



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**O líquido do apoplasto de cana-de-açúcar modulando a  
expressão de genes na bactéria diazotrófica endofítica  
*Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103**

**VALÉRIA POLESE**

Seropédica, RJ  
2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**O líquido do apoplasto de cana-de-açúcar modulando a  
expressão de genes na bactéria diazotrófica endofítica  
*Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103**

**VALÉRIA POLESE**

*Sob orientação do pesquisador*

**José Ivo Baldani**

*e coorientação da pesquisadora*

**Márcia Soares Vidal**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção de grau de **Doutor em  
Ciências**, no curso de Pós-Graduação  
em Fitotecnia. Área de concentração  
Fisiologia da produção.

Seropédica, RJ  
2017

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PP7621 Polese, Valéria, 07/10/1985-  
O líquido do apoplasto de cana-de-açúcar modulando a  
expressão de genes na bactéria diazotrófica endofítica  
Herbaspirillum rubrisubalbicans estirpe HCC103 /  
Valéria Polese. - 2017.  
148 f.

Orientador: José Ivo Baldani.

Coorientadora: Márcia Soares Vidal.

Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Fitotecnia, 2017.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2.  
Herbaspirillum. 3. Transcriptoma. 4. RNA-Seq. I.  
Baldani, José Ivo, 1953-, orient. II. Soares Vidal,  
Márcia, 1973-, coorient. III Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Fitotecnia. IV. Título.

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

**VALÉRIA POLESE**

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

TESE APROVADA EM 20/02/2017

---

José Ivo Baldani. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Silvia Regina Goi. Dra. UFRRJ

---

Leornado Oliveira Medici. Dr. UFRRJ

---

Stefan Schwab. Dr. Embrapa Agrobiologia

---

Fábio Lopes Olivares. Dr. UENF

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me abençoado em mais uma etapa da minha vida.

À minha linda família, meus pais Jonas Polese (*in memoriam*) e Marinalva que me incentivaram em cada dia, com palavras de amor e de força.

Aos irmãos Flávio e Diogo, sobrinhas Heloísa e Helena, e à Beatriz, por toda torcida e carinho.

Ao meu orientador Dr. José Ivo Baldani, pela sua dedicação à orientação, pelos conhecimentos doados e pela disposição em ajudar. Muito obrigada.

À minha coorientadora Dra. Márcia Soares Vidal, pelos ensinamentos.

Aos amigos que conquistei no Laboratório de Genética e Bioquímica, Jéssica de Paula, Francine e Beth, especialmente ao Cleiton de Paula e à Paula Renata, que foram incansáveis em me ajudar e ensinar. Meus queridos, muitíssimo obrigada.

Aos demais pesquisadores do Laboratório de Genética e Bioquímica, Dra. Kátia Regina Teixeira (*in memoriam*), Dr. Stefan Schwab, especialmente ao Jean Luiz Simões-Araújo, que esteve presente em várias etapas da construção desse trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Genética e Bioquímica, Carol Rossi e Patrícia Gitahy por toda ajuda.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia, Geraldo Baeta e seu Claudinho por todo apoio.

Ao Curso de Pós-graduação em Fitotecnia e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, aos seus professores e funcionários, pela oportunidade de qualificação profissional de qualidade. Tenho orgulho em dizer que sou uma Ruralina.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Faperj, ao INCT-FBN e à Embrapa Agrobiologia, por todo suporte à pesquisa, apoio financeiro e de estrutura.

Aos professores Emanuel Souza e Leonardo Cruz, e à Dra. Michelle Zibetti Tadra-Sfeir, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pelo apoio no transcriptoma.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Roraima (IFRR), pelo afastamento por seis meses para que eu concluísse o doutorado, dessa forma incentivando a qualificação profissional do seu quadro de professores. Muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora Silvia Goi, Fábio Lopes Olivares, Leonardo Oliveira Medici e Stefan Schwab, pelas sugestões.

Muito obrigada!

## BIOGRAFIA

Valéria Polese, filha de Jonas Casoti Polese e Marinalva Nunes Pinto Polese, nasceu em 7 de outubro de 1985, na cidade de Colatina – Espírito Santo. Coursou o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Geraldo Vargas Nogueira, em Colatina no ES. Em Agosto de 2008 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) com conclusão em dezembro de 2010. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Solos, no período de janeiro a dezembro de 2009. No período de março a dezembro de 2010 foi monitora da disciplina Fitopatologia e Entomologia Aplicada. Em maio de 2011 ingressou no curso de mestrado em Fitotecnia da UFRRJ, na área de arborização urbana, com conclusão em 2013. Neste mesmo ano deu início ao doutorado também no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, com toda pesquisa desenvolvida na Embrapa Agrobiologia, na área de fixação biológica de nitrogênio em gramíneas, especificamente em cana-de-açúcar, com conclusão em fevereiro de 2017. Atualmente faz parte do quadro de professores efetivos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Roraima (IFRR).

## RESUMO GERAL

POLESE, V. **O líquido do apoplasto de cana-de-açúcar modulando a expressão de genes na bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103.** 2017. 148 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Alternativas que diminuam a necessidade de fertilizantes nitrogenados na cultura da cana-de-açúcar, os custos e os danos ao ambiente sem reduzir a produção são fundamentais para a sustentabilidade da cultura. Dentre essas alternativas destaca-se o uso de bactérias diazotróficas, que são capazes de realizar o processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN) quando em associação com os tecidos da planta. Diversas espécies de bactérias são capazes de realizar esse processo tais como a *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103. No entanto, os mecanismos desta interação bactéria-planta ainda são pouco conhecidos. Na busca pelo conhecimento da interação planta-bactéria, a genômica funcional baseada em análises transcriptômicas tem sido utilizada explorando o papel dos exsudatos radiculares, da seiva vegetal e do fluido do apoplasto. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o papel do líquido do apoplasto na expressão global de genes na bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103. Para tanto, o estudo foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo avaliar e selecionar genes normalizadores adequados para estudos de expressão gênica por RT-qPCR da estirpe HCC103. Neste sentido, foram avaliados os níveis de expressão de 5 genes candidatos a normalizadores (*rpoA*, *gyrA*, *dnaG*, *recA* e *gmK*) e 8 genes alvos envolvidos no metabolismo de carbono, após o crescimento da bactéria no caldo de 4 variedades de cana-de-açúcar (RB867515, SP701143, RB92579 e IACSP95-5000) e de 3 fontes de carbono (aconitato, malato e glicose). A análise da estabilidade da expressão gênica realizada com os programas GeNorm e Normfinder indicou os genes *dnaG* e *gyrA* como os mais estáveis e portanto adequados para uso como genes normalizadores nas análises de RT-qPCR da estirpe HCC103. O capítulo 2 teve por objetivo o estudo da expressão gênica diferencial (método de RNA-Seq) da estirpe HCC103 cultivada na presença do líquido do apoplasto da cana-de-açúcar extraído de colmos da variedade RB867515 com 12 meses de idade. A estirpe HCC103 foi cultivada em meio JNFb líquido a 30°C e 150 rpm até a metade da fase de crescimento exponencial, quando o caldo bacteriano foi dividido em 3 porções equivalentes e a estas adicionado os seguintes tratamentos, respectivamente: 50% de água destilada (MA); 50% de líquido do apoplasto (MLA); 50% de meio JNFb novo (MM). Duas horas após a aplicação dos tratamentos e incubação a 30°C e 150 rpm, as células bacterianas foram coletadas, o RNA foi extraído, as bibliotecas de cDNA construídas, e o sequenciamento foi realizado na plataforma Ion-Proton. Para a identificação dos genes diferencialmente expressos (GDE) foi empregado o pacote de bioinformática CLC. A anotação funcional de GDE baseada na ontologia genética foi realizada com os programas Blast2GO, WebMGA (Classificação funcional – COG). Todos os genes diferencialmente expressos foram anotados através do programa de bioinformática Artemis. Os resultados mostraram que as categorias funcionais

Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; Transcrição; Mecanismos de tradução de sinal e Transporte de aminoácidos se destacaram em número de genes reprimidos. Em contraste, as categorias de Metabolismo e transporte de carboidrato; de aminoácido, Mecanismos de transdução de sinal e Transcrição apresentaram maior número de genes induzidos nas duas comparações (*vs.* MA e *vs.* MM). Na classe produção e conversão de energia destacam-se genes que codificam para enzima nitrato redutase os quais foram altamente induzidos na presença do líquido do apoplasto em ambas as comparações. Em conclusão, os resultados mostraram uma variedade de genes envolvidos na interação planta bactéria em resposta à presença do líquido do apoplasto, como por exemplo, genes que codificam para proteínas do sistema de secreção do tipo 6 (SST6), flagelo e mecanismos de transdução de sinais. Este trabalho, pioneiro, deverá apoiar pesquisas futuras sobre a interação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 com a planta de cana-de-açúcar e possivelmente permitir a identificação de biomarcadores que auxiliem na maximização do potencial biotecnológico da bactéria como biofertilizante em diferentes variedades de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de nitrogênio, *Herbaspirillum*, transcriptoma, RNA-Seq.



## GENERAL ABSTRACT

POLESE, V. **Sugarcane apoplast liquid modulating the expression of genes in endophytic diazotrophic bacteria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* strain HCC103. 2017. 148 p. Thesis (Doctorate in Plant Sciences).** Institute of Agronomy, Department of Plant Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Alternatives that reduce the need for nitrogen fertilizers in the sugar cane crop, costs and damages to the environment without reducing production are fundamental to the sustainability of the crop. Among these alternatives, we highlight the use of diazotrophic bacteria, which are capable of performing the biological nitrogen fixation (BNF) process when in association with plant tissues. Several species of bacteria are able to perform this process, such as the *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 strain. However, the mechanisms of this bacterium-plant interaction are still poorly understood. In the search for knowledge of plant-bacterial interaction, functional genomics based on transcriptomic analysis has been used exploring the role of root exudates, vegetable sap and apoplast fluid. The objective of the present work was to evaluate the role of apoplast liquid in the global expression of genes in the bacterium *Herbaspirillum rubrisubalbicans* strain HCC103. For that, the study was divided into two chapters. The first chapter aimed to evaluate and select suitable normalizing genes for RT-qPCR gene expression studies of strain HCC103. In this sense, the expression levels of 5 normalizing candidate genes (*rpoA*, *gyrA*, *dnaG*, *recA* and *gmK*) and 8 target genes involved in carbon metabolism were evaluated after growth of the bacteria in the broth of 4 sugarcane varieties (RB867515, SP701143, RB92579 and IACSP95-5000) and 3 carbon sources (Aconite, Malate and Glucose). Gene expression stability analysis performed with the GeNorm and Normfinder programs indicated the *dnaG* and *gyrA* genes as the most stable and therefore suitable for use as normalizing genes in the RT-qPCR analysis of the HCC103 strain. Chapter 2 had the objective of study the differential gene expression (RNA-Seq method) of the strain HCC103 grown in the presence of sugarcane apoplast liquid extracted from stems of the 12-month-old sugarcane variety RB867515. The HCC103 strain was grown in liquid JNFb medium at 30°C and 150 rpm until the middle of the exponential growth phase, when the bacterial broth was divided into 3 equivalent portions and applied the following treatments: 50% of distilled water (MA); 50% of the apoplast liquid (MLA); 50% of fresh JNFb medium (MM). Two hours after application of the treatments, bacterial cells were collected, RNA was extracted, cDNA libraries were constructed, and sequencing was performed on the Ion-Proton platform. For the identification of differentially expressed genes (DGE) the CLC bioinformatics package was used. The functional annotation of GDE based on the genetic ontology was performed with the Blast2GO, WebMGA (Functional Classification - COG) programs. All differentially expressed genes were annotated using the Artemis bioinformatics program. The results showed that the functional categories Translation, ribosomal structure and biogenesis; Transcription; Signal translation mechanisms; Transport of amino acids showed the highest number of repressed genes. In contrast, the categories of metabolism and carbohydrate transport;

Signal transduction and Transcription mechanisms showed the highest number of genes induced in both comparisons (vs. MA and vs. MM). In the class of production and energy conversion, the genes codifying for nitrate reductase enzymes were highly expressed in the presence of apoplastic fluid in both comparisons. In conclusion, the results showed a variety of genes involved in the bacterial plant interaction in response to the presence of apoplastic fluid, such as genes encoding SST6 proteins, flagellum and signal transduction mechanisms. This pioneering work should support future research on the interaction of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* strain HCC103 with the sugarcane plant and possibly allow to identify biomarkers that help in maximizing the biotechnological potential of the bacterium as a biofertilizer in different sugarcane varieties.

