que governam o movimento bacteriano. Esses genes também foram reprimidos na presença do fluido apoplasto indicando que a bactéria não se move em busca de um gradiente de nutrientes e também como forma de não ativar as respostas de defesa da planta pois existem regiões flagelares que podem ativar essa defesa. Além desses genes, foram identificados muitos outros também relacionados ao metabolismo bacteriano.

Portanto, verificou-se que Ppe8 responde ativamente ao fluido do apoplasto de cana-de-açúcar da variedade RB867515 que já é conhecida por ser uma variedade responsiva à FBN. Seria interessante verificar o padrão de resposta de Ppe8 na presença de outras variedades de cana-de-açúcar, além de coletas ao longo do tempo a fim de se conhecer o comportamento da expressão dos genes. Além disso, este trabalho foi importante na seleção de genes de referência que poderão ser usados em estudos de validação do transcriptoma de Ppe8 em diferentes fontes de carbono, auxiliando no conhecimento da expressão gênica desta bactéria.

Este é um trabalho pioneiro e que servirá de base para futuras pesquisas no campo da genômica funcional de Ppe8 em resposta à presença de compostos ou extratos de diferentes variedades de cana-de-açúcar.



## 6.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; BARAKAT, M.; MARTEL, M.; HEULIN, T. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p.787-794, 1999.
- AFZAL, A.J.; WOOD, A.J.; LIGHTFOOT, D.A. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.21, p.507-517, 2008.
- AIZAWA, T.; VE, N.B.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, p.1152-1157, 2010.
- AIZAWA, T.; VIJARNSORN, P.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acid-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.61, p.1645-1650, 2011.
- ALEGRIA, M.C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.H.I.; SILVA, A.C.R.; FARAH, C.S. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar *citri*. *Journal of Bacteriology*, v.186, p.6186-6197, 2004.
- ANDREWS, S.C.; ROBINSON, A.K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, v.27, p.215-237, 2003.
- ANGELOV, A.; BERGEN, P.; NADLER, F.; HORNBURG, P.; LICHEV, A.; ÜBELACKER, M.; PACHL, F.; KUSTER, B.; LIEBL, W. Novel Flp pilus biogenesis-dependent natural transformation. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.84, 2015.
- ASSIS JÚNIOR, A.; KATSUKI, A.; AKAO, S. N<sub>2</sub> fixation in sugarcane and population of N<sub>2</sub>-fixing endophytes in stem apoplast solution. *Philippine Journal of Crop Science*, v.29, p.45-58, 2004.
- BAEK, J.; LEE, S. Transcriptome analysis of phosphate starvation response in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.17, p.244-252, 2007.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, v.384, p.413-431, 2014.
- BALSANELLI, E.; SERRATO, R.V.; DE BAURA, V.A.; SASSAKI, G.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; DE SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environmental Microbiology*, v.12, p.2233-2244, 2010.
- BARRET, M.; EGAN, F.; FARGIER, E.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. Genomic analysis of the type VI secretion systems in *Pseudomonas* spp.: novel clusters and putative effectors uncovered. *Microbiology*, v.157, p.1726-1739, 2011.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G; de-BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultura, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, v.50, p.521-577, 2004.
- BERNABEU, P.R.; PISTORIO, M.; TORRES-TEJERIZO, G.; ESTRADA-DE-LOS SANTOS, P.; GALAR, M.L.; BOIARDI, J.L.; LUNA, M.F. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae*, v.191, p.113-120, 2015.

- BERNONVILLE, T.D.; NOËL, L.D.; SANCRISTOBAL, M.; DANOUN, S.; BECKER, A.; SOREAU, P.; ARLAT, M.; LAUBER, E. Transcriptional reprogramming and phenotypical changes associated with growth of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage xylem sap. *FEMS Microbiology Ecology*, v.89, p.527-541, 2014.
- BIONDI, E.G.; MARINI, F.; ALTIERI, F.; BONZI, L.; BAZZICALUPO, M.; DEL GALLO, M. Extended phenotype of an mreB-like mutant in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, v.150, p.2465-2474, 2004.
- BLADERGROEN, M.R.; BADEL, K.; SPAINK, H.P. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.16, p.53-64, 2003.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, v.60, p.379-406, 2009.
- BOYD, C.D.; O'TOOLE, G.A. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.28, p.439-462, 2012.
- BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y.; ATTREE, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics*, v.10, p.104, 2009.
- BURGET, E.G.; VERMA, R.; MØLHØJ, M.; REITER, W.-D. The biosynthesis of L-arabinose in plants: molecular cloning and characterization of a golgi-localized UDP-D-xylose 4-epimerase encoded by the MUR4 gene of Arabidopsis. *The Plant Cell*, v.15, p.523-531, 2003.
- BURTNICK, M.N.; DESHAZER, D.; NAIR, V.; GHERARDINI, F.C.; BRETT, P.J. *Burkholderia mallei* cluster 1 type VI secretion mutants exhibit growth and actin polymerization defects in RAW 264.7 Murine Macrophages. *Infection and Immunity*, v.78, p.88-99, 2009.
- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; SANTOS, P.E.-D.-L. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.1165-1172, 2004.
- CANGELOSI, G.A.; ANKENBAUER, R.G.; NESTERT, E.W. Sugars induce the Agrobacterium virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.87, p.6708-6712, 1990.
- CECAGNO, R. Genômica comparativa entre espécies do gênero *Azospirillum*, com ênfase nas características exclusivas da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum amazonense*. Porto Alegre: UFRGS, 2013, 166p. (Tese de Doutorado).
- CELANI, A.; VERGASSOLA, M. Bacterial strategies for chemotaxis response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.107, p.1391-1396, 2010.
- CHEN, W.-M.; DE FARIA, S.M.; CHOU, J.-H.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J.P.W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.58, p.2174-2179, 2008.
- CHEN, W.-M.; DE FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; LIN, K.-Y.; CHOU, J.-H.; SHEU, S.-Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, p.1055-1059, 2007.
- CHEN, W.-M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.-H.; BARRIOS, E.; DE FARIA, S.M.; ELLIOTT, G.N.; SHEU, S.-Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of*

Systematic and Evolutionary Microbiology, v.56, p.1847-1851, 2006. CHIENG, S.; MOHAMED, R.; NATHAN, S. Transcriptome analysis of *Burkholderia pseudomallei* T6SS identifies Hcp1 as a potential serodiagnostic marker. Microbial Pathogenesis, v.79, p.47-56, 2015.

CIRAULO, M.B.; SANTOS, D.S.; RODRIGUES, A.C.D.F.O.; DE OLIVEIRA, M.V.; RODRIGUES, T.; DE OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R. Transcriptome analysis of the phyto bacterium *Xylella fastidiosa* growing under xylem-based chemical conditions. Journal of Biomedicine & Biotechnology, v.2010, p.781365, 2010.

COENYE, T.; HOLMES, B.; KERSTERS, K.; GOVAN, J.R.; VANDAMME, P. *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al. 1960) Gillis et al. 1995 and *Burkholderia vandii* Urakami et al. 1994 are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi et al. 1993 and *Burkholderia plantarii* (Azegami et al. 1987) Urakami et al. 1994, respectively. International Journal of Systematic Bacteriology, v.49, p.37-42, 1999.

COENYE, T.; LAEVENS, S.; WILLEMS, A.; OHLÉN, M.; HANNANT, W.; GOVAN, J.R.; GILLIS, M.; FALSEN, E.; VANDAMME, P. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.51, p.1099-1107, 2001.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. International Journal of Plant Genomics, v.2008, p.619832, 2008.

CORDEIRO, F.; TADRA-SFEIR, M.; HUERGO, L.; PEDROSA, F.; MONTEIRO, R.; SOUZA, E. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. Journal of Proteome Research, v.12, p.1142-1150, 2013.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review of Microbiology/microbiology, v.61, p.401-422, 2007.

DE OLIVEIRA CUNHA, C.; GODA ZULETA, L.F.; PAULA DE ALMEIDA, L.G.; PRIOLI CIAPINA, L.; LUSTRINO BORGES, W.; PITARD, R.M.; BALDANI, J.I.; STRALIOTTO, R.; DE FARIA, S.M.; HUNGRIA, M.; SOUSA CAVADA, B.; MERCANTE, F.M.; RIBEIRO DE VASCONCELOS, A.T. Complete genome sequence of *Burkholderia phenoliruptrix* BR3459a (CLA1), a heat-tolerant, nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa flocculosa*. Journal of Bacteriology, v.194, p.6675-6676, 2012. DESAI, T.A.; RAO, C.V. Regulation of arabinose and xylose metabolism in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, v.76, p.1524-1532, 2009.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). Plant Physiology, v.105, p.1139-1147, 1994.

DONG, Z.; MCCULLY, M.E.; CANNY, M.J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. Annals of Botany, v.80, p.147-158, 1997.

DIVAKARUNI, A.V.; BAIDA, C.; WHITE, C.L.; GOBER, J.W. The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. Molecular Microbiology, v.66, p.174-188, 2007.

DROGUE, B.; SANGUIN, H.; CHAMAM, A.; MOZAR, M.; LLAURO, C.; PANAUD, O.; PRIGENT-COMBARET, C.; PICAULT, N.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Plant root transcriptome profiling reveals a strain-dependent response during *Azospirillum*-rice cooperation. Frontiers in Plant Science, v.5, p.607, 2014.

EDWARDS, A.N.; SIUTI, P.; BIBLE, A.N.; ALEXANDRE, G.; RETTERER, S.T.; DOKTYCZ, M.J.; MORRELL-FALVEY, J.L. Characterization of cell surface and extracellular matrix remodeling of *Azospirillum brasilense* chemotaxis-like 1 signal transduction pathway mutants by atomic force microscopy. FEMS Microbiology Letters, v.314, p.131-139, 2011.

- ELLIOTT, G.N.; CHEN, W.-M.; CHOU, J.-H.; WANG, H.-C.; SHEU, S.-Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN, L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J.M.; BESSI, R.; DE FARIA, S.M.; TRINICK, M.J.; PRESCOTT, A.R.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *The New phytologist*, v.173, p.168-80, 2007.
- FALKE, J.; BASS, R.; BUTLER, S. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.13, p.457-512, 1997.
- FAN, B.; CARVALHAIS, L.C.; BECKER, A.; FEDOSEYENKO, D.; WIRÉN, N.V.; BORRIS, R. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*, v.12, p.116, 2012.
- FELIX, G.; DURAN, J.D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, v.18, p.265-276, 1999.
- FUENTES-RAMIREZ, L.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, v.29, p.117-128, 1999.
- GASSER, I.; CARDINALE, M.; MÜLLER, H.; HELLER, S.; EBERL, L.; LINDENKAMP, N.; KADDOR, C.; STEINBÜCHEL, A.; BERG, G. Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant and Soil*, v.347, p.125-136, 2011.
- GENIN, S.; BOUCHER, C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Molecular Plant Pathology*, v.3, p.111-118, 2002.
- GILLIS, M.; VAN, T.V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.274-289, 1995.
- GITAI, Z.; DYE, N.A.; REISENAUER, A.; WACHI, M.; SHAPIRO, L. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell*, v.120, p.329-341, 2005.
- GOUDREAU, P.; STOCK, A. Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus—response coupling. *Current Opinion in Microbiology*, v.1, p.160-169, 1998.
- GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN, J.F.; TIEDJE, J.M.; VANDAMME, P. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.1677-1681, 2004.
- HAUBERG-LOTTE, L.; KLINGENBERG, H.; SCHARF, C.; BÖHM, M.; PLESSL, J.; FRIEDRICH, F.; VÖLKER, U.; BECKER, A.; REINHOLD-HUREK, B. Environmental factors affecting the expression of pilAB as well as the proteome and transcriptome of the grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *PloS One*, v.7, p.1-16, 2012.
- HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, v.8, p.R19, 2007.
- HERNÁNDEZ-MORALES, A.; DE LA TORRE-ZAVALA, S.; IBARRA-LACLETTE, E.; HERNÁNDEZ-FLORES, J.L.; JOFRE-GARFIAS, A.E.; MARTÍNEZ-ANTONIO, A.; ALVAREZ-MORALES, A. Transcriptional profile of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 in response to tissue extracts from a susceptible *Phaseolus vulgaris* L. cultivar. *BMC Microbiology*, v.9, p.257, 2009.

- INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; CARTER, H.D.; AHMER, B.M.M.; STONE, J.M.; TRIPLETT, E.W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* : MPMI, v.18, p.169-178, 2005.
- ISHIKAWA, M.; OKAMOTO-KAINUMA, A.; MATSUI, K.; TAKIGISHI, A.; KAGA, T.; KOIZUMI, Y. Cloning and characterization of *clpB* in *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.110, p.69-71, 2010.
- JACOBS, J.M.; MILLING, A.; MITRA, R.M.; HOGAN, C.S.; AILLOUD, F.; PRIOR, P.; ALLEN, C. *Ralstonia solanacearum* requires PopS, an ancient AvrE-family effector, for virulence and To overcome salicylic acid-mediated defenses during tomato pathogenesis. *mBio*, v.4, p.e00875-13, 2013.
- JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature*, v.444, p.323-329, 2006.
- KIM, S.; PARK, J.; KIM, J.H.; LEE, J.; BANG, B.; HWANG, I.; SEO, Y.-S. RNAseq-based transcriptome analysis of *Burkholderia glumae* quorum sensing. *The Plant Pathology Journal*, v.29, p.249-259, 2013.
- KIM, S.; PARK, J.; LEE, J.; SHIN, D.; PARK, D.-S.; LIM, J.-S.; CHOI, I.-Y.; SEO, Y.-S. Understanding pathogenic *Burkholderia glumae* metabolic and signaling pathways within rice tissues through in vivo transcriptome analyses. *Gene*, v.547, p.77-85, 2014.
- KLOTZ, M.; HUTCHESON, S. Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.2468-2473, 1992.
- KOCZAN, J.M.; MCGRATH, M.J.; ZHAO, Y.; SUNDIN, G.W. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Bacteriology*, v.99, p.1237-1244, 2009.
- KRUSE, T.; BORK-JENSEN, J.; GERDES, K. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Molecular Microbiology*, v.55, p.78-89, 2005.
- LERNER, A.; CASTRO-SOWINSKI, S.; VALVERDE, A.; LERNER, H.; DROR, R.; OKON, Y.; BURDMAN, S. The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis. *Microbiology*, v.155, p.4058-4068, 2009.
- LIM, C.K.; HASSAN, K.A.; TETU, S.G.; LOPER, J.E.; PAULSEN, I.T. The effect of iron limitation on the transcriptome and proteome of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *PloS One*, v.7, p.1-18, 2012.
- LINDEMANN, A.; MOSER, A.; PESSI, G.; HAUSER, F.; FRIBERG, M.; HENNECKE, H.; FISCHER, H.-M. New target genes controlled by the *Bradyrhizobium japonicum* two-component regulatory system RegSR. *Journal of Bacteriology*, v.189, p.8928-8943, 2007.
- LI, J.; WANG, N. The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Microbiology*, v.12, p.31, 2012.
- LOPEZ-GOMEZ, M.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; BOLLER, T. Interplay of *flg22*-induced defence responses and nodulation in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, v.63, p.393-401, 2012.
- LU, G.-T.; MA, Z.-F.; HU, J.-R.; TANG, D.-J.; HE, Y.-Q.; FENG, J.-X.; TANG, J.-L. A novel locus involved in extracellular polysaccharide production and virulence of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Microbiology*, v.153, p.737-746, 2007.
- LUND, P.A. Microbial molecular chaperones. *Advances in Microbial Physiology*, v.44, p.93-140, 2001.
- LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.26, p.1829-1836, 2010.

- MARCHI, M.; BOUTIN, M.; GAZENGEL, K.; RISPE, C.; GAUTHIER, J.-P.; LEBRETON, L.; BARRET, M.; DAVAL, S.; SARNIGUET, A. Genomic analysis of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp with evidence of T3SS and T6SS gene expression on plant roots. *Environmental Microbiology Reports*, v.5, p.393-403, 2013.
- MARK, G.L.; DOW, J.M.; KIELY, P.D.; HIGGINS, H.; HAYNES, J.; BAYSSE, C.; ABBAS, A.; FOLEY, T.; FRANKS, A.; MORRISSEY, J.; O'GARA, F. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, p.17454-17459, 2005.
- MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; SALAZAR-SALAZAR, C.; MÉNDEZ, R.D.; CABALLERO-MELLADO, J.; HIRSCH, A.M.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M.S.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.104, p.1063-1071, 2013.
- MATTINEN, L.; SOMERVUO, P.; NYKYRI, J.; NISSINEN, R.; KOUVONEN, P.; CORTHALS, G.; AUVINEN, P.; AITTAMAA, M.; VALKONEN, J.P.T.; PIRHONEN, M. Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology*, v.154, p.2387-2396, 2008.
- MCCULLY, M.E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology*, v.28, p.983 - 990, 2001.
- MENESES, C.H.S.G.; ROUWS, L.F.M.; SIMOES-ARAÚJO, J.L.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.24, p.1448-1458, 2011.
- METRAUX, J.P.; NAWRATH, C.; GENOUD, T. Systemic acquired resistance. *Euphytica*, v.124, p.237-243, 2002.
- MIYATA, S.T.; KITAOKA, M.; BROOKS, T.M.; MCAULEY, S.B.; PUKATZKI, S. *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor VasX to kill *Dictyostelium discoideum*. *Infection and Immunity*, v.79, p.2941-2949, 2011.
- MOUGOUS, J.; CUFF, M.; RAUNSER, S.; SHEN, A. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, v.312, p.1526-1530, 2006.
- NICOLÁS, M.F.; BARCELLOS, F.G.; HESS, P.N.; HUNGRIA, M. ABC transporters in *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma synoviae*: Insights into evolution and pathogenicity. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, p.202-211, 2007.
- NYKYRI, J.; MATTINEN, L.; NIEMI, O.; ADHIKARI, S.; KÕIV, V.; SOMERVUO, P.; FANG, X.; AUVINEN, P.; MÄE, A.; PALVA, E.T.; PIRHONEN, M. Role and regulation of the *Flp/Tad* pilus in the virulence of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 and *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLoS ONE*, v.8, p.e73718, 2013.
- OH, M.K.; CHA, M.J.; LEE, S.G.; ROHLIN, L.; LIAO, J.C. Dynamic gene expression profiling of *Escherichia coli* in carbon source transition from glucose to acetate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.16, p.543-549, 2006.
- PECHANOVA, O.; HSU, C.-Y.; ADAMS, J.P.; PECHAN, T.; VANDERVELDE, L.; DRNEVICH, J.; JAWDY, S.; ADELI, A.; SUTTLE, J.C.; LAWRENCE, A.M.; TSCHAPLINSKI, T.J.; SÉGUIN, A.; YUCEER, C. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. *BMC genomics*, v.11, p.674, 2010.
- PERIN, L.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M. Como isolar e identificar *Burkholderia silvatlantica*. *Comunicado Técnico Embrapa*, n.86, p.1-4, 2006.