**Keywords:** Biological fixation of nitrogen, *Herbaspirillum*, transcriptome, RNA-Seq.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Níveis de expressão dos cinco genes candidatos a normalizadores internos da estirpe HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* cultivada de diferentes fontes de carbono e caldos de cana-de-açúcar. Os valores de Ct foram calculados a partir de três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão. .... 28
- Figura 2. Estabilidade média dos genes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 nas condições de crescimento definidas (Meio JNFb suplementado com ácido málico, ácido aconítico ou glicose; e em caldos de cana de diferentes variedades) e analisada através do programa GeNorm. .... 29
- Figura 3. Estabilidade média dos genes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 nas condições de crescimento definidas (Meio JNFb suplementado com ácido málico, ácido aconítico ou glicose e, em caldos de cana de diferentes variedades) e analisadas através do programa NormFinder. .... 29
- Figura 4. 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 3. .... 30
- Figura 5. Expressão relativa de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 cultivada em saís do meio JNFb suplementado com diferentes fontes de carbono e em caldos de cana (100%) de diferentes variedades. A expressão gênica foi quantificada usando RT-qPCR e o método comparativo threshold ( $\Delta\Delta CT$ ) através do programa qBase v1.3.5. Os genes *dnaG* e *gyrA* foram utilizados como referência para normalização dos dados, e o meio JNFb com ácido málico foi utilizado como calibrador (Controle). As barras indicam o erro padrão. .... 31
- Figura 6. Sintomas da doença estria mosqueada, causada por *H. rubrisubalbicans* na variedade B-4362 de cana-de açúcar, 20 dias após a inoculação. A seta grande indica região necrosada e a seta pequena o ponto de inoculação (Fonte: OLIVARES et al., 1997). .... 49
- Figura 7. Colonização da região apoplástica de hastes da planta de milho por bactérias endofíticas (Fonte: SATTELMACHER, 2001). .... 51
- Figura 8. Colonização de plantas por *Herbaspirillum seropedicae*. A associação de *H. seropedicae* (pontos vermelhos) com a planta hospedeira em condições de laboratório inicia com a quimiotaxia das bactérias em direção à raiz da planta e adesão à superfície radicular, preferencialmente na zona dos pêlos radiculares (1). A maior parte das bactérias permanece aderida a superfície das raízes, algumas penetram através de discontinuidades da epiderme, como a zona de alongamento (2a) e fendas laterais de raiz (2b). A colonização interna é rápida, com ocupação dos espaços intercelulares de raiz, juntamente com a colonização de aerênquimas (no arroz) e xilema (3). Algumas bactérias movem-se a partir das raízes para as partes aéreas através do xilema (4), e eventualmente colonizam brotos e folhas, onde eles podem se espalhar para os espaços intercelulares e cavidades subestomal. Adaptado de MONTEIRO et al. (2012). .... 52
- Figura 9. Curva de crescimento de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, estirpe HCC103 em meio JNFb suplementada com 18,7 mmol.l-1 de NH<sub>4</sub>Cl e agitação 150 rpm e a 30°C. Seta 1 – aplicação dos tratamentos 12 horas após a inoculação. Seta 2 – coleta do RNA. D.O. - densidade ótica. .... 66
- Figura 10. Gráfico do tipo Volcano Plot construído com os dados do transcriptoma da estirpe HCC103 cultivada em meio JNFb + 50% de líquido do apoplasto comparado ao meio JNFb diluído com 50% de água destilada. Os pontos vermelhos indicam os genes reprimidos ( $p$ -value <0,05;  $Fold\ change$  <-2) e induzidos ( $p$ -value <0,05;  $Fold\ change$  >2). .... 68

Figura 11. Gráfico do tipo Volcano Plot construído com os dados do transcriptoma da estirpe HCC103 cultivada em meio JNFb + 50% de Líquido do apoplasto em comparação com o meio JNFb completo. Os pontos vermelhos indicam os genes reprimidos ( $p$ -value  $<0,05$  Fold change  $<-2$ ) e induzidos ( $p$ -value  $<0,05$  Fold change  $>2$ ). ..... 68

Figura 12. Classificação funcional dos genes reprimidos da estirpe HCC103 cultivada no meio JNFb na presença de 50% de líquido do apoplasto (MLA) em relação ao cultivo em meio JNFb diluído com 50% de água destilada (MA). A legenda refere-se respectivamente a classe, ao número de genes, à descrição da classe, e ao percentual de genes diferencialmente expressos. 70

Figura 13. Classificação funcional dos genes induzidos da estirpe HCC103 cultivada no meio JNFb na presença de 50% de líquido do apoplasto (MLA) em relação ao cultivo em meio JNFb diluído com 50% de água destilada (MA). A legenda refere-se respectivamente a classe, e ao percentual de genes diferencialmente expressos. .... 71

Figura 14. Classificação funcional dos genes reprimidos na estirpe HCC103 cultivada no meio JNFb na presença de 50% de líquido do apoplasto (MLA) em relação ao cultivo em meio JNFb diluído a 50% com meio fresco (MM). A legenda refere-se respectivamente a classe, ao número de genes, à descrição da classe, e ao percentual de genes diferencialmente expressos. .... 72

Figura 15. Classificação funcional dos genes induzidos estirpe HCC103 cultivada no meio JNFb na presença de 50% de líquido do apoplasto (MLA) em relação ao cultivo em meio JNFb diluído a 50% meio fresco (MM). A legenda refere-se respectivamente a classe, ao número de genes, à descrição da classe e ao percentual de genes diferencialmente expressos. .... 73

Figura 16. Distribuição dos genes diferencialmente regulados de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 pelo líquido do apoplasto de acordo com a categorização do COG. Barras em cor cinza indicam os genes diferencialmente expressos na presença do líquido do apoplasto (MLA) quando em relação ao Meio+Água (MA); Barras em cor preta indicam os genes diferencialmente expressos na presença do fluido do apoplasto (MLA) quando comparado ao Meio+Meio (MM). Categorias: D - Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo, Q - Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, V - Mecanismos de defesa, I - Metabolismo e transporte de lipídeos, N - Motilidade celular, F - Transporte e metabolismo de nucleotídeos, L - Replicação, recombinação e reparo, T - Mecanismos de transdução de sinais, U - Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular, G - Metabolismo e transporte de carboidratos, P - Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, M - Parede celular, membrana e biogênese do envelope, O - Modificação pós-transducional, recuperação de proteínas e chaperonas, C - Produção e conversão de energia, S - Função desconhecida, H - Metabolismo e transporte de coenzimas, E - Metabolismo e transporte de aminoácidos, K - Transcrição, R - Funções gerais, J - Tradução, estrutura ribossomal e biogênese. .... 74