- RAMACHANDRAN, V.K.; EAST, A.K.; KARUNAKARAN, R.; DOWNIE, J.A.; POOLE, P.S. Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. *Genome Biology*, v.12, p.R106, 2011.
- REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v.54, p.2155-62, 2004.
- ROCHA, F.; PAPINI-TERZI, F.; NISHIYAMA, M.; VÊNICO, R.; VICENTINI, R.; DUARTE, R.; DE ROSA, V.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.; RODRIGUES, F.; ULIAN, E.; ZINGARETTI, S.; GALBIATTI, J.; ALMEIDA, R.; FIGUEIRA, A.; HEMERLY, A.; SILVA-FILHO, M.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics*, v.8, p.1-22, 2007.
- ROEST, H.P.; MULDER, I.H.M.; SPAINK, H.P.; WIJFFELMAN, C.A.; LUGTENBERG, B.J.J. A *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii locus not localized on the sym plasmid hinders effective nodulation on plants of the pea cross-inoculation group. *Research Note*, v.10, p.938-941, 1997.
- RÖMLING, U.; GOMELSKY, M.; GALPERIN, M.Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology*, v.57, p.629-639, 2005.
- ROSALES-REYES, R.; AUBERT, D.F.; TOLMAN, J.S.; AMER, A.O.; VALVANO, M.A. *Burkholderia cenocepacia* type VI secretion system mediates escape of type II secreted proteins into the cytoplasm of infected macrophages. *PloS One*, v.7, p.e41726, 2012.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols*, v.132, p.365-386, 1999.
- RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M.-A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics Applications Note*, v.16, p.944-945, 2000.
- SAKURAI, K.; ARAI, H.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Transcriptome response to different carbon sources in *Acetobacter acetii*. *Microbiology*, v.157, p.899-910, 2011.
- SANT'ANNA, F.H.; ALMEIDA, L.G.P.; CECAGNO, R.; REOLON, L.A.; SIQUEIRA, F.M.; MACHADO, M.R.S.; VASCONCELOS, A.T.R.; SCHRANK, I.S. Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. *BMC Genomics*, v.12, p.1-14, 2011.
- SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. Transcriptional profiling of nitrogen fixation and the role of NifA in the diazotrophic endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *PloS One*, v.9, p.e86527, 2014.
- SATO YOSHIKO, A.; DIAS TEIXEIRA, H.C.; ANDRADE ALVES, L.; SOUZA CAMELLO, VÊNIA. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. *Cerne*, v. 7, p. 117-123.
- SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist*, v.149, p.167-192, 2001.
- SCHAUER, K.; RODIONOV, D.A.; DE REUSE, H. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends in Biochemical Sciences*, v.33, p.330-338, 2008.
- SHELL, M.A.; ULRICH, R.L.; RIBOT, W.J.; BRUEGGEMANN, E.E.; HINES, H.B.; CHEN, D.; LIPSCOMB, L.; KIM, H.S.; MRÁZEK, J.; NIERMAN, W.C.; DESHAZER, D. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Molecular Microbiology*, v.64, p.1466-1485, 2007.
- SHEU, S.-Y.; CHOU, J.-H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; GROSS, E.; DOS REIS JUNIOR, F.B.; MELKONIAN, R.; MOULIN, L.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.-

- M. *Burkholderia diazotrophica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. International Journal of Systematic and Evolutionary, v.63, p.435-441, 2013.
- SHEU, S.-Y.; CHOU, J.-H.; BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G.N.; GROSS, E.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; YOUNG, J.P.W.; CHEN, W.-M. *Burkholderia symbiotica* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. native to north-east Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.62, p.2272-2278, 2012.
- SCHWARZ, S.; WEST, T.E.; BOYER, F.; CHIANG, W.-C.; CARL, M.A.; HOOD, R.D.; ROHMER, L.; TOLKER-NIELSEN, T.; SKERRETT, S.J.; MOUGOUS, J.D. Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. PLoS Pathogens, v.6, p.1-14, 2010.
- SEXTON, J.A.; MILLER, J.L.; YONEDA, A.; KEHL-FIE, T.E.; VOGEL, J.P. *Legionella pneumophila dotU* and *icmF* are required for stability of the *dot/icm* complex. Infection and Immunity, v.72, p.5983-5992, 2004.
- SHALOM, G.; SHAW, J.G.; THOMAS, M.S. In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages. Microbiology, v.153, p.2689-2699, 2007.
- SHEIBANI-TEZERJI, R.; RATTEI, T.; SESSITSCH, A.; TROGNITZ, F. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. mBio, v.6, p.1-11, 2015.
- SHIDORE, T.; DINSE, T.; ÖHRLEIN, J.; BECKER, A.; REINHOLD-HUREK, B. Transcriptomic analysis of responses to exudates reveal genes required for rhizosphere competence of the endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. Environmental Microbiology, v.14, p.2775-2787, 2012.
- SIMM, R.; MORR, M.; KADER, A.; NIMTZ, M.; RÖMLING, U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. Molecular Microbiology, v.53, p.1123-1134, 2004.
- SOURJIK, V. Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. Trends in Microbiology, v.12, p.569-576, 2004.
- SOUZA, A.P.; LEITE, D.C.C.; PATTATHIL, S.; HAHN, M.G.; BUCKERIDGE, M.S. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. BioEnergy Research, v.6, p.564-579, 2012.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews, v.24, p.487-506, 2000.
- STEUDLE, E.; FRENSCH, J. Water transport in plants: Role of the apoplast. Plant and Soil, v.187, p.67-79, 1996.
- TADRA-SFEIR, M.Z.; FAORO, H.; CAMILIOS-NETO, D.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.; BALSANELLI, E.; WEISS, V.; BAURA, V.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; PEDROSA, F.D.O.; SOUZA, E.M.; MONTEIRO, R.A. Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenin. Frontiers in Microbiology, v.6, p.1-8, 2015.
- TAYLOR, B.; ZHULIN, I. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.63, p.479-506, 1999.
- TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: some implications in the association with endophytes. Journal of Plant Physiology, v.163, p.80-85, 2006.
- TENORIO-SALGADO, S.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; PEREZ-RUEDA, E. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. Bioengineered, v.4, p.236-243, 2013.



- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, v.512, p.507-512, 2002.
- VARGAS, C.; PÁDUA, V.; NOGUEIRA, E.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.; SILVA, F.; BALDANI, J.; FERREIRA, P.; HEMERLY, A. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. *Symbiosis*, v.35, p.159-180, 2003.
- VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M.J.; RIVAS, R.; ZURDO-PIÑEIRO, J.L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E.J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology*, v.48, p.118-124, 2008.
- VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E.; BALDANI, J.; FERREIRA, P.; HEMERLY, A. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacteria association. *Journal of Experimental Botany*, v.57, p.559-569, 2006.
- VUILLEUMIER, S.; PAGNI, M. The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.58, p.138-146, 2002.
- WADHAMS, G.H.; ARMITAGE, J.P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v.5, p.1024-1037, 2004.
- WAIRURI, C.K.; WAALS, J.E.V.D.; SCHALKWYK, A.V.; THERON, J. *Ralstonia solanacearum* needs Flp pili for virulence on potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.25, p.546-556, 2012.
- WU, H.-Y.; CHUNG, P.-C.; SHIH, H.-W.; WEN, S.-R.; LAI, E.-M. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, v.190, p.2841-2850, 2008.
- WU, S.; ZHU, Z.; FU, L.; NIU, B.; LI, W. WebMGA: a customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. *BMC Genomics*, v.12, p.444, 2011.
- XIE, S.; WU, H.; CHEN, L.; ZANG, H.; XIE, Y.; GAO, X. Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings. *BMC Microbiology*, v.15, p.21, 2015.
- YU, X.; LUND, S.P.; SCOTT, R.A.; GREENWALD, J.W.; RECORDS, A.H.; NETTLETON, D.; LINDOW, S.E.; GROSS, D.C.; BEATTIE, G.A. Transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* to growth in epiphytic versus apoplastic leaf sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.110, p.E425-E434, 2013.
- ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.25, p.139-150, 2012.
- ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, v.50, p.743-749, 2000.

## 7. ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Composição meio JMV líquido (BALDANI <i>et al.</i> , 2014).	
Reagentes	Quantidade em 1 L
Manitol	5,0 (g.L <sup>-1</sup> )
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6 (g.L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 (g.L <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 (g.L <sup>-1</sup> )
NaCl	0,1 (g.L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2 (g.L <sup>-1</sup> )
Glutamato de sódio	1,87 (g.L <sup>-1</sup> )
FeEDTA (16,4 g.L <sup>-1</sup> )	4 mL
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL
Ágar meio sólido/semi-sólido	25g/1,3g

<b>Anexo 2.</b> Composição solução de vitaminas	
Reagentes	Quantidade em 1 L
biotina	10 mg
Piridoxal-HCl	20 mg

<b>Anexo 3.</b> Composição solução de micronutrientes	
Reagentes	Quantidade em 100 mL
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,04 (g.L <sup>-1</sup> )
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,12 (g.L <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,4 (g.L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0 (g.L <sup>-1</sup> )
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,18 (g.L <sup>-1</sup> )

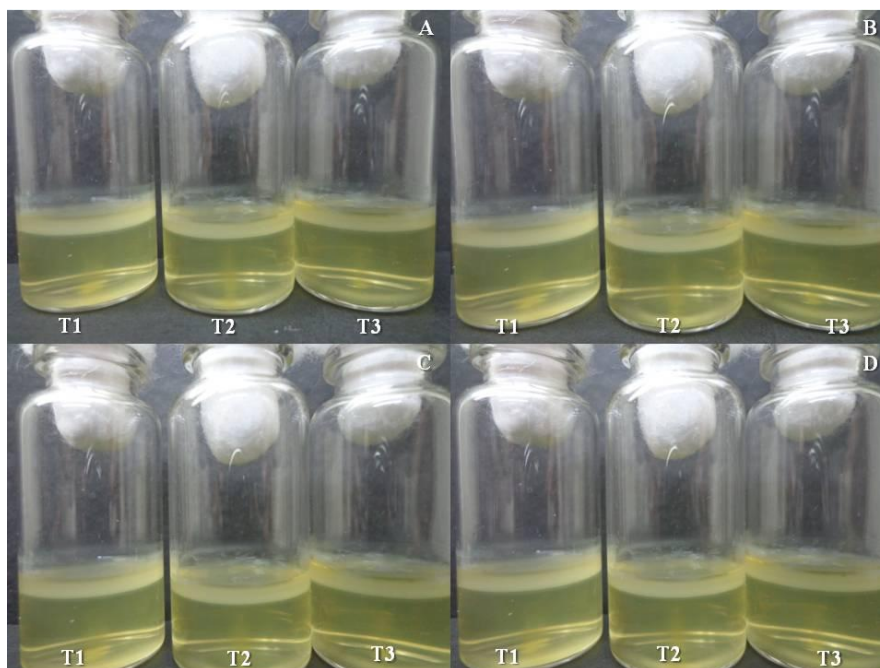
## Anexo 4

### Confirmação da identificação taxonômica de *Burkholderia tropica* estirpe PPe8

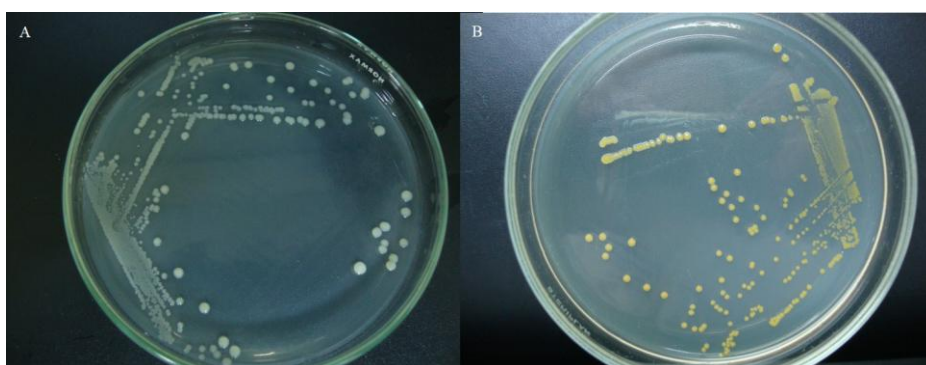
*Burkholderia tropica* Ppe8 (BR11366) foi obtida da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Com o intuito de se confirmar a identidade de *B. tropica* estirpe PPe8 foi realizada a reação de PCR com iniciadores espécie-específico que amplificam um fragmento de 260 pb de uma região do 16S rRNA. A bactéria foi cultivada em meio em frascos de vidro contendo 5 ml de meio DYGS líquido. Os frascos foram mantidos a 30°C, 150 rpm por 36 horas. Inoculou-se 20 µl da suspensão bacteriana às 36 hai (horas após a inoculação) em frascos contendo 5 ml de meio JMV (Anexos 1, 2 e 3) semi sólido em triplicata de cada repetição para verificar a formação de película característica. Em seguida os frascos foram incubados à temperatura de 30°C por 72 horas. Para confirmação da pureza da cultura, foram inoculados 5 µl desta mesma suspensão às 36 hai, em placas de Petri contendo meios DYGS ou JMV sólidos. Para extração do DNA bacteriano, 20 µl da suspensão bacteriana foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio JMV líquido. Os tubos foram mantidos sob agitação de 150 rpm, temperatura de 30°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada a extração de DNA usando o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega, Cat. No. #A1120) conforme recomendação do fabricante. Foi feita a quantificação do DNA extraído em NanoDrop 2000c (Thermo Cientific, USA). Ao fim, 100 ng.ml<sup>-1</sup> de DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em uma cuba de eletroforese com tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0) a 90 V por 90 min (minutos), com o intuito de se confirmar a extração. Também foram aplicados produto de reação onde não foi empregado DNA bacteriano, que correspondeu ao controle negativo e, outro onde foi utilizado o DNA da bactéria *G. diazotrophicus*, que foi utilizado com o intuito de se confirmar a especificidade dos iniciadores.

Em seguida, o DNA foi submetido a PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores desenhados por Boa Sorte (2013), 5'-GGAATTCGCTGAGAGGTGGA-3' (*Forward*) 5'-GGCTTGGCAACCCTCTGTTCC-3' (*Reverse*), desenhados para amplificar um fragmento de 260 pb do 16S rRNA de *B. tropica* Ppe8. A reação foi constituída de 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP), 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão para Taq DNA polimerase 1X (1 mM de Tris-HCl, pH 9,0 e 5 mM de KCl) (Invitrogen, Cat. No. 11615-010), 120 nM de cada iniciador e 100 ng de DNA total de Ppe8<sup>T</sup>. As condições empregadas nas reações de PCR foram: 5 minutos a 96°C (desnaturação), 1 minuto a 95°C (desnaturação), 15 segundos a 62°C (anelamento), 45 segundos a 72°C (polimerização), retorno 39 ciclos para a segunda etapa, 5 minutos a 72°C (extensão final) e, finalmente, 4°C. Para a verificação da amplificação, 5 µl dos produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose a 2% (m/v) em uma cuba de eletroforese com tampão TAE 1X (40 mM de Tris-acetato pH 8,0 e 1 mM de EDTA pH 8,0) e submetidos a uma voltagem de 80 V por 90 minutos. Os géis foram então corados com brometo de etídeo (5 µg.ml<sup>-1</sup>) e visualizados sob luz ultravioleta a 254 nm, com o uso do fotodocumentador KODAK<sup>®</sup> Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. No. 172.8468). A análise dos géis foi realizada com o programa de análise de imagens da KODAK<sup>®</sup> 1D Image Analysis (KODAK Molecular Imaging Systems, Cat. No. 811.2344). Como referência nas análises, foi empregado o marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Cat. No. 10787-018). Foi aplicado também como controle negativo uma mistura sem DNA bacteriano e duas repetições com o isolado de *G. diazotrophicus* que foi utilizado com o intuito de se confirmar a especificidade dos iniciadores

Foi observada a formação de película aerotática de crescimento em meio semi-sólido JMV característica de *B. tropica* (Figura 25) e características morfológicas específicas em meio JMV e DYGS (Figura 26). Foi observada a formação de colônia pequena, borda inteira, forma circular, cor amarela intensa no centro e borda esbranquiçada, pouco gomosa e convexa em meio JMV (REIS *et al.*, 2004; PERIN *et al.*, 2006). Já em meio DYGS foi possível verificar colônias lisas, brilhantes, pequenas, forma circular, borda inteira, cor branca e formato convexo indicando, portanto, que a bactéria estava pura (sem contaminantes) e poderia ser utilizada para os ensaios posteriores.