Figura 17. Distribuição dos genes diferencialmente regulados de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 pelo líquido do apoplasto de acordo com a categorização do COG. Barras em cor cinza indicam os genes diferencialmente expressos na presença do líquido do apoplasto (MLA) quando em relação ao Meio+Água (MA); Barras em cor preta indicam os genes diferencialmente expressos na presença do líquido do apoplasto (MLA) quando comparado ao Meio+Meio (MM). Categorias: B - Dinâmica e estrutura da cromatina, D - Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo, F - Transporte e metabolismo de nucleotídeos, L - Replicação, recombinação e reparo, J - Tradução, estrutura ribossomal e biogênese, U - Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular, V - Mecanismos de defesa, N - Motilidade celular, H - Metabolismo e transporte de coenzimas, Q - Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, I - Metabolismo e transporte de lipídeos, O - Modificação pós-transducional, recuperação de proteínas e chaperonas, P - Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, C - Produção e conversão de energia, M - Parede celular, membrana e biogênese do envelope, T - Mecanismos de transdução de sinais, S - Função

desconhecida, K - Transcrição, R - Funções gerais, E - Metabolismo e transporte de aminoácidos, G - Metabolismo e transporte de carboidratos. ....	75
Figura 18. Níveis de expressão de quatro genes identificados em HCC103 como diferencialmente expressos pelo RNA-Seq validados por RT-qPCR. A expressão gênica empregou o método comparativo threshold ( $\Delta\Delta CT$ ) através do programa qBase v1.3.5. Os genes <i>dnaG</i> e <i>rpoA</i> foram utilizados como referência para normalização dos dados e o tratamento Meio+Água (MA) foi utilizado como tratamento calibrador (Controle). As barras indicam o erro padrão. As ORFs estão descritas na tabela 5. ....	76
Figura 19. <i>Swimming</i> : Movimento individual da bactéria em meio líquido, também realizado por um flagelo rotativo. Adaptado de Kearns. (2010). ....	83
Figura 20. <i>Twitching</i> : movimento de superfície da bactéria através da extensão do Pili, que aderido à superfície, posteriormente é retraído puxando a célula, fazendo com que a mesma fique próxima do local de fixação. Adaptado de Kearns (2010). ....	84
Figura 21. Biossíntese de triptofano: a partir do corismato as enzimas TrpE e TrpG sintetizam o antranilato, que é convertido a triptofano pela enzima TrpS. ....	89
Figura 22. Via OtsAB de biossíntese de Trealose. ....	98
Figura 23. Organização dos genes <i>otsA</i> e <i>otsB</i> no genoma de <i>H. rubrisubalbicans</i> HCC103. Esses genes foram anotados manualmente através do programa Artemis. ....	99
Figura 24. Visão geral das principais classes dos genes de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 diferencialmente expressos quando cultivada na presença do líquido do apoplasto (MLA) em relação aos tratamentos com a suplementação de meio JNFb novo (MM) ou com água destilada (MA). A letra x (em vermelho) indica a repressão na presença do líquido do apoplasto enquanto que a ausência da letra x indica indução do gene na presença do líquido do apoplasto. Os genes ou classes localizados sob a linha tracejada azul são comuns para as duas comparações (vs. Meio + Meio, vs. Meio + Água). ....	107

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Produto, função dos genes candidatos a normalizadores internos.....	25
Tabela 2. Características dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes candidatos a normalizadores na RT-qPCR. ....	26
Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes alvo na RT-qPCR. ....	27
Tabela 4. Mapeamento do transcriptoma da estirpe HCC103 de <i>H. rubrisubalbicans</i> .....	67
Tabela 5. Valores da expressão gênica no RNA-Seq ( <i>Fold change</i> ) e na RT-qPCR (Método comparativo <i>threshold</i> ( $\Delta\Delta CT$ )).....	76
Tabela 6. Quantidade de genes reprimidos ou induzidos de HCC103 na presença do líquido do apoplasto em comparação ao Meio+Meio, ou ao Meio+Água, distribuídos de acordo com outras classes funcionais além das citadas anteriormente.....	105

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL .....	16
II. CAPÍTULO 1 .....	19
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1 Estirpe bacteriana e condições de crescimento.....	24
2.2 Extração do RNA e síntese do cDNA .....	24
2.3 Escolha dos candidatos a genes referência e desenho das sequências iniciadoras 25	
2.4 Experimento de RT-qPCR.....	26
2.5 Análise da estabilidade da expressão gênica .....	26
2.6 Quantificação relativa (RQ) dos genes <i>acnA</i> , <i>fbp</i> , <i>galE</i> , <i>lpxC</i> , <i>suhB</i> , <i>wcaA</i> e ORF_0127.0101, _0127.0123 .....	27
3. RESULTADOS .....	28
3.1 Níveis de expressão dos genes candidatos à referência e análise de estabilidade	28
3.2 Quantificação relativa (RQ) dos genes alvos <i>acnA</i> , <i>fbp</i> , <i>galE</i> , <i>lpxC</i> , <i>suhB</i> , <i>wcaA</i> e ORF_0127.0101, _0127.0123. ....	30
4. DISCUSSÃO .....	32
5. CONCLUSÃO.....	40
III. CAPÍTULO 2 .....	41
1. INTRODUÇÃO.....	44
1.1. A importância da cana-de-açúcar .....	44
1.2. Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em cana-de-açúcar.....	45
1.3. Gênero <i>Herbaspirillum</i> .....	47
1.4. <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> .....	48
1.5. Líquido do apoplasto .....	50
1.6. Transcriptômica e outras ferramentas no conhecimento da interação bactéria- planta 53	
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Coleta do líquido do apoplasto .....	56
2.2. Estirpe HCC103 de <i>H. rubrisubalbicans</i> .....	56
2.3. Curva de crescimento da estirpe HCC103 de <i>H. rubrisubalbicans</i> .....	56
2.4. Experimento do transcriptoma.....	57
2.4.1. Microrganismo, preparo do inóculo, e condições de crescimento .....	57
2.4.2. Extração de RNA com Trizol .....	57
2.4.3. Depleção do rRNA .....	58
2.4.4. Preparo de cDNA.....	60
2.4.5. Análises de bioinformática do transcriptoma .....	64
3. RESULTADOS .....	66
3.1. Curva de crescimento da estirpe bacteriana <i>H. rubrisubalbicans</i> HCC103 .....	66
3.2. Análises de bioinformática do transcriptoma .....	66
3.2.1. Sequenciamento.....	66