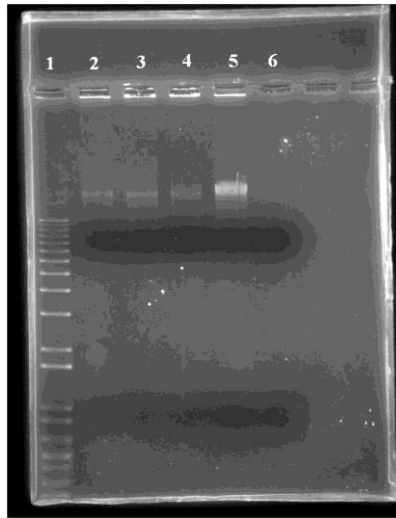


**Figura 25.** Formação de película pela *B. tropica* nas quatro repetições biológicas (A, B, C e D, respectivamente) nas três réplicas técnicas (T1, T2 e T3). (Foto: SILVA, 2012)



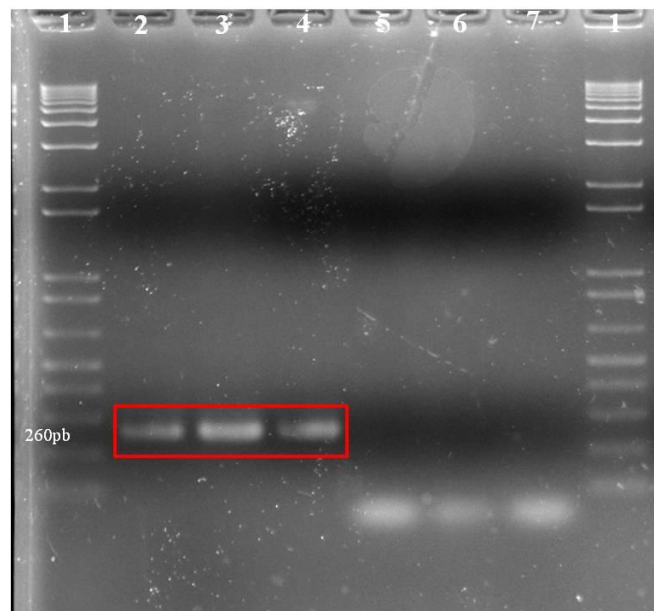
**Figura 26.** Características morfológicas de *B. tropica* em placa contendo meio DYGS (A) e JMV (B). (Foto: SILVA, 2012).

Foi observado que a extração do DNA bacteriano foi realizada com sucesso e portanto a partir desse resultado foi realizada uma PCR para confirmação da bactéria testada (Figura 27).



**Figura 27.** DNA extraído de *B. tropica* estirpe. Canaletas: 1-Marcador 1kb plus; 2, 3 e 4-*B. tropica* estirpe Ppe8 (repetições 1, 2 e 3 respectivamente); 5-*G. diazotrophicus* e 6- Controle negativo (água).

Os iniciadores usados no trabalho mostraram-se espécie-específico (resultados observados por BOA SORTE, 2013) e pode-se concluir que a bactéria testada estava pura, pois amplificou uma banda de aproximadamente 260 pb do 16S rRNA de *B. tropica* (Figura 28). Esses iniciadores foram testados para outros gêneros de bactérias e algumas espécies de *Burkholderia* como *B. vietnamensis*, *B. kururiensis* e *B. silvatlântica* e observaram-se ser espécie-específico para *B. tropica* (dados não publicados de BOA SORTE, 2013).



**Figura 28.** Produto PCR amplificado de *B. tropica* estirpe Ppe8 realizada com iniciadores espécie-específico. Canaletas: 1-Marcador 1kb plus; 2, 3 e 4 *B. tropica* estirpe Ppe8 (repetições 1, 2 e 3, respectivamente); 5 e 6 *G. diazotrophicus* (repetições 1 e 2, respectivamente) e 7-Controlle negativo (Água).

**Anexo 5.** Genes diferencialmente expressos no genoma de *B. tropica* estirpe Ppe8 na presença do apoplasto.. Genes reprimidos ou superexpressos na presença do apoplasto em comparação aos tratamentos: meio diluído (MA) e meio completo (MM).

ORF	descrição	descrição da classe	MA	MM	genes
_1010	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-3.333297081	-6.580840439	
_1084	Ribulose kinase	C	-50.40922253		
_1086	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C		-4.970694042	
_11	Anaerobic dehydrogenases, typically selenocysteine-containing	C	*		
_1402	aconitate hydratase 2	C	58.07582977	16.76439086	<i>acnB</i>
_1459	Fe-S oxidoreductase	C	-14.3154517		
_146	NAD(P)H-nitrite reductase	C		-23.62473731	
_1560	Aconitase A acnM	C		2.557817924	<i>acnM</i>
_1567	Cytochrome c553	C	-3.765225207		
_1609	L-lactate dehydrogenase	C	-8.01579707		<i>ldh</i>
_1622	formate dehydrogenase-N alpha subunit	C	-3.451688901		<i>fdnG</i>
_1632	NADH:flavin oxidoreductases, Old Yellow Enzyme family	C		-44.75488612	
_1657	C4-dicarboxylate transport protein	C	324.817732	22.33642487	<i>dctA</i>
_1736	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and related 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases, gamma subunit	C	-3.522736044	9.403055588	
_1776	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, large subunit CoxL/CutL homologs	C	-35.3008	-19.6763217	
_1777	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, middle subunit CoxM/CutM homologs	C	-12.76370938	-3.392596544	
_1859	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	C	-4.691733829	-6.624790219	
_1867	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-57.44059344		
_1936	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-76.73529058		
_1955	ATP synthase protein I	C	2.383592206		<i>atpI</i>
_1959	ATP synthase F1, delta subunit	C	16.84841173		<i>atpH</i>
_1960	ATP synthase F1, alpha subunit	C	12.23586075		<i>atpA</i>
_1961	ATP synthase F1, gamma subunit	C	7.957013445		<i>atpG</i>
_1962	ATP synthase F1, beta subunit	C	6.58024119		<i>atpD</i>
_1963	ATP synthase F1, epsilon subunit	C	5.38945871		<i>atpC</i>
_1974	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	C	3.993251145		<i>putA</i>
_1987	Cytochrome c5	C	-160.8877701		
_2311	Nitrogenase molybdenum-iron protein, alpha and beta chains	C	*		<i>nifE</i>
_2359	Uncharacterized protein required for formate dehydrogenase activity	C	-3.289609446		
_2411	Cytochrome c, mono- and diheme variants	C	-9.224699261	-3.357536421	
_2412	Cytochrome c553	C	-42.0153712		
_2424	succinate-CoA ligase, beta subunit	C	3.951799062		<i>sucC</i>
_2425	succinate-CoA ligase, alpha subunit	C	3.348063616		<i>sucD</i>
_2433	multispecies: alternative dihydrofolate reductase 3	C		3.259046697	
_25	cytochrome c oxidase, subunit I	C	-146.1386827		<i>ctaD</i>
_2524	NADH:flavin oxidoreductases, Old Yellow Enzyme family	C	27.79359925	13.59011508	
_2536	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, small subunit CoxS/CutS homologs	C	-24.75756576		
_2537	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, large subunit CoxL/CutL homologs	C	-42.92738995		
_2678	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-48.87535858		
_270	Cytochrome B561	C		*	
_2720	Fe-S oxidoreductase	C	-4.998024292		
_2957	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, small subunit CoxS/CutS homologs	C		-66.19740234	
_2963	Aerobic-type carbon monoxide dehydrogenase, large subunit CoxL/CutL homologs	C		*	
_2970	isocitrate dehydrogenase NADP-dependent	C	2.173702644		
_3103	Citrate synthase	C	*		

_3155	NAD(P)H-nitrite reductase	C		-15.75536008	
_3157	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-349.5049853		
_3320	Malic enzyme	C		-2.198839194	
	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and related 2-oxoacid:ferredoxin				
_3321	oxidoreductases, gamma subunit	C	-8.020432182		
_3328	phenylacetic acid degradation NADH oxidoreductase	C		4.734403413	<i>paaE</i>
_3354	Isocitrate lyase	C	-2.382241722		
_3501	Ferredoxin	C	-3.853223075		
_351	Anaerobic dehydrogenases, typically selenocysteine-containing	C	-57.33898472	-7.151887058	
_3516	dihydrolipoyl dehydrogenase	C	7.76360792		<i>lpdA</i>
_3517	pyruvate dehydrogenase E2 component PdhB	C	2.592428089		<i>pdhB</i>
	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring),				
_3518	homodimeric type	C	3.184234417		<i>aceE</i>
_352	Cytochrome bd-type quinol oxidase, subunit 1	C	-23.70649886		
_353	Cytochrome bd-type quinol oxidase, subunit 2	C	-51.3950163		
	Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide				
_3548	dehydrogenase (E3) component, and related enzymes	C	-43.65033615		
_3569	L-lactate permease	C	-83.8610682		
_3796	Cytochrome c553	C	-12.28785112		
_3797	Heme/copper-type cytochrome/quinol oxidases, subunit 1	C	-41.39900528	-5.088122539	
_3798	Heme/copper-type cytochrome/quinol oxidases, subunit 2	C	-5.264628554		
_3801	Cytochrome c553	C	-172.5796281		
_3845	Zn-dependent alcohol dehydrogenases, class III	C	-14.65947656		
_3847	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV	C	**	13.22875489	<i>cyoD</i>
_3848	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit 3	C	**	28.20282021	<i>cyoC1</i>
_3849	cytochrome o ubiquinol oxidase subunit 1	C	612.2989764	69.61339963	<i>cyoB1</i>
_3850	ubiquinol oxidase, subunit II	C	389.0703478	141.2627238	<i>cyoA</i>
_3907	FAD/FMN-containing dehydrogenases	C	-10.69222646		
_3909	Fe-S oxidoreductase	C	-5.246922516		
_3943	NADH:flavin oxidoreductases, Old Yellow Enzyme family	C		2.836463961	
_4198	NADP-dependent malic enzym	C	9.98790228	3.043995551	<i>maeB</i>
_4296	NADH dehydrogenase, FAD-containing subunit	C	-9.122769116	-6.233533496	
_4362	type II citrate synthase	C	3.846651463		<i>gltA</i>
_4364	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	C	5.152549354		<i>sdhB</i>
_4365	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	C	2.932087324		<i>sdhA</i>
_4420	cytochrome c oxidase subunit 3 CtaE	C	-11.88789176	-4.993298963	<i>ctaE</i>
_4424	Heme/copper-type cytochrome/quinol oxidases, subunit 1	C	-9.653911129	-4.864035405	
_4426	Heme/copper-type cytochrome/quinol oxidases, subunit 2	C	-3.522004861		
_4572	Cytochrome c1	C		-2.990240267	
_4573	Cytochrome b subunit of the bc complex	C	-4.278311855	-4.440072606	
_4574	Rieske Fe-S protein	C		-2.823346984	
_4820	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -dicarboxylate symporters	C	-9.490604226		
_4875	atpase	C	-6.685197385		
	Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide				
_5039	acyltransferase (E2) component, and related enzymes	C	-92.04256528		
	Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1)				
_5040	component, eukaryotic type, beta subunit	C	-25.03675008		
	Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1)				
_5041	component, eukaryotic type, alpha subunit	C	-57.75371958		
_5139	NAD/NADP transhydrogenase alpha subunit	C		*	
_5153	FAD/FMN-containing dehydrogenases	C	*		
_5181	dihydrolipoyl dehydrogenase	C	2.898275684	-3.063288262	<i>lpdA</i>
	Pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide				
_5182	acyltransferase (E2) component, and related enzymes	C		-2.910589568	



	2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1)			
_5183	component, and related enzymes	C		-2.106789927
_5439	NAD/NADP transhydrogenase alpha subunit	C		-18.39789289
_5440	NAD/NADP transhydrogenase beta subunit	C		-5.669631905
_5470	Fe-S oxidoreductase	C	-3.275403449	-48.74643648
_5471	FAD/FMN-containing dehydrogenases	C	-32.53699104	-6.393272962
_5472	FAD/FMN-containing dehydrogenases	C	-18.21588764	-2.348995395
_5719	Predicted acyl-CoA transferases/carnitine dehydratase	C	-4.850243633	
_5791	Acetyl-CoA hydrolase	C	-16.70920164	-47.17108637
_5807	Uncharacterized conserved protein containing a ferredoxin-like domain	C	-4.990469851	
_5808	Fe-S oxidoreductase	C	-9.600860623	
_5831	(2Fe-2S)-binding protein	C	4.789885512	12.58766441
_6262	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C		*
_6334	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-3.300646074	
_639	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-17.35748815	
_6426	Isocitrate lyase	C	-6.049922669	
_6430	Malate synthase	C	-2.753988439	
_6543	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 6 (chain J)	C		-2.992624582
_6546	NADH dehydrogenase I chain H	C	4.072674439	<i>nuoH</i>
_6547	NADH dehydrogenase (quinone), G subunit	C	2.631080946	<i>nuoG</i>
_6549	NADH:ubiquinone oxidoreductase 24 kD subunit	C		-2.115153717
_6550	NADH dehydrogenase (quinone), D subunit	C	2.257987879	<i>nuoD</i>
_6551	NADH:ubiquinone oxidoreductase 27 kD subunit	C		-2.284795016
_6625	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-7.490594393	-3.298726401
_6641	Cytochrome c553	C		*
_6717	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C	-22.17609906	
_6723	Phosphoenolpyruvate carboxylase	C	3.305197765	
_6831	FAD/FMN-containing dehydrogenases	C	27.36095203	
_6842	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	C	*	*
_6974	fumarate hydratase FumC	C		4.373870896
_7016	Electron transfer flavoprotein, beta subunit	C	2.772441169	<i>fumC</i>
_7049	NADH:ubiquinone oxidoreductase, NADH-binding (51 kD) subunit	C		-8.721860557
_705	FAD/FMN-containing dehydrogenases	C	*	
_7274	Ferredoxin-like protein	C	2.783339627	
_7358	Nitrate reductase alpha subunit	C		5.226096948
_7359	nitrate reductase, beta subunit	C		4.95704967
_7360	nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone	C		6.376156026
_7360	nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone	C		<i>narH</i>
_7392	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 3	C	35.07697801	<i>narJ</i>
_7393	cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit I	C	94.96512112	<i>cyoC</i>
_7495	NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	C		<i>cyoB</i>
_7509	Fe-S oxidoreductase	C	-255.6332038	-51.07558271
_7511	Ruberythrin	C	*	
_76	NADH:flavin oxidoreductases, Old Yellow Enzyme family	C	-13.58589957	
_7700	Acyl-CoA synthetase (NDP forming)	C	-5.624617397	
_7740	Ni/Fe-hydrogenase, b-type cytochrome subunit	C	**	
_7771	Aconitase A	C		-2.998080474
_7778	succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane anchor protein	C	37.29694093	<i>sdhD</i>
_953	Cytochrome c, mono- and diheme variants	C	-11.65966638	
_988	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 4 (chain M)	C	9.587178011	<i>nuoM</i>
_989	ubiquinol oxidase, subunit II	C	58.24969893	<i>cyoA</i>
_990	cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit I	C	34.5837762	<i>cyoB</i>
_991	cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit III	C	111.2487814	<i>cyoC</i>
_1832	Rod shape-determining protein MreB	D	3.372015659	<i>mreB</i>
_3221	ATPases involved in chromosome partitioning	D		-46.20581626

_3484	Septum formation initiator	D	11.64772803	-3.102146793	
_6138	Chromosome segregation ATPases	D	-11.25690179		
_6230	cell division protein FtsZ	D	-2.601451364	-2.007646835	<i>ftsZ</i>
_6402	Chromosome segregation ATPases	D	2.394138498		
_7417	Chromosome segregation ATPases	D	*		
_1021	Gamma-glutamyltransferase	E		*	
_118	4-aminobutyrate aminotransferase and related aminotransferases	E	-8.471932964		
_1336	ethanolamine permease	E		-12.73381714	<i>eat</i>
_1337	Ethanolamine ammonia-lyase, large subunit	E	-19.67711942		
_1338	Ethanolamine ammonia-lyase, small subunit	E	-206.0144268		
_142	Arginase/agmatinase/formimionoglutamate hydrolase, arginase family	E		*	
_1451	ABC-type proline/glycine betaine transport systems, ATPase components	E	5.238220765	7.801101514	<i>opuCA</i>
_1686	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E		-15.8801701	
_1693	Methionine synthase I, cobalamin-binding domain	E	8.143770834		<i>metH</i>
_1761	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E		-35.21877291	
_1818	Acetylglutamate kinase	E	3.720063833		<i>argB</i>
_1937	Choline dehydrogenase and related flavoproteins	E	-15.88149805		
_1939	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component	E		-18.77824135	
_1940	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component	E		-11.55993178	
_1941	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E	-4.890472657	-82.54782961	
_1942	Branched-chain amino acid ABC-type transport system, permease components	E		-86.52355862	
_1943	ABC-type branched-chain amino acid transport system, permease component	E		-186.81677	
_1944	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E	3.694472969		
_1946	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E		-6.74806449	
_1947	Branched-chain amino acid ABC-type transport system, permease components	E		-6.781253992	
_1948	ABC-type branched-chain amino acid transport system, permease component	E		-7.047290701	
_1949	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component	E		-9.311706136	
_1975	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E		-4.528530193	
_1979	glycine dehydrogenase	E	5.683549267		<i>gcvP</i>
_1981	Glycine cleavage system T protein (aminomethyltransferase)	E	5.750029485		<i>gcvT</i>
_200	Serine-pyruvate aminotransferase/archaeal aspartate aminotransferase	E	-4.621121673		
_209	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	E		*	
_2159	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E		-97.09927929	
_2163	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E		*	
_2388	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase	E	6.941807093		
_2542	Serine-pyruvate aminotransferase/archaeal aspartate aminotransferase	E	14.77145488	3.694644339	
_2666	Arginine deiminase	E	*		
_2676	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	E	*		