3.2.2. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos da estirpe HCC103 cultivada na presença do líquido do apoplasto .....	69
3.3. Confirmação dos dados do transcriptoma por RT-qPCR .....	75
4. DISCUSSÃO .....	77
4.1. Classes funcionais .....	77
4.1.1. Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular (U) .....	77
4.1.2. Motilidade celular (N) .....	82
4.1.3. Mecanismos de transdução de sinal (T) .....	84
4.1.4. Biogênese de parede celular / membrana / envelope (M) .....	87
4.1.5. Mecanismos de defesa (V) .....	87
4.1.6. Tradução, estrutura ribossomal e biogênese (J) .....	88
4.1.7. Transporte .....	90
a) Transporte e metabolismo de Íons Inorgânicos (P) .....	91
b) Transporte e metabolismo de aminoácidos (E) .....	93
c) Transporte e metabolismo de lipídio (I) .....	95
d) Transporte e metabolismo de nucleotídeo (F) .....	96
5. CONCLUSÃO .....	106
IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	107
V. Anexos .....	131



## I. INTRODUÇÃO GERAL

O nitrogênio (N) é considerado elemento essencial às plantas, pois está presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como: ATP, NADH, NADPH, nucleotídeos, clorofila, proteínas, incluindo inúmeras enzimas (HARPER, 1994; MALAVOLTA e MORAES, 2007). O Brasil possui grande relação de dependência da importação de fertilizantes nitrogenados (ANDA, 2012), que oneram a produção de diversas culturas de importância econômica. Além da preocupação financeira existe a ambiental, pois o N (Mineral ou orgânico) pode contaminar mananciais e águas subterrâneas (HOEFT, 1990). Também causa a geração de gases do efeito estufa, tanto na produção quanto na aplicação e seus impactos nas mudanças climáticas globais. Neste contexto, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é alvo de muitos estudos, como alternativa para suprir as necessidades de N de diversas culturas incluindo a cana-de-açúcar. A FBN é realizada a partir da redução do N<sub>2</sub> atmosférico a amônia biologicamente disponível com participação das bactérias fixadoras de N, sendo a principal via de entrada de nitrogênio nos ambientes aquático e terrestre (VITOUSEK e HOWARTH, 1991; ARP, 2000; REIS et al., 2006; HU et al., 2016). A maioria dos estudos tem sido realizada com as bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que estabelecem simbiose com espécies da família Leguminosae, porém nos últimos anos se intensificaram as pesquisas com FBN em espécies vegetais pertencentes à família Poaceae. Tais pesquisas foram intensificadas, graças ao uso de técnicas de biologia molecular, que têm permitido grandes avanços no conhecimento a cerca da interação planta-bactéria (SOBRAL, 2003; CORDEIRO et al., 2013). Na família Poaceae, a cultura da cana-de-açúcar se destaca como planta de grande interesse agrícola, principalmente para produção de açúcar, álcool e bioenergia. Estudos com as bactérias diazotróficas são muito importantes, pois podem contribuir significativamente no fornecimento de nitrogênio a diversos ambientes, fazendo com que diminua a utilização de insumos nitrogenados, que agregam alto custo à produção agrícola.

Existem diversos microrganismos conhecidos e que realizam o processo da FBN, porém a associação de microrganismos diazotróficos endofíticos com plantas não leguminosas ainda não é completamente entendida. Algumas bactérias diazotróficas colonizam preferencialmente os tecidos internos da planta e dentre elas encontram-se a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azoarcus* spp. e *Paraburkholderia* spp., que possuem baixa sobrevivência no solo e um espectro restrito

de plantas hospedeiras (BALDANI et al., 1997; JAMES, 2000; ROSENBLUETH et al., 2006; REINHOLD-HUREK e HUREK, 2011).

O gênero *Herbaspirillum* possui 11 espécies, dentre elas está a *H. rubrisubalbicans* que é uma bactéria diazotrófica endofítica, encontrada no interior de tecidos vegetais, principalmente de gramíneas, como em raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1996), sem causar dano aparente ao seu hospedeiro. A doença da estria mosqueada ocorre apenas em variedades suscetíveis de cana-de-açúcar (B4362) (OLIVARES et al., 1997), esta doença apresenta baixo impacto econômico à cultura. Algumas espécies do gênero *Herbaspirillum* possuem a capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção e secreção de reguladores de crescimento, atividade antagonística contra fitopatógenos, e ainda fornecer à planta, nitrogênio fixado biologicamente (RONCATO-MACCARI et al., 2003; ALVES et al., 2014). Estudos evidenciam que o apoplasto é o nicho preferencial de colonização pelas bactérias diazotróficas endofíticas (DONG et al., 1994; HECHT-BUCHHOLZ, 1998; JAMES, 2000; MCCULLY, 2001). Essas bactérias, assim como as fitopatogênicas, possuem a capacidade de penetrar nos tecidos da planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto, vasos condutores e, eventualmente, o interior da célula (KLOEPPER, 1978); entretanto, pouco se conhece sobre essa interação.

Técnicas de transcriptômica têm sido aplicadas na busca pelo conhecimento da interação planta-bactéria, da funcionalidade bacteriana e vegetal envolvida nesse processo. O transcriptoma refere-se aos transcritos de um organismo em condições particulares (SALVATO e CARVALHO, 2010; MATHIONI et al., 2011).

O presente estudo foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo refere-se à busca por genes normalizadores internos da estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans*, que são importantes para técnica de quantificação da expressão gênica por RT-qPCR e para a validação do transcriptoma (Capítulo 2). Para isso a bactéria foi cultivada (*in vitro*) separadamente em sete fontes de carbono: 100% do caldo de quatro variedades de cana-de-açúcar (RB867515, RB92579, IAC95-5000, SP701143), além do cultivo em JNFb suplementado com 0,5% de ácido aconítico, de ácido málico ou de glicose. O capítulo 2 refere-se ao transcriptoma da estirpe HCC103 cultivada na presença do líquido do apoplasto da variedade de cana-de-açúcar RB867515. A bactéria foi cultivada até a fase de crescimento exponencial, ponto em que foram aplicados os tratamentos. À cultura crescida, foram adicionados 50% de água destilada, ou 50% de

meio JNFb novo, ou 50% do líquido do apoplasto. Maiores informações estão detalhadas nos capítulos.

## II. CAPÍTULO 1

**SELEÇÃO DE GENES NORMALIZADORES INTERNOS DE  
*Herbaspirillum rubrisubalbicans* ESTIRPE HCC103 CULTIVADA EM  
CALDOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-DE-  
AÇÚCAR E EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO PARA A  
VALIDAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA POR  
RT-qPCR**

## RESUMO

A RT-qPCR é uma ferramenta importante para quantificar os níveis de expressão gênica; contudo, requer genes normalizadores internos específicos para as diferentes condições experimentais. Não existe informação na literatura sobre genes normalizadores internos para validação de dados em *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103, um endófito que faz parte do consórcio de bactérias do inoculante de cana-de-açúcar da Embrapa. Para avaliar e identificar genes normalizadores adequados para estudos de expressão gênica da estirpe HCC103, os níveis de mRNA de cinco genes candidatos (*rpoA*, *gyrA*, *dnaG*, *recA* e *gmK*) e oito genes alvo envolvidos no metabolismo de carbono (*acnA*, *fbp*, *galE*, *lpxC*, *suhB*, *wcaA*, ORF\_0127.0101 e \_0127.0123) foram quantificados por RT-qPCR após o crescimento da bactéria no caldo de quatro variedades de cana-de-açúcar ou três outras fontes de carbono. A análise da estabilidade da expressão gênica, calculada através dos programas GeNorm e Normfinder, indicou os genes *dnaG* e *gyrA* como os mais estáveis na estirpe HCC103 cultivada nas condições estabelecidas. Os genes se mostraram adequados, com variação de expressão relativa entre as fontes de carbono e com níveis de expressão mais elevados da ORF\_0127.0101, que codifica para um transportador de açúcar. Os maiores níveis de expressão gênica dessa ORF ocorreram quando a estirpe HCC103 foi cultivada na presença de 0,5% de glicose, de 0,5% de aconitato e nos caldos das variedades de cana de açúcar RB867515 e SP701143. Os genes *lpxC* e *suhB* que codificam, respectivamente para UDP-3-O-(3-hidroxiiristoil)-N-acetilglucosamina desacetilase e SuhB inositol monofosfato, apresentaram níveis de expressão relativa superiores quando a bactéria foi crescida em 0,5% de glicose, 100% de caldo de cana da variedade RB867515 e 0,5% de aconitato. Em conclusão, os resultados sugerem que os genes *dnaG* e *gyrA* são adequados para uso como genes normalizadores na análise RT-qPCR da estirpe HCC103. Em adição, indicam que o caldo das diferentes variedades de cana-de-açúcar modula a expressão dos genes analisados e envolvidos no metabolismo do carbono, com expressão gênica relativamente alta na fonte glicose e no caldo de cana-de-açúcar da variedade RB867515.

**Palavras-chave:** Normalizadores internos, expressão relativa, RNA-Seq.

## ABSTRACT

RT-PCR is an important tool to evaluate gene expression; however, requires specific internal normalizing genes for the different experimental conditions. There are no information in the literature related to internal normalizing genes for data validation in *H. rubrisubalbicans* strain HCC103, an endophyte that is part of the bacterial consortium of the sugarcane inoculant. To assess and identify standardizing genes suitable for HCC103 gene expression studies, mRNA levels of five candidate genes (*rpoA*, *gyrA*, *dnaG*, *recA* and *gmK*) and eight target genes involved in carbon metabolism (*acnA*, *fbp*, *galE*, *LpxC*, *suhB*, *wcaA*, ORF\_0127.0101 and \_0127.0123) were quantified by RT-qPCR after growth the bacteria in broth of four sugarcane varieties and three carbon sources. Analysis of gene expression stability, calculated through the GeNorm and Normfinder programs, indicated the *dnaG* and *gyrA* genes as the most stable in the HCC103 strain cultivated under the established conditions. These genes were found to be suitable, with variation of relative expression between the carbon sources and with higher expression levels for the ORF\_0127.0101, which codes for a sugar transporter. The highest levels of gene expression of this ORF occurred when the HCC103 strain was grown in presence of 0.5% glucose, 0.5% aconitate and in sugarcane juice of varieties RB867515 and SP701143. The *lpxC* and *suhB* genes encoding UDP-3-O- (3-hydroxymyristoyl) -N-acetylglucosamine deacetylase and *SuhB* inositol monophosphate, respectively, had higher relative expression levels when the bacteria was grown at 0.5% glucose, 100 % sugarcane juice of variety RB867515 and 0.5% aconitate. In conclusion, the results suggest that the *dnaG* and *gyrA* genes are suitable for use as normalizing genes in the RT-qPCR analysis of the HCC103 strain. In addition, indicate that juice of different sugarcane varieties modulate the gene expression involved in the Carbon metabolism with relatively high gene expression in glucose and sugarcane juice of variety RB867515.

**Keywords:** internal normalizing, relative expression, RNA-Seq.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Herbaspirillum*, constituído por 11 espécies, possui somente 03 espécies (*H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, e *H. frisingense*) que apresentam a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (BALDANI et al., 2014). Além dessa característica, estirpes dessas espécies possivelmente contribuem para o crescimento vegetal empregando outros mecanismos, tais como: produção e secreção de reguladores de crescimento, produção de sideróforos e atividade antagonística contra fitopatógenos (BASTIÁN et al., 1998; RADWAN et al., 2002; RONCATO-MACCARI et al., 2003). A espécie *H. rubrisubalbicans* tem sido relatada em associação com raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1996; OLIVARES et al., 1996). Apesar de colonizar o interior dos tecidos vegetais, sem causar sintomas visíveis de doença (OLIVARES et al., 1997), a inoculação artificial de algumas estirpes de *H. rubrisubalbicans* (IBSBF 175 e LGM 2286) provocou a formação de estrias mosqueadas nas folhas de cana-de-açúcar (Variedade B-4362) e estrias vermelhas em sorgo (PIMENTEL et al., 1991) e promoveu uma densa colonização dos elementos de vaso do xilema de sorgo associado aos sintomas da doença nas folhas (JAMES et al., 1997). A estria mosqueada (GALLI et al., 1980) é considerada uma doença de pouca importância econômica para cana-de-açúcar, pois está restrita a poucas variedades como por exemplo a B-4362 (OLIVARES et al., 1997).

Os ácidos orgânicos, málico e succínico, são as principais fontes de carbono para crescimento de *H. rubrisubalbicans* incluindo a estirpe HCC103 (BALDANI et al., 1996); entretanto, outros ácidos tais como o aconítico, cítrico e glucônico e os açúcares glicose e frutose e os poliálcoois manitol e sorbitol além do glicerol também são usados como fontes de carbono (BALDANI et al., 2014). A estirpe HCC103 tem despertado interesse biotecnológico uma vez que faz parte do consórcio de bactérias diazotróficas que constitui o inoculante desenvolvido para a cana-de-açúcar (REIS et al., 2009). Aumentos significativos de produção de colmo de diversas variedades de cana-de-açúcar foram observados com a inoculação do consórcio dessas bactérias diazotróficas (OLIVEIRA et al., 2006; SCHULTZ et al., 2012; PEREIRA et al., 2016).