_2681	Glycine/D-amino acid oxidases (deaminating)	E	*		
_2704	Histidine ammonia-lyase	E	91.99158813	20.81786915	<i>hutH</i>
_2710	Transglutaminase-like enzymes, putative cysteine proteases	E	-42.8422884	-13.53706636	
	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E			
_2711		E	-6.245413262		
_2729	Arginine/ornithine N-succinyltransferase beta subunit	E	-4.295328928		
_2730	Arginine/ornithine N-succinyltransferase beta subunit	E	-4.667292028		
_2732	Succinylarginine dihydrolase	E	-4.231672304		
_2908	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component	E	*	*	
_2909	ABC-type amino acid transport system, permease component	E		-57.82982107	
_291	Xaa-Pro aminopeptidase	E		*	
_2938	Shikimate 5-dehydrogenase	E		88.09016839	<i>aroE</i>
_2961	Leucyl aminopeptidase (aminopeptidase T)	E		*	
_3104	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	E		-8.375848341	
	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component	E		*	
_3184		E			
	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component	E		*	
_3185		E			
_3275	ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component	E		-6.263084044	
_3333	Lysophospholipase L1 and related esterases	E	-4.767157536		
_3427	Aspartokinases	E	6.754203446		
_3437	Serine acetyltransferase	E	-22.44672809		
	Cysteine sulfinate desulfinate/cysteine desulfurase and related enzymes	E			
_3506		E	-3.534331122		
_3522	Zn-dependent oligopeptidases	E	2.158990003	4.922239551	
_381	Dipeptidyl aminopeptidases/acylaminoacyl-peptidases	E	-6.321119417		
_4090	Carboxypeptidase C (cathepsin A)	E	-14.53775464		
	ABC-type branched-chain amino acid transport system, permease component	E			
_4123		E		-5.040101181	
	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E			
_4125		E		-5.148796896	
_4204	Methionine synthase II (cobalamin-independent)	E	-9.717734328	-17.71213129	
_4206	Transglutaminase-like enzymes, putative cysteine proteases	E		-6.509887559	
	Acetylmethionine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase and related deacylases	E		*	
_4218		E			
_4271	Glycine cleavage system T protein (aminomethyltransferase)	E	-97.34642656		
_4278	Amino acid transporters	E		*	
_4351	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	E	2.249626776	3.103181912	
_4400	Isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthases	E	4.756360285	4.423843835	<i>leuA</i>
_4587	Histidinol dehydrogenase	E	8.976157137		
_4611	Glutamate synthase [NADPH] large chain	E	3.681451609	3.369874486	<i>gltI</i>
	Acetylmethionine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase and related deacylases	E			
_4673		E	-4.868968864	-4.390471451	
	Acetylmethionine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase and related deacylases	E			
_4985		E	-4.345657464		
_4986	Threonine dehydratase	E	-41.71007141		
_5055	Threonine synthase	E	16.18984565		<i>thrC</i>
_5056	Homoserine dehydrogenase	E	19.28489894		<i>thrA</i>
_5057	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	E	8.522231934		<i>aspB</i>
_5289	Choline dehydrogenase and related flavoproteins	E	-50.63113691		
_530	Shikimate 5-dehydrogenase	E	**	15.17666605	
_5353	Predicted amino acid aldolase or racemase	E		-4.06171587	
_5383	Spermidine synthase	E		6.311171281	
_5408	Glutamate dehydrogenase/leucine dehydrogenase	E		-7.162691932	

_5410	ABC-type amino acid transport system, permease component	E		-5.528208665	
_5411	ABC-type polar amino acid transport system, ATPase component	E		-11.76922793	
_5422	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E	186.4757458		
_5433	Glutamate synthase domain 2	E	3.238264335	3.196171771	
_5500	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase	E	21.30384263		
_5566	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	E	-8.436885195		
_5848	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	E	2.735181884		
_6065	NAD-specific glutamate dehydrogenase	E	-10.34924082		
_6328	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	E		-2.646235561	
_6365	aromatic amino acid transaminase	E	3.969652376		<i>tyrB</i>
_6405	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	E	-2.58682985		
_6566	Acetolactate synthase, small (regulatory) subunit	E		-2.384061809	
_663	Histidine ammonia-lyase	E		*	
_6708	ABC-type histidine transport system, ATPase component	E		-6.982801366	
_6728	Argininosuccinate lyase	E	3.635940995		
_6731	Arginine/lysine/ornithine decarboxylases	E	4.40268531		
_7074	Aminopeptidase N	E	-2.134442514		
_7159	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase	E	3.268649821		<i>aspB</i>
_7185	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component	E		-4.68628475	
_7186	ABC-type branched-chain amino acid transport system, permease component	E	3.277603807	-4.935878389	
_7187	Branched-chain amino acid ABC-type transport system, permease components	E		-4.576546286	
_7227	ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component	E	-17.37407858	-11.62471647	
_7259	Argininosuccinate synthase	E	2.319063763		
_7273	serine hydroxymethyltransferase	E	20.44828845		<i>glyA</i>
_7387	4-aminobutyrate aminotransferase and related aminotransferases	E		5.18483137	<i>gabT</i>
_7460	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	E		*	
_7463	Putative threonine efflux protein	E	74.39269269	7.987939473	
_7467	Acetylornithine deacetylase/Succinyl-diaminopimelate desuccinylase and related deacylases	E	-3.930934241		
_7488	biodegradative arginine decarboxylase	E	15.32806151		<i>adiA</i>
_7498	Glutamine synthetase	E	*	*	
_7500	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	E		*	
_7501	ABC-type spermidine/putrescine transport systems, ATPase components	E		*	
_7502	ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component I	E		-35.55449296	
_7503	ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component II	E		*	
_7504	Glycine/D-amino acid oxidases (deaminating)	E		-400.0124256	
_7505	Glycine/D-amino acid oxidases (deaminating)	E		-8.007949544	
_7677	Glycine/D-amino acid oxidases (deaminating)	E		-24.56204324	
_7755	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein	E	2.989343262	-2.332321934	
_791	Amino acid transporters	E		*	
_851	ABC-type histidine transport system, ATPase component	E		-31.36747341	
_962	ABC-type spermidine/putrescine transport system, permease component II	E	-8.429200055		
_1429	Purine nucleoside permease	F	-86.16097848	-73.29499005	
_1492	phosphoribosyl-dephospho- transferase	F	-26.32103853	-13.03758494	
_1569	purine nucleoside phosphorylase	F	3.499158784	8.398589191	

_1934	Adenylate cyclase, class 2 (thermophilic)	F	-3.029978791	
_2069	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	F	69.0938197	<i>nrdD</i>
_3487	CTP synthase	F	2.28252254	<i>pyrG</i>
_4304	Nucleoside phosphorylase	F	-2.981402101	
_4617	dGTP triphosphohydrolase	F		-4.56235538
_4957	phosphoribosylformylglycinamide synthase	F	2.235717956	<i>purL</i>
_5404	adenylosuccinate lyase	F	2.046578716	<i>purB</i>
_5478	ADP-ribose pyrophosphatase	F	-13.95837393	
	Xanthine dehydrogenase, iron-sulfur cluster and FAD-binding subunit			
_5569	A	F	-3.849398231	
_5570	Xanthine dehydrogenase, molybdopterin-binding subunit B	F		-3.579111851
_6198	ribonucleoside-diphosphate reductase, alpha subunit	F	6.795062402	
_6368	GMP synthetase	F	2.387273742	<i>guaA</i>
_6892	carbamoyl phosphate synthase large subunit	F	5.845876	<i>carB</i>
_6981	Thymidylate synthase	F	-3.325438264	-2.613490089
_7070	Adenosine deaminase	F	-5.395557575	
_7118	Purine-cytosine permease and related proteins	F	-3.510326623	
_7472	Dihydroorotase and related cyclic amidohydrolases	F	-13.58731053	
_7541	phosphorylase superfamily protein	F	66.84982491	2.848930431
_1080	ABC-type xylose transport system, periplasmic component	G	-15.63937521	-10.51241789
_1087	Fucose dissimilation pathway protein FucU	G		-27.05596335
_1088	ribokinase	G	-23.60169473	-16.27071034
_1090	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	-24.82923512	
_1091	ABC-type sugar transport system, ATPase component	G		-10.68051645
	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems,			
_1092	permease components	G		-3.691116816
_1108	Glucose dehydrogenase	G	11.11761886	90.04839278
_1203	arabinose transport system, ATP-binding protein AraG	G	*	<i>araG2</i>
	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems,			
_1207	permease components	G	*	
_1208	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G		-32.20077007
_1212	L-arabinose transporter ATP-binding protein	G	*	*
_1214	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	-12.62152653	-7.392810384
_1313	glycogen debranching enzyme GlgX	G	-93.39208989	<i>glgX</i>
_1499	Sugar phosphate permease	G	-7.689777984	-13.18737994
_1641	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G		-214.6243735
_1642	ABC-type sugar transport system, ATPase component	G	-146.8690548	-216.1399215
	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems,			
_1644	permease components	G		-6.162591629
_1729	N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase	G	-10.71714682	
_175	Arabinose efflux permease	G		*
_1839	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	G		-12.36755239
_201	Transketolase	G	-38.55048251	<i>tktA</i>
_2418	Arabinose efflux permease	G	-4.099905692	
_2439	class II fructose-bisphosphate aldolase	G	4.222358951	<i>fbaA</i>
_2468	Sugar (pentulose and hexulose) kinases	G	-5.958649622	
_2477	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	-3.504081042	
_2544	PEP phosphonmutase and related enzymes	G	7.415597847	2.322917112
_2714	Glycogen synthase	G	-53.22105568	<i>aepX</i>
_2716	ADP-glucose pyrophosphorylase	G	-165.8187217	<i>glgA</i>
_2782	Arabinose efflux permease	G	6.853668155	<i>glgC</i>
_2940	glyoxalase	G	**	60.38541706
_2988	Predicted xylanase/chitin deacetylase	G		*
_3095	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems,	G		*

	permease components			
_3318	Arabinose efflux permease	G		*
_3485	Enolase	G	3.436818568	
_3545	Arabinose efflux permease	G	22.89357354	7.339914101
_3583	Galactose mutarotase and related enzymes	G	-33.66203953	
_3857	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	G	-4.29617733	
	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems,			
_4187	permease components	G	-8.234848852	
_4195	Sugar phosphate permease	G	-3.057630945	
_4320	Glycosidases	G	-45.39421846	
_4321	trehalose synthase	G	-37.81616195	<i>treS</i>
_4322	1,4-alpha-glucan branching enzyme	G	-122.1096692	<i>glgB</i>
_4323	Type II secretory pathway, pullulanase PulA and related glycosidases	G	-10.2554075	
_4324	malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	G	-81.33900283	<i>treZ</i>
_4325	4-alpha-glucanotransferase	G	-58.63984695	<i>malQ</i>
_4326	Maltooligosyl trehalose synthase	G	-106.1399858	<i>treY</i>
_4407	PTS system, N-acetylglucosamine-specific IIBC component	G	-56.01593564	<i>nagE</i>
_4408	Phosphotransferase system, HPr-related proteins	G	-42.17741281	
	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate			
_4436	mutase	G	2.958288455	<i>gpmA</i>
_4450	Galactose mutarotase and related enzymes	G	-8.407070434	
_4472	Arabinose efflux permease	G	2.991759148	
_4475	Uncharacterized enzyme involved in inositol metabolism	G	-18.80935631	
	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems,			
_4480	permease components	G	-12.91040351	
_4481	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	-4.859611872	
_4607	Arabinose efflux permease	G		-67.70624026
_4864	Sugar phosphate isomerases/epimerases	G	*	
_4880	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	-5.205355229	
_4882	ABC-type sugar transport system, ATPase component	G	-23.61924602	-12.66814385
	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems,			
_4883	permease components	G	-263.7775465	-76.50876895
_4930	Trehalose-6-phosphate synthase	G	-5.277403046	
_5129	Mannose-6-phosphate isomerase	G	-10.93408658	-18.16746264
_5150	Arabinose efflux permease	G		-7.587363179
	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems,			
_525	permease components	G	140.9694007	8.08161093
_526	ABC-type sugar transport system, ATPase component	G	4.487804845	2.672907791
_5363	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	-5.653798169	-4.397040294
_5367	Gluconolactonase	G	-8.924012034	
_5369	Galactose mutarotase and related enzymes	G	-9.66420994	-3.486851013
_5384	Transketolase	G	2.147315057	
_5385	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	I	7.916372691	
_5401	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase KdsA	G		6.90182839
_5560	Arabinose efflux permease	G	-12.33779111	<i>gap</i>
_5704	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G	-27.97716464	<i>kdsA1</i>
_5718	Arabinose efflux permease	G	-4.510128735	<i>zwf</i>
_5724	Sugar phosphate permease	G	-106.7988567	
_5767	Gluconolactonase	G		-9.928299896
_5773	major Facilitator Superfamily protein	G		3.92146554
_6066	Gluconolactonase	G	-78.32471792	
_6095	Glucose dehydrogenase	G	-3.026274957	
_621	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G		*
_626	Arabinose efflux permease	G	*	

_6442	PEP phosphonmutase and related enzymes	G		-6.10460815	
_6555	Triosephosphate isomerase	G	4.820303577	4.414302752	<i>tpiA</i>
_6632	3-carboxymuconate cyclase	G	-5.849038478	-2.785297189	
_6635	Glucoamylase and related glycosyl hydrolases	G	-4.462653235		
_6685	Trehalose-6-phosphate synthase	G	-16.12579177		
_6719	Sugar phosphate permease	G		-67.99179233	
_6789	Sugar phosphate isomerases/epimerases	G	-15.88034072		
_6790	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G		-29.39763576	
_6791	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems, permease components	G		-57.77106178	
_6844	Glycerol uptake facilitator and related permeases (Major Intrinsic Protein Family)	G	-14.95162042		
_6903	alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase	G	**		<i>otsA</i>
_6917	Beta-glucosidase-related glycosidases	G		-2.715893319	
_7104	Sugar phosphate permease	G	-4.477799746	-7.16859893	
_7140	ABC-type sugar transport systems, ATPase components	G	3.297790911	2.214053748	
_7142	ABC-type sugar transport systems, permease components	G	4.537235459		
_7147	Arabinose efflux permease	G		-18.25433158	
_720	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G		*	
_7225	Predicted mannose-6-phosphate isomerase	G		-31.87541567	
_741	Mannose-6-phosphate isomerase	G	-8.030285187		
_7411	Glucan phosphorylase	G	-8.511800614		
_7481	ABC-type sugar transport systems, ATPase components	G		-143.2089425	
_7484	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	-342.3951932	-1168.309213	
_7487	ABC-type sugar transport system, permease component	G		*	
_7496	Mannose-6-phosphate isomerase	G	*	*	
_7618	Arabinose efflux permease	G		-125.35847	
_7704	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	G	*		
_7705	ABC-type sugar transport system, ATPase component	G		-82.49881134	
_7708	Altronate dehydratase	G		-411.3657099	
_7774	Citrate lyase beta chain	G	8.300055211		
_911	Predicted sugar kinase	G	3.92219078	2.509094795	
_1496	Triphosphoribosyl-dephospho-CoA synthetase	H	-27.48562209		<i>mdcB</i>
_1588	cobaltochelataase, CobN subunit	H		-5.168424496	<i>cobN</i>
_1593	Precorin-2 methylase	H		-22.53092378	<i>cobI</i>
_1677	Biotin-(acetyl-CoA carboxylase) ligase	H	-97.70465626		
_1823	Methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis	H		-6.035654599	
_2067	3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase and related decarboxylases	H	**	78.30257498	
_2429	Molybdenum cofactor biosynthesis enzyme	H	-6.236345613		<i>moaC</i>
_3176	Pyridoxal phosphate biosynthesis protein	H		-6.499481482	
_3270	S-adenosylhomocysteine hydrolase	H	2.639020968		
_3288	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	H	-2.759585948		
_3566	Thiamine biosynthesis protein ThiC	H		-38.18790468	
_4291	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase	H	2.224948185		
_4338	Folylpolyglutamate synthase	H	-2.588994581		
_4428	Methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis	H	-4.374088414		
_4516	phenylacetate-CoA ligase	H	-15.65812283	-10.08087304	<i>paaF</i>
_4599	Thiamine monophosphate synthase	H		-7.681511155	
_5038	Lipoate synthase	H	-82.00980077		
_5519	Ketopantoate hydroxymethyltransferase	H	-3.560650745		
_5616	Phosphopantetheinyl transferase	H	-39.53281857	-21.93747366	
_6005	Pyridoxamine-phosphate oxidase	H	-242.0789196		
_6244	Ubiquinone biosynthesis protein COQ7	H		5.582778311	

_6324	Methylase involved in ubiquinone/menaquinone biosynthesis	H	-79.21490949	
_6607	Coproporphyrinogen III oxidase	H	5.507054748	
_6885	Dihydropteroate synthase and related enzymes	H	-3.055159694	
_7122	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	H		-118.5817652
_7149	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	H	3.856695041	2.599971486
_7150	Pyrimidine reductase, riboflavin biosynthesis	H	3.029204048	2.042447633
_7174	Coproporphyrinogen III oxidase and related Fe-S oxidoreductases	H	11.23652882	
_7450	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	H		-12.940949
_7499	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	H		-34.69718417
_7543	Protoporphyrinogen oxidase	H	3.005460822	2.881343866
_7560	7-keto-8-aminopelargonate synthetase and related enzymes	H		5.843848725
_7619	Ketopantoate reductase	H	-5.964832185	
	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase and related beta-hydroxyacid dehydrogenases	I	-12.35829461	
_1038		I		
_1493	malonate decarboxylase subunit gamma	I		-13.07319067
_1494	malonate decarboxylase, beta subunit	I	*	
_1685	enoyl-CoA hydratase/isomerase	I		-5.951979398
	Phosphatidylserine/phosphatidylglycerophosphate/cardioliipin synthases and related enzymes	I	-11.67309089	
_2352		I		
_2356	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	I	-2.488521247	-4.455612409
_2357	Acetyl-CoA acetyltransferase	I		-2.950762217
_2446	Sterol desaturase	I	-9.780925363	
_2584	Acyl-CoA dehydrogenases	I	19.64498154	
_2585	Acyl-CoA dehydrogenases	I	6.211943018	2.901305955
_2918	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	I	*	
_2984	Acyl-coenzyme A synthetases/AMP-(fatty) acid ligases	I	-20.0008316	-6.726682131
_2991	Predicted 3-hydroxylacyl-(acyl carrier protein) dehydratase	I	-13.74114541	
_3193	Acyl-CoA dehydrogenases	I		-6.916412734
_3402	Acyl-CoA dehydrogenases	I	*	
_3429	Acetyl-CoA carboxylase alpha subunit	I	6.37599421	
	Enzyme involved in the deoxyxylulose pathway of isoprenoid biosynthesis	I	3.994287087	
_3464		I		
_3764	Acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, alpha subunit	I	-3.890234638	
_3873	Acyl-coenzyme A synthetases/AMP-(fatty) acid ligases	I		11.15412963
_4490	Acyl-coenzyme A synthetases/AMP-(fatty) acid ligases	I		-14.4215772
_4514	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	I	-2.542678669	5.650377734
_4526	Acyl carrier protein phosphodiesterase	I	**	13.18387029
_4948	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	I	-7.605693943	-2.920681679
_5010	Acetyl-CoA acetyltransferase	I		-2.762906706
_5011	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase	I	-8.005573127	-4.113734272
_5348	Esterase/lipase	I	-6.460375857	
_5685	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	I		*
_5790	Acetyl-CoA acetyltransferase	I	185.3049138	
_5881	Phosphatidylserine decarboxylase	I	-58.11913176	
_5890	Acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, beta subunit	I		-2.449825271
_6187	Biotin carboxyl carrier protein	I	8.900598611	
_6410	cardioliipin synthase	I	-12.59900398	
_6535	Acyl dehydratase	I	-6.249372019	
	3-hydroxymyristoyl/3-hydroxydecanoyl-(acyl carrier protein) dehydratases	I		-12.74533068
_665		I		
_6934	(acyl-carrier-protein) S-malonyltransferase	I	3.669938553	
_7014	Acyl-CoA dehydrogenases	I	-4.819289207	
_7293	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	I		-3.345810987
_7540	Acyl-CoA hydrolase	I		3.755357414

*hemN*

*mdcD*  
*paaG*

*phaA*

*cls*



_7542	Squalene cyclase	I	9.149565498	
_7544	Phytoene/squalene synthetase	I	11.44371662	
_7661	Acetyl-CoA acetyltransferase	I	-8.396664406	
_876	Acetyl-CoA acetyltransferase	I		-2.898042374
_917	Acyl-CoA dehydrogenases	I	-26.12624059	
_169	glutamyl-trna amidotransferase	J		-7.658832815
_1829	Asp-tRNAAsn/Glu-tRNA Gln amidotransferase B subunit (PET112 homolog)	J	4.321829827	
_1830	Asp-tRNAAsn/Glu-tRNA Gln amidotransferase A subunit and related amidases	J	9.229733648	
_1847	tRNA and rRNA cytosine-C5-methylases	J	3.712298658	
_1874	RNase P protein component	J	10.9865919	
_2350	Aspartyl-tRNA synthetase	J	5.997245725	2.717907939
_2389	Glycyl-tRNA synthetase, beta subunit	J	9.496616283	
_2390	Glycyl-tRNA synthetase, alpha subunit	J	2.613887131	
_2781	Pseudouridine synthase	J	20.29083559	
_2817	Asp-tRNAAsn/Glu-tRNA Gln amidotransferase A subunit and related amidases	J	-172.2289063	
_3292	tRNA nucleotidyltransferase/poly(A) polymerase	J	-2.851563273	
_3325	Acetyltransferases, including N-acetylases of ribosomal proteins	J	35.4252817	2.852274466
_3416	Glutamyl- and glutaminyl-tRNA synthetases	J	5.218570249	
_3463	Histidyl-tRNA synthetase	J	3.735061806	
_3498	Lysyl-tRNA synthetase (class II)	J	5.133021979	
_3965	Asp-tRNAAsn/Glu-tRNA Gln amidotransferase A subunit and related amidases	J	-50.76195937	
_4345	Pseudouridylate synthase	J	-2.654185239	-2.320805446
_4390	Ribosomal protein L25 (general stress protein Ctc)	J	6.830883628	
_4463	Alanyl-tRNA synthetase	J	2.844933349	
_4487	Valyl-tRNA synthetase	J	2.432108644	
_4543	Protein chain release factor A	J	3.555614189	
_4638	Ribosomal protein L17	J	21.91120989	
_4640	Ribosomal protein S4 and related proteins	J	16.03761467	2.057272927
_4641	Ribosomal protein S11	J	15.32148183	2.579001957
_4642	Ribosomal protein S13	J	9.230536595	
_4643	Ribosomal protein L36	J	3.876358866	
_4644	Translation initiation factor 1 (IF-1)	J	14.37419796	
_4646	Ribosomal protein L15	J	23.03098246	2.529866669
_4647	Ribosomal protein L30/L7E	J	12.35308994	
_4648	Ribosomal protein S5	J	18.35729051	2.18557801
_4649	Ribosomal protein L18	J	13.77067598	
_4650	Ribosomal protein L6P/L9E	J	21.88009651	
_4651	Ribosomal protein S8	J	21.3176534	3.165485935
_4652	Ribosomal protein S14	J	51.06963452	
_4654	Ribosomal protein L24	J	32.87413044	
_4655	Ribosomal protein L14	J	5.34528869	
_4656	Ribosomal protein S17	J	37.51055225	2.202727447
_4657	Ribosomal protein L29	J	40.25913648	2.134339691
_4658	Ribosomal protein L16/L10E	J	8.084146494	2.261026344
_4659	Ribosomal protein S3	J	22.7163968	2.564563013
_4660	Ribosomal protein L22	J	30.38892145	2.602762575
_4661	Ribosomal protein S19	J	5.043927185	3.062694615
_4662	Ribosomal protein L2	J	93.94147306	2.133873957
_4663	Ribosomal protein L23	J	12.71070255	2.194660767
_4664	Ribosomal protein L4	J	16.01860423	

_4665	Ribosomal protein L3	J	9.328193623		
_4666	Ribosomal protein S10	J	53.36495998		
_4676	ribosomal protein L30	J	-26.99438814	-25.3227274	
_5075	Ribosomal protein L9	J	11.21586753		
_5076	Ribosomal protein S18	J	10.30234707		
_5078	Ribosomal protein S6	J	6.536261284		
_5133	rRNA methylases	J	6.79640359		
_5392	Leucyl-tRNA synthetase	J	6.087408042		
_5416	Ribosomal protein L13	J	12.80163643		
_5417	Ribosomal protein S9	J	7.250360599		
_5522	tRNA nucleotidyltransferase/poly(A) polymerase	J	5.533876234		
_5774	30s ribosomal protein s14	J		2.813237728	
_5895	Threonyl-tRNA synthetase	J	3.291013352		
_5898	Ribosomal protein L20	J	3.155643159		
_5899	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit	J	9.494978208		
_5900	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	J	8.945336652		
_5990	translation elongation factor G	J	16.38035819	2.053999984	<i>fusA</i>
_5991	Ribosomal protein S7	J	11.10122345		
_5992	Ribosomal protein S12	J	12.30665346	2.278631044	
_5998	Ribosomal protein L7/L12	J	15.1027605	2.800916792	
_5999	Ribosomal protein L10	J	12.56119713	2.203846743	
_6000	Ribosomal protein L1	J	22.36701596	2.136521383	
_6001	Ribosomal protein L11	J	11.00672821		
_6214	Ribosomal protein L21	J	4.071059976		
_6392	Ribosome recycling factor	J	4.488540998		
_6394	Translation elongation factor Ts	J	10.47415997		<i>tsf</i>
_6395	Ribosomal protein S2	J	6.767764568		
	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (polynucleotide phosphorylase)	J	5.122225207		
_6557	Ribonucleases G and E	J	5.749709937		
_6946	Ribosomal protein L19	J	63.65315662		
_7003	tRNA-(guanine-N1)-methyltransferase	J	8.644004167		
_7004	RimM protein, required for 16S rRNA processing	J	4.632735405		
_7005	Ribosomal protein S1	J	3.733289217		
_7033	Translation elongation factors (GTPases)	J	-72.95235207		
_72	tRNA and rRNA cytosine-C5-methylases	J	3.590400018		
_7201	Isoleucyl-tRNA synthetase	J	13.38791174		
_7205	Translation elongation factors (GTPases)	J	-4.167192807		<i>fusA</i>
_7224	Ribosomal protein S20	J	10.22939151		
_7255	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins	K	-13.20978248		
_1079	RNA polymerase sigma factor RpoD	K	4.816020133		<i>rpoD</i>
_1123	Transcriptional regulators	K		*	
_117	Transcriptional regulator containing an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain	K		*	
_1229	Predicted transcriptional regulators	K	-5.401449125	-5.533025122	
_1279	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins	K	-94.94398716		
_1340	Transcriptional regulator	K	-5.086086768		
_1386	Transcriptional regulator	K	-5.636747183		
_1419	Transcriptional regulator	K	-5.843771564		
_1688	LysR family transcriptional regulator	K	-173.119942		<i>lysR</i>
_185	Transcriptional regulator	K	62.5224436		
_2075	Transcriptional regulators	K		-74.53486314	
_2196	Predicted transcriptional regulators	K		-12.39389581	
_2197	Transcriptional regulator, contains sigma factor-related N-terminal	K		-3.731342561	
_2483					

	domain			
_2520	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins	K		-513.355525
_2684	Transcriptional regulator	K	-7.762502887	
_2756	Predicted transcriptional regulator	K	-11.4083	
_2778	Transcription elongation factor	K	2.126046325	
_278	Transcriptional regulator	K	-18.3128464	
_2795	Transcriptional regulator	K	-3.384058307	-3.370706808
_295	Transcriptional regulators	K		-28.56790305
_3029	Transcriptional regulators	K		*
	Transcriptional regulator containing an amidase domain and an AraC-			
	type DNA-binding HTH domain	K		*
_3088	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins	K	-5.252307625	
_311	Transcriptional regulator	K	-24.19241354	
_3173	Transcriptional accessory protein	K	5.506495553	
_3449	Predicted transcriptional regulator	K	-12.65962205	
_3507	Transcriptional regulator	K	-16.41503367	
_3908	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma54			
	homolog	K	-167.3861651	-4.798200922
_3931	Transcriptional regulator	K	-15.98394981	
_4079	Transcriptional regulator	K		-11.93313538
_4192	Transcriptional regulator containing an amidase domain and an AraC-			
	type DNA-binding HTH domain	K		-4.823394136
_4267	DNA-directed RNA polymerase, sigma subunit (sigma70/sigma32)	K	2.418177142	3.01866964
_4402	Transcriptional regulator	K	-5.715051663	
_4464	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit/40 kD subunit	K	27.48297272	
_4639	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins	K	46.14948552	11.75355642
_4808	Transcriptional regulator	K	-184.3039131	
_4823	Transcriptional regulators	K	-8.360965094	
_4885	Predicted transmembrane transcriptional regulator (anti-sigma factor)	K	-15.0896589	
_5079	Transcriptional regulators	K	-12.48734463	-14.37329326
_5128	Predicted transmembrane transcriptional regulator (anti-sigma factor)	K	*	
_5154	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma24			
	homolog	K	-34.85814005	
_5155	Transcriptional regulator	K	-16.01718111	
_5292	Transcriptional regulator	K		*
_5406	Transcriptional regulator	K	-3.336416449	-3.113489046
_5462	Transcriptional regulator	K	-2.698077465	
_550	Predicted transcriptional regulators	K	-7.164407679	
_5552	Transcriptional regulator	K	-143.7109893	
_5563	transcription factor	K	*	*
_5621	transcriptional regulator	K	*	
_5622	Predicted transcriptional regulators	K	3.120681547	*
_5671	Transcriptional regulator	K		
_5722	Transcriptional regulators	K	-11.40828055	
_5744	DNA-directed RNA polymerase, beta' subunit/160 kD subunit	K	5.750013659	
_5996	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit/140 kD subunit	K	7.138406876	
_5997	Transcription antiterminator	K	20.66337127	
_6002	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins	K		17.53339787
_6015	Transcriptional regulators	K	-25.1398883	-6.433780984
_6152	Transcriptional regulator	K	-7.588892649	
_6428	Transcriptional regulator	K	-14.14551444	-6.057245209
_6637	Predicted transcriptional regulator	K		-86.25639001
_675	Transcriptional regulators	K	-206.2763914	
_6793	Transcription elongation factor	K		-2.345802763
_6891				

_6922	dsRNA-specific ribonuclease	K	-2.013204022	
_6960	Predicted transcriptional regulator	K	-12.16213362	
_7054	Predicted transcriptional regulators	K	-43.66137274	
_7131	Predicted transcriptional regulators	K		3.597641891
_7213	Cold shock proteins	K		-3.866275681
	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit, sigma24			
_7240	homolog	K	-7.739631196	
_7386	Predicted transcriptional regulators	K	-5.686481812	
_7395	Transcriptional regulator	K		-6.735778943
_7425	Transcriptional regulator	K	-5.366172687	-3.880437203
_7430	Transcriptional regulator	K	-27.65529825	
_7480	Transcriptional regulators	K		-25.09996118
_7644	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins	K	-24.93206389	
_7654	Transcriptional regulator	K	-138.7146164	
_7659	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins	K	*	
_7662	Transcriptional regulators	K	-19.63809887	
_7776	Transcriptional regulators	K		4.816769897
_1490	Alkylated DNA repair protein	L	-16.45760911	
	Superfamily II DNA/RNA helicase required for DNA uptake (late			
_1535	competence protein)	L		-5.008844458
_1568	3-methyladenine DNA glycosylase	L	-36.18064327	
_1616	dna-binding protein	L		-4.955094602
_1652	Retron-type reverse transcriptase	L		-2.364623531
_1827	Exonuclease III	L	3.104001036	
_1869	DNA gyrase inhibitor	L	-17.59257866	
	Type IIA topoisomerase (DNA gyrase/topo II, topoisomerase IV), B			
_1870	subunit	L	5.15203247	
_1892	3-methyladenine DNA glycosylase/8-oxoguanine DNA glycosylase	L	-7.048360956	-7.797178791
_198	DNA ligase D	L	-23.02929009	
_1986	Superfamily I DNA and RNA helicases	L	11.82047772	
_2559	Transposase and inactivated derivatives	L	-11.64492874	
_273	ATP-dependent DNA ligase	L	*	
_28	dna-binding protein	L	*	
_3593	Superfamily I DNA and RNA helicases	L	-13.48069789	-6.728179162
_3687	Superfamily I DNA and RNA helicases	L	-13.13524277	
_3912	Uracil-DNA glycosylase	L	-70.15840979	
	ATP-dependent exoDNase (exonuclease V), alpha subunit - helicase			
_4081	superfamily I member	L		-4.092166438
_43	Site-specific recombinases, DNA invertase Pin homologs	L	-19.79348908	
_4556	dna-binding protein	L		-4.961187526
_4998	Predicted eukaryotic-type DNA primase	L	-4.200982781	
_5045	DNA uptake protein and related DNA-binding proteins	L	-9.98584578	
_5331	Single-stranded DNA-binding protein	L	2.819925432	
_5426	Holliday junction resolvase, endonuclease subunit	L	-152.368511	
	Type IIA topoisomerase (DNA gyrase/topo II, topoisomerase IV), B			
_5743	subunit	L	-10.3842389	
_5846	Helicase subunit of the DNA excision repair complex	L	5.197917148	
_5865	Site-specific DNA methylase	L	10.39961454	
_5882	Excinuclease ATPase subunit	L	-9.539409594	
_5908	Transposase and inactivated derivatives	L	-4.018014051	-4.568967612
_5932	Transposase and inactivated derivatives	L		-10.91480731
_5964	ATP-dependent DNA ligase	L	*	
_5993	Superfamily II DNA helicase	L	9.3464319	
_6010	Transposase and inactivated derivatives	L	-12.79409081	