O caldo de cana, assim como o apoplasto, tem sido alvo constante de pesquisas para o melhor entendimento da interação da cana-de-açúcar e as bactérias diazotróficas (DONG et al., 1994; ASIS JÚNIOR et al., 2004; TEJERA et al., 2006; CORDEIRO et al., 2013). O caldo de cana de variedades brasileiras é constituído basicamente de água

(75 a 86%), sacarose (10 a 23,5%), glicose (0,2 a 1,0%) e frutose (0 a 0,5%), açúcares redutores (0,1 a 2,0%), cinza (0,3 a 0,5%), compostos nitrogenados (0,5 a 1,5%) e pH entre 5,2 a 6,8 (DELGADO, 1975; LIMA et al., 2001). Dentre essa diversidade de compostos, a sacarose está em maior concentração entre os dissacarídeos, enquanto a glicose e frutose estão entre os monossacarídeos (WALFORD, 1996). Entre os ácidos orgânicos, as maiores concentrações (ppm/Bx) são de aconítico (5000 a 8000) e do málico (1200 a 1800) (Meade e Chen, 1977; CELESTINE-MYTRIL e PARFAIT, 1988).

Estudos de expressão gênica têm sido comuns e fundamentais para os avanços de conhecimento, tanto em procariontes como eucariontes. Entre os métodos que quantificam os níveis de expressão gênica, o RT-qPCR permite a identificação de genes diferencialmente expressos, sendo a técnica mais adequada principalmente quando há muitos genes a serem testados e quando as condições experimentais são bastante diversificadas (BUSTIN et al., 2009); no entanto para a utilização da RT-PCR é necessária a normalização dos dados com o objetivo de controlar o erro experimental relativo à expressão de RNA entre as amostras. O uso de genes referência para a normalização dos níveis de RNA é uma alternativa largamente utilizada (KARGE et al., 1998; TAYLOR e MRKUSICH, 2014). No entanto, a escolha dos genes normalizadores internos deve ser criteriosa, pois se o gene referência escolhido apresentar elevadas variações nos valores de expressão, o mesmo torna-se inviável para os estudos de normalização. A variação no nível de expressão dos genes referência com as condições experimentais pode levar a resultados e interpretações incorretas (DHEDA et al., 2004; 2005; BUSTIN et al., 2009; ROCHA et al., 2015). Os genes normalizadores internos devem ser testados para cada condição experimental específica e posteriormente utilizado como normalizadores internos para as condições alvo do estudo (DHEDA et al., 2005).

A validação de gene referência é fundamental, pois pode solucionar um problema recorrente que é avaliar a estabilidade da expressão gênica diante da ausência de qualquer gene referência. Existem algumas consequências desse problema, como o uso de gene como normalizador interno para amostras coletadas em condições experimentais diferentes daquelas em que a estabilidade da expressão do gene normalizador foi testada. Além disso, o uso de genes normalizadores que não foram publicados e/ou foram selecionados para técnicas como *Northern blotting* (Qualitativa) tornam-se inapropriados para a RT-qPCR, que é altamente precisa (GUÉNIN et al.,



2009). Vários trabalhos envolvendo normalizadores internos para bactérias diazotróficas foram publicados nos últimos anos, como por exemplo, para *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (GALISA et al., 2012), *Azospirillum brasilense* (McMILLAN e PEREG, 2014), *H. seropedicae* HRC54 (PESSOA et al., 2016) e *Paraburkholderia tropica* Ppe8 (SILVA et al., 2016). Esses trabalhos validaram normalizadores para as bactérias cultivadas em diferentes fontes de carbono; além do caldo de cana da variedade RB867515 para a estirpe PPe8.

Ainda não existe na literatura informações sobre genes normalizadores internos para a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 isolada de cana-de-açúcar. Esse estudo teve como objetivo identificar genes para serem usados como normalizadores internos para estudos de expressão gênica da bactéria *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 cultivada em diferentes condições de crescimento.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Estirpe bacteriana e condições de crescimento**

A estirpe HCC103 (BR11504) de *H. rubrisubalbicans* foi obtida no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) na Embrapa Agrobiologia. A bactéria foi cultivada no meio JNFb (BALDANI et al., 2014) líquido (pH 5,5) contendo 0,5% de ácido málico (T1), ou substituindo a fonte de carbono por 0,5% de ácido aconítico (T2) ou 0,5% de glicose (T3); além de tratamentos com 100% de caldo de cana das variedades: RB867515 (T4), IACSP95-5000 (T5), RB92579 (T6) e SP701143 (T7). As células na concentração inicial de  $10^5$  ufc.ml foram crescidas sob agitação a 150 rpm a 30°C até a fase de crescimento exponencial (D.O.<sub>600nm</sub> 1,25). Nesta fase foi realizada a coleta de células para a extração do RNA total por meio de centrifugação de 3.000 *xg* a 4°C por 10 minutos.

### **2.2 Extração do RNA e síntese do cDNA**

O RNA total foi isolado com Trizol conforme as recomendações do fabricante. Pureza e integridade do RNA apropriadas para RT-qPCR foram confirmadas através do QuBit e observada em gel de agarose 2%. As amostras contendo 10 µg de RNA foram tratadas com a enzima DNase por 40 minutos a 37°C seguido da inativação da enzima a 65°C por 5 minutos. A síntese do cDNA foi realizada através do kit Superscript™ III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) de acordo com o manual do fabricante. Para a reação de transcrição reversa foram utilizados 5 µg de RNA total e 250 ng random

primers de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA (diluição 1:20) foi utilizado para a reação de RT-qPCR.

### 2.3 Escolha dos candidatos a genes referência e desenho das sequências iniciadoras para análises por RT-qPCR

Cinco genes (Tabela 1) foram selecionados com base nas informações de literatura e usados como candidatos a normalizadores internos nas reações de RT-qPCR. As sequências ortólogas foram pesquisadas no genoma da *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 que está depositado no Servidor da Embrapa Agrobiologia. Os iniciadores para RT-qPCR foram desenhados através dos programas Oligo (RYCHLIK, 2007) e Primers3Plus (UNTERGASSER et al., 2007), que consideram diversos parâmetros tais como: conteúdo CG (55-65%), a temperatura de *melting* (aproximadamente 62°C), comprimento do produto da PCR (100-150 pb) e alinhamentos indesejáveis. Em seguida, os oligonucleotídeos foram sintetizadas pela *Integrated DNA Technologies*.