*ligD*

_6284	Site-specific recombinase XerD	L		-13.2818707	
_6493	Transposase and inactivated derivatives, TnpA family	L	-67.48298321		
_6512	Transposase and inactivated derivatives	L	-5.290040925		
_6516	transposase	L		-17.59429572	
_6669	Type IIA topoisomerase (DNA gyrase/topo II, topoisomerase IV), A subunit	L	4.793656789		
_6897	Ribonuclease HI	L	3.2200369		
_6966	Superfamily I DNA and RNA helicases	L	3.797421709	3.872685201	
_7032	Bacterial nucleoid DNA-binding protein	L	4.068746286		
_7041	Type IIA topoisomerase (DNA gyrase/topo II, topoisomerase IV), A subunit	L	3.82859174		
_7093	Integrase	L		-10.66178044	
_7116	ATPase related to the helicase subunit of the Holliday junction resolvase	L		-3.117076111	
_881	DNA polymerase elongation subunit (family B)	L		-6.495098766	
_1013	Outer membrane protein (porin)	M	15.32686157	4.548271178	
_1019	Predicted sugar nucleotidyltransferases	M	6.459013786		
_1107	Outer membrane protein (porin)	M	65.29871692	**	
_1131	Glycosyltransferases, probably involved in cell wall biogenesis	M	-104.4889917	-137.7192689	
_1442	Protein involved in cellulose biosynthesis (CelD)	M	*		
_1453	Periplasmic glycine betaine/choline-binding (lipo)protein of an ABC-type transport system (osmoprotectant binding protein)	M	22.91346215	212.2043612	<i>opuBB</i>
_1591	Predicted glycosyltransferase	M		-95.73662711	
_1618	Outer membrane protein (porin)	M		-6.84166895	
_1667	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacC	M	4.355492327		<i>dacC</i>
_1753	rare lipoA family protein	M	28.11287548		<i>rlpA</i>
_1791	Membrane-fusion protein	M		*	
_18	Glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis	M	*		
_1951	Predicted S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase involved in bacterial cell division	M	-3.609490735		
_2368	Organic solvent tolerance protein OstA	M	2.477641911		<i>ostA</i>
_2461	Membrane-fusion protein	M	6.285664593		
_2491	Small-conductance mechanosensitive channel	M	-6.530420208		
_2580	lipoprotein	M	*		
_2723	lipoprotein	M		-5.221744789	
_276	Bacterial lipocalin	M	*		
_2779	Membrane protein involved in colicin uptake	M	3.555996583		
_2801	Outer membrane protein (porin)	M	**		
_287	Outer membrane protein (porin)	M		*	
_3023	Outer membrane protein (porin)	M	2873.066823	2.675955554	
_3059	UDP-glucose pyrophosphorylase	M		-108.9490282	
_3060	Predicted UDP-glucose 6-dehydrogenase	M		-79.66664397	
_3065	Polysaccharide export lipoprotein	M		*	<i>bceE</i>
_3069	Glycosyltransferase	M		*	
_3070	capsular biosynthesis protein	M	*		
_3289	Soluble lytic murein transglycosylase and related regulatory proteins (some contain LysM/invasin domains)	M	-3.084240787		
_3298	UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase	M	4.236728322		<i>glmU</i>
_3299	Glucosamine 6-phosphate synthetase, contains amidotransferase and phosphosugar isomerase domains	M	4.56269679		
_3448	Small-conductance mechanosensitive channel	M	-2.210919937		
_3570	Uncharacterized lipoprotein	M	5.759318497		
_3783	Membrane proteins related to metalloendopeptidases	M	45.31889407		

	Soluble lytic murein transglycosylase and related regulatory proteins			
_3858	(some contain LysM/invasin domains)	M		*
_4235	Outer membrane protein (porin)	M		205.32295
_4589	UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase	M	4.495558553	
_4624	Membrane carboxypeptidase/penicillin-binding protein	M	3.659655432	
_4763	Outer membrane protein (porin)	M		*
_4928	Glycosyltransferase	M	-12.39927367	-5.694993439
_4931	Small-conductance mechanosensitive channel	M	-9.546034438	
_4987	Large-conductance mechanosensitive channel	M	-2.835099444	
_4992	Uncharacterized protein involved in outer membrane biogenesis	M	-923.4934736	-116.5173413
_5069	Cell wall-associated hydrolases (invasion-associated proteins)	M	-8.440128713	
_5129	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	M		-18.16746264
_5483	Uncharacterized protein involved in exopolysaccharide biosynthesis	M	-159.623047	
_5484	GDP-D-mannose dehydratase	M	*	
_5490	Periplasmic protein involved in polysaccharide export	M		*
_5491	Glycosyltransferase	M		*
_5596	Glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis	M		-9.506230265
_5598	Sugar transferases involved in lipopolysaccharide synthesis	M	-11.19280991	-20.3887458
_5599	Periplasmic protein involved in polysaccharide export	M	-8.978630806	-7.104380132
_5600	Uncharacterized protein involved in exopolysaccharide biosynthesis	M	-34.8755028	-54.15867014
_5603	Glycosyltransferase	M	-20.27437843	
_5604	Glycosyltransferase	M		-37.23122788
_5609	Glycosyltransferase	M		*
_5610	Glycosyltransferase	M		-18.14459646
_5618	Glycosyltransferases involved in cell wall biogenesis	M		*
_5623	Glycosyltransferase	M		*
_5641	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	M	4.151197667	
_5646	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase	M	2.719151416	
_5651	Glycosyltransferase	M		-2.240443718
_5690	Outer membrane protein (porin)	M		-6.74200148
_5832	Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes	M	27.26692731	
_6096	Outer membrane protein (porin)	M	-2.391152263	
_6236	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	M	-2.018593913	
_6245	Outer membrane protein (porin)	M		-7.269243919
_6385	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase	M	4.215866831	
_6386	Outer membrane protein	M	3.198368189	
_6387	Outer membrane protein/protective antigen OMA87	M	5.005824983	
_6709	OmpC family outer membrane porin	M		-5.483548534
_6735	OmpA/MotB family outer membrane protein	M		-2.751491563
_6894	FOG: LysM repeat	M	-2.624308067	
_6901	Glycosyltransferase	M	2.346258025	
_6924	elongation factor 4	M	2.818095235	
_7028	ADP-heptose synthase, bifunctional sugar kinase/adenylyltransferase	M	2.77136061	
	Outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo)proteins	M		
_7043		M	3.711090075	
_7083	Outer membrane protein (porin)	M	9.338259773	13.54191407
_7102	Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes	M	-30.36146328	
	Soluble lytic murein transglycosylase and related regulatory proteins			
	(some contain LysM/invasin domains)	M		
_7160		M	29.16295537	
_7345	Membrane carboxypeptidase (penicillin-binding protein)	M	-14.38385437	
_7441	Outer membrane protein (porin)	M	-8.687955409	
_7749	Uncharacterized protein involved in outer membrane biogenesis	M	-4.931204137	
_975	Glycosyltransferases, probably involved in cell wall biogenesis	M	-6.942822457	
_1022	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and an	MC		-11.89479871

	HTH DNA-binding domain			
_1048	Outer membrane protein	MC	-1032.471327	
_1111	Fe2+-dicitrate sensor, membrane component	MC	3.389188105	
	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and an			
_1233	HTH DNA-binding domain	MC		-4.128697637
_1234	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		-4.527189783
_1285	Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase	MC	13.75214133	
_1322	P pilus assembly protein, chaperone PapD	MC	-18.69775723	
_1367	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	14.30848013	
	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a			
_1439	winged-helix DNA-binding domain	MC	*	
_1445	Phenylpropionate dioxygenase and related ring-hydroxylating			
	dioxygenases, large terminal subunit	MC	-43.45302295	
	Transcriptional regulators containing a DNA-binding HTH domain and			
	an aminotransferase domain (MocR family) and their eukaryotic			
_1527	orthologs	MC	-4.981324297	
	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a			
_1539	winged-helix DNA-binding domain	MC	-2.657037778	
_1544	Lactate dehydrogenase and related dehydrogenases	MC		*
_1600	Na+/proline symporter	MC	-6.550157207	
	Transcriptional regulators containing a DNA-binding HTH domain and			
	an aminotransferase domain (MocR family) and their eukaryotic			
_1615	orthologs	MC	-42.01785634	
_1666	D-alanine transaminase	MC	7.364359913	<i>dat</i>
	Response regulator consisting of a CheY-like receiver domain and a			
_1813	Fis-type HTH domain	MC	4.201562159	
_1901	Outer membrane protein	MC		2.844674163
_1913	Type II secretory pathway, component PulD	MC	4.238031407	-2.704630767 <i>gspD</i>
	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a			
_1929	winged-helix DNA-binding domain	MC	-2.055288635	
_1966	Acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	MC	-6.062908935	-5.492955722
	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems,			
_1969	periplasmic component/domain	MC		-8.927443039
_2243	membrane protein	MC		*
	Transcriptional regulator containing GAF, AAA-type ATPase, and			
_2283	DNA binding domains	MC	-5.374068862	
_2408	Superfamily II DNA and RNA helicases	MC	14.95977435	
	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a			
_2420	winged-helix DNA-binding domain	MC	-50.73795306	
_2445	Phospholipase/lecithinase/hemolysin	MC		-17.32048606
_2463	outer membrane protein <i>oprM</i>	MC	5.156004465	<i>oprM</i>
_2547	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		-32.37405582
	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit 5 (chain L)/Multisubunit			
_2574	Na+/H+ antiporter, MnhA subunit	MC		-14.98728271
	Formate hydrogenlyase subunit 3/Multisubunit Na+/H+ antiporter,			
_2576	MnhD subunit	MC	-5.778009783	
	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a			
_2638	winged-helix DNA-binding domain	MC	-29.41456372	
	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease			
_2693	components	MC		*
	Transcriptional regulators containing a DNA-binding HTH domain and			
	an aminotransferase domain (MocR family) and their eukaryotic			
_2708	orthologs	MC		-16.89255008
_2734	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems,	MC	16.96849304	

	periplasmic component/domain				
_2754	gcn5 family acetyltransferase	MC	-105.7098901	-10.78823837	
_2789	chemotaxis response regulator methyltransferase CheB	MC	-35.3280584	-17.51763189	<i>cheB</i>
_2790	Chemotaxis protein histidine kinase and related kinases cheA	MC		-3.656307958	
_2810	Phenylpropionate dioxygenase and related ring-hydroxylating dioxygenases, large terminal subunit	MC	-3.474070556	-3.193936444	
_2813	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	MC	-32.76448641		
_2877	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases	MC		-206.6636595	
_2885	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	MC		*	
_2905	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	MC		-6.438776748	
_2907	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain	MC	-8.182161231		
_3159	Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	MC	*		
_3204	chemotaxis protein CheA	MC		-19.21905764	<i>cheA</i>
_3205	chemotaxis protein CheW	MC		-2.613117801	<i>cheW</i>
_3207	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		-5.514401471	
_3209	chemotaxis protein methyltransferase	MC		-45.96609042	<i>cheR</i>
_3210	chemotaxis protein CheD	MC		-33.01410837	<i>cheD</i>
_3211	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase CheB	MC		-5.947265557	<i>cheB</i>
_3213	chemotaxis protein	MC		-2.653771835	<i>cheZ</i>
_3224	flagellar biosynthesis anti-sigma factor FlgM	MC		-7.246295036	<i>flgM</i>
_3242	flagellar biosynthetic protein FliP	MC		-16.14409943	<i>fliP1</i>
_3250	Flagellar biosynthesis/type III secretory pathway ATPase	MC	-6.476028735		
_3255	flagellar protein FliS	MC		-56.77161129	<i>fliS</i>
_3276	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components	MC		-20.88878933	
_3278	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component	MC		-6.915204829	
_3290	Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases	MC	-5.351210317		
_3295	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	MC	5.040276649		
_3311	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain	MC	-5.558711176		
_3315	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and an HTH DNA-binding domain	MC	-5.135073875		
_3357	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		-30.67099729	
_3376	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and an HTH DNA-binding domain	MC		-2.533636163	
_3446	Rad3-related DNA helicases	MC	-2.31568236		
_3781	Ferredoxin subunits of nitrite reductase and ring-hydroxylating dioxygenases	MC	-49.3549228	**	
_3793	exported protein	MC	*		
_3867	2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase and related FAD-dependent oxidoreductases	MC		7.612473614	
_3904	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain	MC	-4.999236161		
_4024	Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase	MC	-13.80176534		
_4169	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	MC	-65.28553178	-33.5388964	



_4174	Acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	MC		-17.79961312
_4185	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		-25.95643233
_4196	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	MC	-12.66282131	
_4214	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain	MC		-54.04155903
_4293	Phenylpropionate dioxygenase and related ring-hydroxylating dioxygenases, large terminal subunit	MC	3.530481874	
_4359	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain	MC		-8.581389483
_4380	Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA domain (Ntr-type)	MC	2.229117898	
_4389	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase	MC		-2.59744158
_44	Methylase of chemotaxis methyl-accepting proteins	MC	-4.435964381	-3.056233798
_4458	NTP pyrophosphohydrolases including oxidative damage repair enzymes	MC	-2.804578689	
_4474	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		-14.20308544
_451	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain	MC	-12.33370525	-5.560811551
_46	Methylase of chemotaxis methyl-accepting proteins	MC	-28.58291717	
_4610	NADPH-dependent glutamate synthase beta chain and related oxidoreductases	MC	2.80012838	2.61979037
_4636	Thiol:disulfide interchange protein	MC	3.230033195	
_4766	N-methylhydantoinase B/acetone carboxylase, alpha subunit	MC		-28.3639701
_4767	N-methylhydantoinase A/acetone carboxylase, beta subunit	MC	*	
_4867	Lactate dehydrogenase and related dehydrogenases	MC	-6.530221672	
_4949	Acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	MC	-20.14060619	-13.72127819
_4989	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain	MC	-4.851965499	
_5009	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	MC	-2.941583074	-3.447707407
_5043	Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism	MC		-2.163109208
_5043	Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism	MC	-13.27866551	
_5288	sorbitol dehydrogenase	MC	*	
_5400	Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase	MC		7.013468984
_5402	H <sup>+</sup> /gluconate symporter and related permeases	MC	4.117444296	3.400010076
_5409	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain	MC		-7.178621012
_5506	Glutamine synthetase adenylyltransferase	MC	-2.30136674	
_5516	Anthranilate/para-aminobenzoate synthases component I	MC	14.46162831	4.912758815
_5643	ABC-type polysaccharide/polyol phosphate export systems, permease component	MC	13.92003587	
_5652	Acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	MC	-16.25384161	
_5703	Transcriptional regulator/sugar kinase	MC	-14.81201706	
_5723	photosystem reaction center subunit h	MC		-2.105344767
_5766	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases	MC		-3.973011652
_587	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain	MC	*	
_5967	Threonine dehydrogenase and related Zn-dependent dehydrogenases	MC	*	
_6062	Fe <sup>2+</sup> -dicitrate sensor, membrane component	MC	20.11522519	7.380263817
_6155	Dihydrodipicolinate synthase/N-acetylneuraminatase lyase	MC	*	
_6175	Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases	MC		*
_6246	Acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	MC	-5.219473056	-6.967717878
_6372	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily	MC	24.37446378	7.026024482

_6377	Membrane protein implicated in regulation of membrane protease activity	MC		-6.392328843
_6425	Superfamily II DNA and RNA helicases	MC	17.42963826	
_6538	NTP pyrophosphohydrolases including oxidative damage repair enzymes	MC		-4.796374236
_655	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase	MC		-80.76306691
_656	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase	MC		*
_6565	Ketol-acid reductoisomerase	MC	4.107600204	
_6567	Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	MC	2.918516423	
_6626	Thiamine pyrophosphate-requiring enzymes [acetolactate synthase, pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, phosphonopyruvate decarboxylase]	MC	-4.916921147	
_6648	Na+/proline symporter	MC		-32.05064555
_6659	Transcriptional regulators containing a DNA-binding HTH domain and an aminotransferase domain (MocR family) and their eukaryotic orthologs	MC	8.198756399	
_670	3-oxoacyl-acyl synthase	MC		-33.4903997
_6768	Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase	MC	-5.258753548	
_6825	Predicted nucleoside-diphosphate sugar epimerases	MC	-3.745029973	
_6857	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		*
_6875	Exopolyphosphatase	MC	-2.843759899	-2.226504155
_6931	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase	MC	3.480980691	
_7023	Deacetylases, including yeast histone deacetylase and acetoin utilization protein	MC		-12.75573313
_7027	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases	MC		-2.256643972
_7039	Phosphoserine aminotransferase	MC	4.503747497	
_7052	2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase and related FAD-dependent oxidoreductases	MC	-8.52926368	
_7072	Cytosine deaminase and related metal-dependent hydrolases	MC	-3.819022992	
_7077	membrane protein	MC		4.692021337
_7229	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport systems, permease components	MC		*
_7230	ABC-type dipeptide/oligopeptide/nickel transport system, ATPase component	MC		-18.00803913
_7303	Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism	MC		-14.74274818
_7336	Chemotaxis protein; stimulates methylation of MCP proteins	MC	-15.62690322	-13.51527714
_7406	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain	MC		-17.13924095
_7469	NADPH-dependent glutamate synthase beta chain and related oxidoreductases	MC	-19.04110549	
_7474	2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase and related FAD-dependent oxidoreductases	MC		-15.75692372
_7546	Chemotaxis protein CheC, inhibitor of MCP methylation cheC	MC		-15.68082403
_7551	H+/gluconate symporter and related permeases	MC	2.737698469	
_759	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain	MC		3.460656235
_7652	Transcriptional regulators containing a DNA-binding HTH domain and an aminotransferase domain (MocR family) and their eukaryotic orthologs	MC		-3.923504686
_7664	membrane protein	MC	-29.8555321	
_7676	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		-361.3459706
_7678	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems,	MC	-302.0115753	-390.0265553

	periplasmic component/domain				
_7693	H <sup>+</sup> /gluconate symporter and related permeases	MC		-11.57778891	
_77	NADPH:quinone reductase and related Zn-dependent oxidoreductases	MC	*		
_7707	hydrolase	MC		*	
_771	Methylase of chemotaxis methyl-accepting proteins	MC	-33.66839813	-17.91074839	
	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain				
_7712	alcohol dehydrogenases)	MC		-3.080429616	
_796	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC		-337.1875392	
	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems,				
_854	periplasmic component/domain	MC	-10.378338	-7.560319675	
_855	membrane protein	MC	*		
_863	Serine/threonine protein kinase	MC	-3.408472729		
_963	Dihydroxyacid dehydratase/phosphogluconate dehydratase	MC	-13.91931628		
_985	mfs transporter	MC		-3.218251786	
_1046	Flagellar motor protein	N	-73.03692032		
_1990	Flagellar biosynthesis protein FliC	N		-13.87540753	<i>fliC</i>
_1991	Flagellar hook-associated protein fliD1	N		-78.02655625	<i>fliD1</i>
_1992	flagellar protein fliT	N	*	*	
_2008	Flagellar motor component motA	N		-14.16020924	<i>motA</i>
_2009	Flagellar motor protein motB	N		-13.4158086	<i>motB</i>
_3053	Flagellar motor protein	N	**		
_3227	flagellar basal-body rod protein FlgC	N	8.051122129		<i>flgC</i>
_3229	Flagellar hook protein FlgE	N	28.45203883	-4.041736477	
_3230	flagellar basal-body rod protein FlgF	N		-6.854198971	<i>flgF</i>
_3239	flagellar hook-associated protein 3	N		-31.60457165	<i>flgL</i>
_3245	flagellar motor switch protein FliM	N		-6.371425582	<i>fliM</i>
_3252	flagellar motor switch protein G	N		-4.135278335	<i>fliG</i>
_7365	flagellar transcriptional regulator flhD	N	-2.74554939	-2.398197703	<i>flhD</i>
_7366	flagellar transcriptional regulator gene flhC	N	-2.507844075	-2.25751259	<i>flhC</i>
	Trypsin-like serine proteases, typically periplasmic, contain C-terminal				
_1076	PDZ domain	O	-43.74629536		
_1135	Cytochrome c biogenesis factor	O		-24.98034647	
_1510	Putative protein-S-isoprenylcysteine methyltransferase	O		-9.394026774	
	Xanthine and CO dehydrogenases maturation factor, XdhC/CoxF				
_1781	family	O	-5.406796043	-3.746984209	
_1811	ATP-dependent protease HslVU (ClpYQ), peptidase subunit	O	4.981501244	7.230414362	
_1812	ATP-dependent protease HslVU (ClpYQ), ATPase subunit	O	9.358702674	12.11772966	
_1856	thioredoxin	O		16.01150547	
	Trypsin-like serine proteases, typically periplasmic, contain C-terminal				
_1882	PDZ domain	O	14.34799146	10.07973494	
_1994	Predicted O-linked N-acetylglucosamine transferase, SPINDLY family	O		-7.83249054	
_2071	Pyruvate-formate lyase-activating enzyme	O	553.8299658	5.541769435	
_2327	Chaperonin GroEL (HSP60 family)	O	3.83950079	6.120936974	<i>groL</i>
_2328	10 kDa chaperonin GroS	O		8.461612732	<i>groS</i>
_2331	heat-shock protein hsp20	O	-16.90556125		
_2370	Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase	O	2.943952455		
_3031	Glutathione S-transferase	O	-35.91585398		
_3291	Glutathione S-transferase	O	-14.13062022	-5.374451686	
_3434	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) - cyclophilin family	O	29.29884552		
_3435	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase) - cyclophilin family	O	25.10250052		
_3503	DnaJ-domain-containing proteins 1	O	-4.295948248		
_3550	Glutathione S-transferase	O	-8.811453885	-6.767780319	
_3576	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	O	-3.356787295		
_3769	Thioredoxin reductase	O		3.156058378	

_3795	Predicted redox protein, regulator of disulfide bond formation	O	-13.73521221		
_3881	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	O	-7.117150614		
_3919	Molecular chaperone (small heat shock protein)	O	18.3391372		
_4092	Predicted protease	O	-14.35824506		
_4212	Thioredoxin reductase	O		*	
_4288	Metal-dependent proteases with possible chaperone activity	O	3.907222903		
_4329	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerases I	O	-6.430165297		
_4422	Cytochrome oxidase assembly factor	O	-7.997264871	-10.10225364	
_4434	Glutaredoxin and related proteins	O	4.164309324		
_4631	ResB protein required for cytochrome c biosynthesis	O		-3.073114864	<i>grxC</i>
_4964	Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase	O	7.181895502		
_4966	ATP-dependent Lon protease, bacterial type	O	2.564003851		
_4970	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (trigger factor)	O	4.682518038		
_4980	Peroxiredoxin	O	-5.853362998		
_5030	Thioredoxin domain-containing protein	O	5.982410917	3.328200563	
_5047	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit	O	10.84347034	5.931349113	
_5122	Putative arginyl-tRNA:protein arginyltransferase	O	-16.32905228		
_5513	Molecular chaperone GrpE (heat shock protein)	O	15.70366078	3.938810454	<i>grpE</i>
_5514	Molecular chaperone	O	12.06558784	3.873553443	<i>dnaK</i>
_5515	DnaJ-class molecular chaperone with C-terminal Zn finger domain	O	13.79475857	3.070530199	<i>dnaJ</i>
_5533	Peptide methionine sulfoxide reductase	O	2.5144887	3.820527696	
_5540	Thioredoxin domain-containing protein	O		4.695027168	
_5624	Co-chaperonin GroES (HSP10)	O	64.87399874	4.294468659	
_5625	Chaperonin GroEL (HSP60 family)	O	41.79547451	3.845710395	<i>groL</i>
_5953	Chaperonin GroEL (HSP60 family)	O	2.059460567	2.35654048	<i>groL</i>
_5956	Molecular chaperone (small heat shock protein)	O	-50.21948869		
_6376	Membrane protease subunits, stomatin/prohibitin homologs	O	-3.563202511	-3.322476828	
_6655	Molecular chaperone, HSP90 family	O	41.35322578		<i>htpG</i>
_6794	Protein-L-isoaspartate carboxylmethyltransferase	O		-2.738820007	
_6802	Urease accessory protein UreH	O		-49.52637188	
	Xanthine and CO dehydrogenases maturation factor, XdhC/CoxF				
_7069	family	O	-29.15791586		
_733	cellulose synthase operon protein BscC	O		-3.943848522	<i>bcsC</i>
_74	Membrane-bound serine protease (ClpP class)	O	-186.6702651		
_7445	Alkyl hydroperoxide reductase, large subunit	O		2.828356608	
_7446	Peroxiredoxin	O	2.747621912		
_7730	Hydrogenase maturation factor	O	10.67217986		
_7738	Hydrogenase maturation factor	O		-6.353374432	
_1144	TonB-dependent receptor	P	475.29874	11.49959178	<i>tonB</i>
	Outer membrane receptor for ferric coprogen and ferric-rhodotorulic				
_1345	acid	P	14.28698646	131.8655148	
_152	cadmium-translocating P-type ATPase	P		-146.5569511	<i>cadA</i>
_1610	Di- and tricarboxylate transporters	P	-9.587015998		
_1783	Cyanate permease	P	16.02827698		
	Outer membrane receptor for ferric coprogen and ferric-rhodotorulic				
_204	acid	P		-7.139550484	
_2145	Sulfate permease and related transporters (MFS superfamily)	P		-8.627264012	
_22	DNA-binding ferritin-like protein (oxidative damage protectant)	P	-205.5329899		
_2394	Uncharacterized protein involved in cation transport	P	9.992603999		
	ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface				
_2475	adhesin	P		-7.435664391	
_279	chemotaxis sensor histidine kinase CheA	P	-9.295685574		<i>cheA</i>
_2802	Phosphate/sulphate permeases	P		3.173611425	
_2861	Catalase	P	-114.1013788		

_3560	Bacterioferritin (cytochrome b1)	P	-49.08709498		
_3846	Bacterioferritin (cytochrome b1)	P	-97.77711561	-4.248950767	<i>bfr</i>
_3896	Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport	P		-95.612125	
_3963	nitrile hydratase	P		*	
_3964	nitrile hydratase	P	*		
_4056	Na+/phosphate symporter	P	-5.153063194		
_4078	Outer membrane receptor for monomeric catechols	P	-135.8182049		
_4294	Rhodanese-related sulfurtransferase	P	-7.102605563		
_4879	Mg2+ and Co2+ transporters	P	-5.572827707		
_58	Chloride channel protein EriC	P		4.436686566	
_5804	NhaP-type Na+/H+ and K+/H+ antiporters	P	-12.76546392	-4.312517683	
_5840	Hemin uptake protein	P	3.749184108	41.1562054	
_5843	High-affinity Fe2+/Pb2+ permease	P	14.68983743	4.291213103	
_6159	High-affinity nickel permease	P		-11.20114243	
_6733	Cu/Zn superoxide dismutase	P	-4.317227571		
_6876	Polyphosphate kinase	P		-10.00882342	
_7018	ABC-type metal ion transport system, permease component	P	94.02908547		
_7324	Fe2+ transport system protein B	P	7.264040246		<i>feoB</i>
_7431	Nitrate/nitrite transporter	P		-20.27531932	
_789	ABC-type Fe3+-hydroxamate transport system, periplasmic component	P		-90.92209266	
_85	ABC-type sulfate transport system, periplasmic component	P		-8.721283881	
_862	Na+/phosphate symporter	P	-8.477451311	-6.066384467	
_918	ABC-type phosphate/phosphonate transport system, periplasmic component	P	-23.45361468		
_974	Catalase	P	-2.219453451		
_1004	Protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha subunit	Q	662.9027271	42.06589466	<i>pcaG</i>
_1005	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit	Q	57.61005041	106.762943	<i>pcaH</i>
_1172	ABC-type transport system involved in resistance to organic solvents, auxiliary component	Q	-5.301531525		
_1673	ABC-type transport system involved in resistance to organic solvents, periplasmic component	Q	-2.47445		
_2115	Alkyl sulfatase and related hydrolases	Q	-10.80635132		
_2234	Phytoene dehydrogenase and related proteins	Q		*	
_2800	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Q	7.857758583	28.45478394	
_2890	Imidazolonepropionase and related amidohydrolases	Q	-73.28080034		
_3331	phenylacetic acid degradation protein PaaB	Q		8.080313514	<i>paaB</i>
_4295	Dienelactone hydrolase and related enzymes	Q		-6.767497161	
_4594	toluene tolerance family protein	Q	3.478773495	2.650967778	
_4596	outer membrane lipid asymmetry maintenance protein MlaD	Q	41.7817185		<i>mldD</i>
_4961	Predicted ABC-type transport system involved in lysophospholipase L1 biosynthesis, ATPase component	Q	-2.913594181		
_5355	N-acyl-D-aspartate/D-glutamate deacylase	Q	-9.171569174		
_5557	Homogentisate 1,2-dioxygenase	Q	-3.744722341		
_5558	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (catechol pathway)	Q	-3.379283621		
_5612	Thioesterase domains of type I polyketide synthases or non-ribosomal peptide synthetases	Q		-39.95081714	
_5613	Polyketide synthase modules and related proteins	Q	-18.71337379	-33.13958438	
_5620	Predicted enzyme involved in methoxymalonyl-ACP biosynthesis	Q		-337.4540112	
_6590	Predicted ABC-type transport system involved in lysophospholipase L1 biosynthesis, permease component	Q		-9.810356068	
_6644	Uncharacterized protein involved in benzoate metabolism	Q		-2.885054011	
_6837	Phytanoyl-CoA dioxygenase	Q	23.6943451		

	Protein involved in biosynthesis of mitomycin antibiotics/polyketide				
_691	fumonisin	Q	-10.09748338		
_7125	Dienelactone hydrolase and related enzymes	Q	-2.313052151	-8.968664969	
	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid				
_7713	hydratase (catechol pathway)	Q		-3.374470138	
	Uncharacterized protein, possibly involved in aromatic compounds				
_7714	catabolism	Q	-16.44449342		
_927	Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase	Q	-4.097514233		
_1033	Predicted periplasmic or secreted lipoprotein	R	-3.35469423		
_1083	ribitol 2-dehydrogenase	R	*	-6.967292512	<i>rbtD</i>
_1158	Predicted dehydrogenase	R		-15.24395201	
	Uncharacterized enzyme involved in biosynthesis of extracellular				
_1159	polysaccharides	R	4.856240125		
_1173	Predicted permease	R	-27.96078313	*	
	Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase				
_1250	superfamily)	R	-35.40689712		
	Uncharacterized enzyme involved in biosynthesis of extracellular				
_1315	polysaccharides	R	-5.782083027		
_1368	Zn-dependent alcohol dehydrogenases	R	-5.074120863		
_1586	cobalamin biosynthesis protein	R		*	
_1587	cobalamin biosynthesis protein CobW	R		-12.35435017	<i>cobW</i>
_1605	Predicted glycosyltransferases	R	-64.80673288		
_166	flavodoxin	R		-65.65348975	
	Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase				
_1690	superfamily)	R	-4.899528127		
_1752	16S rRNA (cytidine(1402)-2'-O)-methyltransferase	R	6.25597723		<i>rsmI</i>
_1754	hydroxyacylglutathione hydrolase	R	-3.416239719		<i>gloB</i>
_1766	Predicted dehydrogenase	R		4.494745484	
_1778	MoxR-like ATPases	R	-81.34399519	-27.67057331	
_1779	Protein containing von Willebrand factor type A (vWA) domain	R	-16.29192327		
_1809	Putative GTPases (G3E family)	R	3.1879175	2.243444205	
_1838	FOG: TPR repeat, SEL1 subfamily	R		-48.79155516	
_19	Multimeric flavodoxin WrbA	R	-5.056432545		
_1916	Putative GTPases (G3E family)	R	-4.503578912		
_2001	Predicted hydrolases of the HAD superfamily	R	3.962415796		
_2072	Uncharacterized membrane protein, possible Na <sup>+</sup> channel or pump	R	**		
_2402	Predicted phosphatase/phosphohexomutase	R	-8.191422334		
_2430	Putative Zn-dependent protease, contains TPR repeats	R	-6.44937855		
_2507	Short-chain alcohol dehydrogenase of unknown specificity	R	57.89236553		
_2682	Predicted hydrolase (HAD superfamily)	R	-15.85523948	-5.368119837	
_272	Lhr-like helicases	R	-68.54689519		
_2724	Predicted esterase of the alpha-beta hydrolase superfamily	R	-14.04861217		
_2753	Putative intracellular protease/amidase	R	-9.438782979	-3.765364595	
_2757	Putative NADH-flavin reductase	R	-55.40593523		
_2809	AAA ATPase containing von Willebrand factor type A (vWA) domain	R	-3.058063639		
	Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase				
_2968	superfamily)	R	-9.0062885	-4.464588363	
	Membrane protein involved in the export of O-antigen and teichoic				
_3072	acid	R		*	
_3300	Beta-propeller domains of methanol dehydrogenase type	R	-16.68893535		
_3314	Phospholipid-binding protein	R	-7.282417829		
_3359	Predicted Rossmann fold nucleotide-binding protein	R		*	
	ABC-type uncharacterized transport system, duplicated ATPase				
_3420	component	R		-2.26386747	

_3470	Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily I	R	3.381313751	
	Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase superfamily)	R	-253.1991601	
_3488				
_3546	Predicted phosphoesterase	R	-50.32398835	
_3600	Predicted ATP-binding protein involved in virulence	R	4.028888397	2.483785893
_3603	Predicted P-loop ATPase	R		*
_3610	DNA-binding protein H-NS	R		-4.688400096
	Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase superfamily)	R		*
_3724				
_3819	tetratricopeptide tpr_2 repeat protein	R		4.592606464
_3911	Predicted esterase of the alpha-beta hydrolase superfamily	R	-72.80291348	-49.09307718
_3932	Predicted periplasmic or secreted lipoprotein	R	-101.4984685	
_3998	Predicted esterase	R	-10.1571189	
_4143	Short-chain alcohol dehydrogenase of unknown specificity	R	-5.116307258	
_4207	Predicted peroxiredoxins	R	-3.853120491	-4.45491435
_4263	Predicted hydrocarbon binding protein (contains V4R domain)	R	*	
_4312	N-terminal domain of molybdenum-binding protein	R	-8.285584662	
_4367	Predicted permease	R		-2.780662852
_4377	ABC-type (unclassified) transport system, ATPase component	R	4.240440921	
_4538	Predicted hydrolase (HAD superfamily)	R	-2.481094623	
_47	Predicted dehydrogenases and related proteins	R	-68.32112523	
_4993	ABC-type uncharacterized transport system, ATPase component	R		-22.8108646
_5127	Predicted dehydrogenases and related proteins	R	*	*
_5180	Predicted ATPase	R	**	-3.162350647
_532	Predicted Zn-dependent hydrolases of the beta-lactamase fold	R		6.190449787
_5412	Predicted glutamine amidotransferase	R	-2.166167412	
_5449	Paraquat-inducible protein B	R	-3.981495746	
_5499	Predicted glycosyltransferases	R		*
_5525	Predicted permease	R		-2.110628064
_5542	Predicted permeases	R	-5.505041773	
_5564	Predicted permease	R	-29.58082921	-4.182716174
_5565	Predicted permease	R	-11.35694485	
_5583	Predicted permeases	R	66.41989348	
	Membrane protein involved in the export of O-antigen and teichoic acid	R		*
_5607				
_5667	Proteins containing SET domain	R	-6.233196837	
_5783	Uncharacterized protein involved in propionate catabolism	R	*	*
_5986	Acetyltransferases	R	*	
_6037	Predicted ATPase	R		-6.105952247
_6103	Metal-dependent amidase/aminoacylase/carboxypeptidase	R	-27.42353232	
_6201	ABC-type uncharacterized transport system, permease component	R	-2.885703155	
_6211	Predicted GTPase	R	-2.022604887	
_6249	Metal-dependent amidase/aminoacylase/carboxypeptidase	R	-5.902396951	
_6317	Putative Zn-dependent protease, contains TPR repeats	R	-4.552921076	
_6332	Dioxygenases related to 2-nitropropane dioxygenase	R	141.9282398	
	ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains	R	3.010957397	
_6335				
_6339	Uncharacterized ABC-type transport system, periplasmic component/surface lipoprotein	R		-22.52510639
_6340	Uncharacterized ABC-type transport system, permease component	R		*
_6458	Predicted unusual protein kinase	R	-16.61177327	
_660	Predicted exporter	R		*
_6672	Predicted nucleotidyltransferases	R	-3.744062722	
_6788	Predicted dehydrogenases and related proteins	R		-77.96609673

_6816	Membrane protein involved in the export of O-antigen and teichoic acid	R		*	
_6832	Short-chain dehydrogenases of various substrate specificities	R	**		
_6990	Predicted double-glycine peptidase	R	-282.7248835		-88.22197894
_7061	Predicted glutamine amidotransferases	R	-4.593750196		
_7232	Aldo/keto reductases, related to diketogulonate reductase	R	-14.58215723		
_7380	Predicted hydrolases or acyltransferases (alpha/beta hydrolase superfamily)	R	*		
_7456	Predicted amidohydrolase	R	4.676662873		
_7482	Short-chain alcohol dehydrogenase of unknown specificity	R	*		*
_7497	Predicted glutamine amidotransferases	R			-29.48376402
_7530	hopanoid biosynthesis associated radical SAM protein HpnH	R	3.610323634		<i>hpnH</i>
_7550	Predicted flavoprotein	R	-3.353201176		
_7601	N-terminal domain of molybdenum-binding protein	R			-2.519729407
_7663	TRAP-type uncharacterized transport system, periplasmic component	R	-5.127983851		
_786	Putative GTPases (G3E family)	R			-34.20070029
_805	Predicted NAD/FAD-binding protein	R	*		
_910	Acetyltransferases	R			-20.20296682
_922	Uncharacterized protein involved in propionate catabolism	R	-22.72444322		
_960	ABC-type uncharacterized transport system, periplasmic component	R	-10.74232347		-13.03933
_1008	hypothetical protein	S			6.828031958
_1100	Uncharacterized conserved protein	S	-4.223138089		
_1216	Uncharacterized paraquat-inducible protein B	S	4.867676808		
_1579	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-9.531265779		-5.149130337
_1663	hypothetical protein	S	*		
_1691	hypothetical protein	S			3.135933908
_1715	Predicted membrane protein	S			*
_1743	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-4.157327723		-2.275735239
_1748	Uncharacterized conserved protein	S	-16.04511273		
_1767	hypothetical protein, partial	S	-74.02091865		
_1780	Uncharacterized conserved protein	S	-6.159971143		
_181	hypothetical protein	S	*		
_1828	Uncharacterized conserved protein	S	9.722301238		
_191	hypothetical protein	S			*
_197	Uncharacterized conserved protein	S	*		
_2094	hypothetical protein	S	*		
_2114	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-266.2367104		
_2152	hypothetical protein	S			*
_218	pf10087 family protein	S	10.91854168		8.756239341
_2189	Uncharacterized protein conserved in bacteria containing a pentain-type domain	S			*
_2220	hypothetical protein	S	*		
_2244	Predicted membrane protein	S			-9.127615342
_2348	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	5.61762962		
_242	Predicted membrane protein	S			-4.641512016
_2455	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-8.893700898		
_2456	Uncharacterized conserved protein	S	-17.06631625		
_2471	hypothetical protein	S	-14.14391607		-9.191037572
_2541	Uncharacterized iron-regulated membrane protein	S	2.938784069		13.41719282
_2562	polyphosphate kinase 2	S	-4.333683699		-2.06088839
_2563	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-11.55736666		<i>ppk2</i>
_2647	hypothetical protein, partial	S	*		
_2698	Uncharacterized conserved protein	S	-18.66077321		
_2699	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	*		



_2767	Uncharacterized conserved protein	S	-36.6484296	
_2852	hypothetical protein	S	*	
_2853	uncharacterised protein	S	-29.82179637	-5.636261094
	Uncharacterized homolog of gamma-carboxymuconolactone			
_3012	decarboxylase subunit	S	*	
_3049	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-9.33967071	
	Uncharacterized protein with a C-terminal OMP (outer membrane			
_3109	protein) domain	S	-4.863350405	
_3177	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	*	
_3271	Predicted membrane protein	S		-3.221059355
_3280	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-4.516151023	
_3307	hypothetical protein	S		-41.48867505
_3322	hypothetical protein	S	**	18.5898952
_3407	hypothetical protein	S		-4.743244085
_3410	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S		-210.5680296
_3461	outer membrane assembly lipoprotein YfgL	S	4.285257124	
_3504	Uncharacterized conserved protein	S	-15.36405552	
_3539	Uncharacterized conserved protein	S		-6.24692148
_358	pf11811 domain protein	S		-13.98625897
_3674	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-24.33179739	
_3751	Uncharacterized conserved protein	S	-14.71764726	
_3854	Uncharacterized conserved protein	S	-10.03078012	
_3855	Uncharacterized conserved protein	S	-10.84703135	
_3875	Predicted membrane protein	S	-832.6118725	
_3897	Uncharacterized iron-regulated membrane protein	S		*
_3914	Uncharacterized protein with a bacterial SH3 domain homologue	S	-8.413091634	
_3977	Predicted membrane protein	S		2.538968764
_4136	Predicted membrane protein	S	-14.47358585	
_4313	Uncharacterized conserved protein	S	-6.980005046	
_4315	Uncharacterized conserved protein	S	760.8764082	
_4357	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	194.377515	336.0615168
_4358	hypothetical protein	S	6.414167505	14.8439088
_4363	Uncharacterized conserved protein	S	3.187936979	
_4615	Uncharacterized conserved protein	S	-25.73533824	
_4787	hypothetical protein	S		-11.25834755
_4837	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-93.83950658	
_4858	hypothetical protein	S	*	
_4869	Predicted membrane protein	S	**	8.168923249
_4870	hypothetical protein	S		-8.818030463
_4891	Uncharacterized conserved protein	S	-11.11891686	
_4893	Uncharacterized conserved protein	S	-14.66490724	
_5008	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S		-3.190082145
_5042	Uncharacterized conserved protein	S	*	
_5046	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-17.1389949	
_5086	Uncharacterized protein containing LysM domain	S	-6.202216136	
_5102	Predicted integral membrane protein	S	-8.10537628	
_5161	Predicted membrane protein	S	*	
_5452	Uncharacterized conserved protein	S		-60.45849859
_5549	Predicted membrane protein	S		*
_5554	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	2.817020661	
_5606	hypothetical protein	S	*	*
_5713	hypothetical protein	S	*	
_5721	Uncharacterized conserved protein	S		-36.45132409
_5777	hypothetical protein	S	*	

*yfgL*

_5784	Uncharacterized conserved protein	S	-5.341707152	
_5801	Uncharacterized conserved protein	S		-2.409640562
_5802	conserved hypothetical protein	S		3.058271506
_5806	Uncharacterized conserved protein	S	-2.402542198	
_5855	conserved hypothetical protein	S		5.626897628
_5863	hypothetical protein	S		7.071642511
_5866	hypothetical protein	S	8.702710945	
_5969	Predicted small integral membrane protein	S	*	
	Uncharacterized protein with a C-terminal OMP (outer membrane			
_6024	protein) domain	S		-16.79798659
_624	hypothetical protein	S		-22.3194347
_6308	hypothetical protein	S	*	
_6316	Uncharacterized conserved protein	S	-46.04034878	
_6452	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S		-2.868371832
_6454	hypothetical protein	S		4.65654699
_6647	Predicted membrane protein	S	-10.56568857	
_6649	hypothetical protein	S		*
_676	hypothetical protein	S		*
_6764	Predicted periplasmic/secreted protein	S	-10.11606125	
_6915	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-8.824935622	
_6986	hypothetical protein	S	-134.9696331	-22.09302699
_7071	hypothetical protein	S		9.621644309
_7089	Uncharacterized stress-induced protein	S	2.257801505	
_7248	Uncharacterized conserved protein	S	8.843364665	
_7309	uncharacterised protein	S		-33.59216257
_7347	hypothetical protein	S		*
_7348	hypothetical protein	S		-7.427565132
_7354	Predicted membrane protein	S	-13.71583915	
_7355	hypothetical protein	S	*	
_7418	hypothetical protein	S	**	20.83445681
_7426	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-10.7863111	
	Uncharacterized conserved protein, contains double-stranded beta-			
_7444	helix domain	S	-11.28879347	
_7449	Predicted membrane protein	S	-46.64913211	
_748	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-2.205070999	
_7631	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-20.62767547	-9.139358141
_7638	Uncharacterized iron-regulated protein	S		**
_7666	Uncharacterized conserved protein	S	-6.11853	
_7722	hypothetical protein	S	*	
_801	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S		-11.89007646
_950	Uncharacterized protein conserved in bacteria	S	-208.2853797	-41.91808362
_1166	autoinducer 2 sensor kinase/phosphatase LuxQ	T	-14.2234444	<i>luxQ1</i>
_1167	Signal transduction histidine kinase	T	-10.32808324	
_1169	Anti-sigma regulatory factor (Ser/Thr protein kinase)	T	-28.14942538	
_1225	FOG: GGDEF domain	T	-63.12493053	-19.87804541
_1307	FOG: GGDEF domain	T		-88.19464366
_1309	Signal transduction histidine kinase	T	-9.359077078	
_1329	Signal transduction histidine kinase	T		-14.54822975
	Predicted signal transduction protein containing a membrane domain,			
_1365	an EAL and a GGDEF domain	T	9.589866146	
_1440	Signal transduction histidine kinase	T	-10.9858504	
_1538	Signal transduction histidine kinase	T	-9.779964199	
_1546	FOG: EAL domain	T		-5.143648343
_1570	Predicted signal-transduction protein containing cAMP-binding and	T	-7.137603009	

	CBS domains			
_1604	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains	T	-18.80044571	
_2141	Signal transduction histidine kinase regulating C4-dicarboxylate transport system	T	-38.07627103	
_2154	Signal transduction histidine kinase regulating C4-dicarboxylate transport system	T		-39.05782984
_2333	RecA-superfamily ATPases implicated in signal transduction	T	-2.446573063	
_2395	Phosphate starvation-inducible protein PhoH, predicted ATPase	T	15.37830891	<i>phoH</i>
_2419	Signal transduction histidine kinase	T	-8.507058233	
_2560	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and a GGDEF domain	T	-7.774619949	
_2736	Predicted signal transduction protein	T	-7.923851191	-6.021835421
_2738	Predicted signal transduction protein containing EAL and modified HD-GYP domains	T		-17.33216152
_2751	Predicted periplasmic ligand-binding sensor domain	T	-12.0669461	
_2788	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and a GGDEF domain	T	-4.34746391	-3.396587088
_2855	Predicted signal transduction protein containing a membrane domain, an EAL and a GGDEF domain	T		-7.055874943
_3108	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains	T	4.413027464	
_3153	Signal transduction histidine kinase regulating C4-dicarboxylate transport system	T		-20.85572511
_3201	Predicted signal transduction protein containing a membrane domain, an EAL and a GGDEF domain	T		-44.23257541
_3369	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins	T	-7.57484745	
_345	DnaK suppressor protein	T	-116.6070744	
_3744	Osmosensitive K <sup>+</sup> channel histidine kinase	T		-8.903218121
_3752	cAMP-binding proteins - catabolite gene activator and regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinases	T		3.242136474
_3863	Activator of osmoprotectant transporter ProP	T	3.339682991	
_3884	Predicted signal-transduction protein containing cAMP-binding and CBS domains	T	4.45543315	
_3893	Signal transduction histidine kinase	T	-15.28924147	
_42	Signal transduction histidine kinase	T	-12.9214527	
_4328	Osmosensitive K <sup>+</sup> channel histidine kinase	T	-8.698461231	
_4889	Putative Ser protein kinase	T	-9.371940101	
_4914	Signal transduction histidine kinase	T	-119.1105354	
_4988	Signal transduction histidine kinase	T	-10.36506229	-5.197762012
_4990	Bacteriophytochrome (light-regulated signal transduction histidine kinase)	T	-52.39629505	-30.07272449
_5130	cAMP-binding proteins - catabolite gene activator and regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinases	T	*	*
_5184	Predicted membrane GTPase involved in stress response	T	3.020212052	
_5752	FOG: GGDEF domain	T		-4.100789947
_5753	FOG: EAL domain	T	-21.32132003	
_5935	Response regulator with putative antiterminator output domain	T		*
_5947	Signal transduction histidine kinase	T	-16.68125561	-5.261711587
_5948	RecA-superfamily ATPases implicated in signal transduction	T	-5.286583526	
_5950	Signal transduction histidine kinase	T	-15.4608381	
_5975	FOG: CheY-like receiver	T		-36.16042527
_6039	Signal transduction histidine kinase	T		-5.707917559
_6041	Signal transduction histidine kinase	T		-3.922010004

_6042	Osmosensitive K <sup>+</sup> channel histidine kinase	T		-6.881034196	
_6124	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins	T	14.67241411		
_6292	Signal transduction histidine kinase	T	-8.936738665		
_6427	Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins	T	-24.91273554		
_6594	Osmosensitive K <sup>+</sup> channel histidine kinase	T	-84.13409011		
_6662	Predicted signal transduction protein containing a membrane domain, an EAL and a GGDEF domain	T		-5.513724701	
_6699	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and a GGDEF domain	T	-101.1793285	-22.20921452	
_6916	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains	T	-5.07654599		
_6927	Negative regulator of sigma E activity	T	-2.796154824		
_6928	Negative regulator of sigma E activity	T	-3.052880824		
_6984	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains	T	-22.20698363	-3.478115295	
_6988	conserved hypothetical signal peptide protein	T	-107.1038813	-17.46359677	
_6993	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains	T		-8.709155684	
_708	cAMP-binding proteins - catabolite gene activator and regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinases	T	6.652999469		
_7338	FOG: PAS/PAC domain	T		-8.216841801	
_7534	Carbon starvation protein, predicted membrane protein	T	-3.350272375		
_7548	Signal transduction histidine kinase	T	-3.246187603	-2.320980337	
_7594	autotransporter adhesin	T	*		
_7632	cAMP-binding proteins - catabolite gene activator and regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinases	T	-11.56061638		
_765	Signal transduction histidine kinase	T		-10.70014016	
_766	Signal transduction histidine kinase	T	-8.373124181	-2.684131244	
_770	Signal transduction histidine kinase	T	-5.92955168		
_773	Signal transduction histidine kinase	T	-3.916489348		
_828	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and a GGDEF domain	T	-14.9681895		
_887	Response regulator containing a CheY-like receiver domain and a GGDEF domain	T	*		
_1815	Flp pilus assembly protein TadD, contains TPR repeats	U		-7.146199956	
_1876	membrane protein insertase	U	15.44945928		<i>yidC</i>
_1903	Type II secretory pathway, component PulM	U	*		<i>gspM</i>
_2242	Signal peptidase I	U		-9.366521969	
_3822	type VI secretion system effector, Hcp family	U	5.276131394		<i>hcpI</i>
_3834	type VI secretion system protein IcmF	U	7.799753519		<i>icmFI</i>
_4433	Preprotein translocase subunit SecB	U	19.1258145		<i>secB</i>
_4612	Type IV secretory pathway, TrbL components	U	-7.003399649		
_4645	Preprotein translocase subunit SecY	U	22.18828755		<i>secY</i>
_4703	Flp pilus assembly protein, ATPase CpaF	U		*	
_4849	Hemolysin activation/secretion protein	U	-6.631390343		
_5167	Flp pilus assembly protein, ATPase CpaE	U	-171.1689231		
_5168	Flp pilus assembly protein, secretin CpaC	U	*		
_5454	Preprotein translocase subunit SecF	U	18.71062325		<i>secD</i>
_5455	Preprotein translocase subunit SecD	U	7.824371724		<i>secF</i>
_5456	Preprotein translocase subunit YajC	U	5.184538942		<i>yajC</i>
_5833	Biopolymer transport proteins	U		7.591131772	
_5834	Biopolymer transport protein	U		3.141678525	
_6003	Preprotein translocase subunit SecE	U	13.95960516		<i>secE</i>
_6226	Preprotein translocase subunit SecA (ATPase, RNA helicase)	U	2.360894879		<i>secA</i>

_6554	Preprotein translocase subunit SecG	U	3.787970247		<i>secG</i>
_6989	fap amyloid fibril major component	U	-142.785127	-26.66474627	
_6992	fap amyloid fiber secretin	U	-57.06746376	-30.22068919	
_1047	Cation/multidrug efflux pump	V	-276.0992565		
_1278	Cation/multidrug efflux pump	V		-98.12806632	
_2462	Cation/multidrug efflux pump	V	6.71765968		
_2573	heme ABC exporter, ATP-binding protein CcmA	V		4.835928025	<i>yhhJ</i>
_2658	Cation/multidrug efflux pump	V	-180.6329909		
_2744	Cation/multidrug efflux pump	V		-2.959171252	
_2814	Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins	V	*		
_2822	Cation/multidrug efflux pump	V	-66.23892048		
_3134	Cation/multidrug efflux pump	V		-9.987044709	
_4447	Na+-driven multidrug efflux pump	V	-16.95657136		
_4451	Uncharacterized bacitracin resistance protein	V	-2.00103155		
_5132	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase AmpD	V	7.372797199		<i>ampD2</i>
_5972	cation-binding protein	V	*		
_7767	ABC-type multidrug transport system, ATPase component	V	-16.06495481		

\*= significa que o gene estava ausente no apoplasto e presente no tratamento; \*\*=significa que o gene foi expresso no meio contendo fluido do apoplasto e ausente no tratamento; B: Dinâmica e estrutura da cromatina, C: Produção e conversão de energia, D: Controle do ciclo celular, E: Metabolismo e transporte de aminoácidos, F: Transporte e metabolismo de nucleotídeos, G: Metabolismo e transporte de carboidratos, H: Metabolismo e transporte de coenzimas, I: Metabolismo e transporte de lipídeos, J: Tradução, estrutura ribossomal e biogênese, K: Transcrição, L: Replicação, recombinação e reparo, M: Parede celular, membrana e biogênese do envelope, N: Motilidade celular, O: Modificação pós-transducional, recuperação de proteínas e chaperonas, P: Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, Q: Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, R: Funções gerais, S: Função desconhecida, T: Mecanismos de transdução de sinais, U: Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular, V: Mecanismos de defesa, divisão celular e partição do cromossomo.