**Tabela 1.** Produto, função dos genes candidatos a normalizadores internos.

Gene	Produto	Funções essenciais conhecidas	Referências
<i>rpoA</i>	Sigma RNA polimerase fator $\alpha$	Início da transcrição	Metcalf et al., 2010; Liu et al., 2013; Sumby et al., 2012; Galisa et al., 2012; Løvdaal e Saha, 2014; Silva et al., 2016; Pessoa et al., 2016
<i>gyrA</i>	DNA girase (topoisomerase tipo II), subunidade A	Replicação, recombinação e reparo do L-DNA	Florindo et al., 2012; Metcalf et al., 2010; Liu et al., 2013; Nieto et al., 2009; Sumby et al., 2012; Brudal et al., 2013; Carvalho et al., 2014; Kirk et al., 2014; Stenico et al., 2014; Jacob et al., 2011; McMillan e Pereg, 2014; Pessoa et al., 2016
<i>dnaG</i>	Primase	Iniciação da replicação do DNA cromossômico	Carvalho et al. 2014; Galisa et al. 2012
<i>recA</i>	Recombinase	Recombinação e reparo de DNA. Catalisa o emparelhamento de ssDNA com regiões complementares de dsDNA	Liu et al., 2013; Nieto et al. 2009; Sumby et al., 2012; Stenico et al., 2014; McMillan e Pereg, 2014; Galisa et al., 2012; Zhao et al., 2011; Løvdaal e Saha 2014; Sihto et al., 2014; Silva et al., 2016; Pessoa et al., 2016
<i>gmk</i>	Guanilato quinase	Metabolismo nucleotídico	Nieto et al., 2009; Sumby et al., 2012; Galisa et al., 2012

## 2.4 Experimento de RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizada no termociclador 7500 Fast Real Timer PCR (Applied Biosystems) usando o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A reação de PCR foi composta de: 7,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix, diferentes concentrações para cada par de iniciadores (Tabela 2) e 5,0 µl de cDNA molde na diluição de 1:20 em um volume final de reação de 15 µl. Os ciclos foram realizados com o padrão do programa 7500 v 2.0.5 com as seguintes condições: 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 20 segundos a 95°C e 30 segundos a 58°C. Três réplicas técnicas assim como três sínteses independentes de cDNA foram utilizadas em todos os ensaios da RT-qPCR.

**Tabela 2.** Características dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes candidatos a normalizadores na RT-qPCR.

Nome do gene candidato	Sequência direta (5'-3') Sequência reversa (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Concentração na reação de RT-qPCR (nmol)	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
<i>rpoA</i>	CCCACCGAAGTGACCATCGC GCAGCTTGAAGACCACGCCC	112	500	62
<i>gyrA</i>	ATGAACAACGTCTGGAACCG GGGTGTCATAGATGGAGGCG	103	300	60
<i>dnaG</i>	GCCTGACGAGTGGGATAGCC CACCTGCCCCTTGGTATTGC	172	300	62
<i>recA</i>	ACATCCTGTATGGCGAAGGC GATAGTTGCGGGCATTGTCC	144	500	62
<i>gmk</i>	TGCTGCTGGAAATCGACTGG GGATACGGCGTGTGATGACG	156	750	62

Os principais pontos avaliados na PCR em tempo real foram o Ct (*Cycle threshold*) e a eficiência da amplificação. Para analisar a estabilidade dos níveis de expressão de cada gene nas sete condições experimentais, foram utilizados os programas GeNorm e NormFinder (ANDERSEN et al., 2004).

## 2.5 Análise da estabilidade dos níveis de expressão gênica

Os valores de Ct dos genes normalizadores avaliados neste estudo, obtidos por meio do software Miner (VANDESOMPELE et al., 2002), foram importados através do software v1.3.5 QBASE (HELLEMANS et al., 2007) e convertidos em quantidades relativas não normalizadas, corrigida pelo os valores de eficiência de amplificação para cada gene, usando a fórmula  $Q=E^{\Delta Ct}$ , em que: E corresponde à eficiência da amplificação do gene e  $\Delta Ct$  é a amostra com a menor expressão entre os dados

subtraído do valor Ct da amostra a que se refere. Estes dados não normalizados foram importados de forma independente para os programas GeNorm V3.5 e NormFinder (ANDERSEN et al., 2004), para determinar os genes de referência mais adequados para as condições experimentais aplicadas.

A análise do perfil de expressão dos genes-alvo (Tabela 3) foi realizado com as mesmas amostras de cDNA utilizadas para selecionar os genes de referência. Os mesmos critérios utilizados para os genes de referência foram aplicados nas reações de RT-qPCR. A análise para quantificação relativa (RQ) e os valores de eficiência Ct foram determinados utilizando o programa Miner (ZHAO e RUSSEL, 2005). Estes valores foram utilizados para calcular as expressões relativas no programa QBASE v1.3.5.

**Tabela 3.** Características dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes alvo na RT-qPCR.

Gene alvo	Sequência direta (5'-3') Sequência reversa (5'-3')	Tamanho do Amplicon (pb)	Concentração da reação de RT-qPCR (nmol)	Tm (°C)
<i>acnA</i>	GCAAGTTCTACTCCCTGCCC GGTCTTCCAGTGGCTTCTTG	129	500	65
<i>fbp</i>	GATTCCCGAAGACACCAAGG CGTAGCGTAGGAGTTAGCAC	179	300	65
<i>galE</i>	GCCACGAGGTCATCGTCTTC CGTTCTGCGAGAGGGACCAG	95	500	65
<i>lpxC</i>	CGTCATGGATGAGTACCGCA CGATACTGCGGGTGTTTCAGG	142	300	65
<i>suhB</i>	ATGGCTTCCCGCAATACTGC CGGATGGACTTGCTTTTCGC	136	750	65
<i>wcaA</i>	CGACACCGAGATCCTGGTCC CCTGTTGCACGACTAGAGCG	128	750	65
<i>ORF_0127.0101</i>	AGATCAACGACACCAAGACC GCTTGACCTTCCTTCAGGAC	101	500	65
<i>ORF_0127.0123</i>	AGTCCTTCCACGGCATAGCG GCGACTACTCCTACTGCGGG	108	500	65

## 2.6 Quantificação relativa (RQ) dos níveis de expressão dos genes *acnA*, *fbp*, *galE*, *lpxC*, *suhB*, *wcaA* e *ORF\_0127.0101*, *\_0127.0123* por RT-qPCR

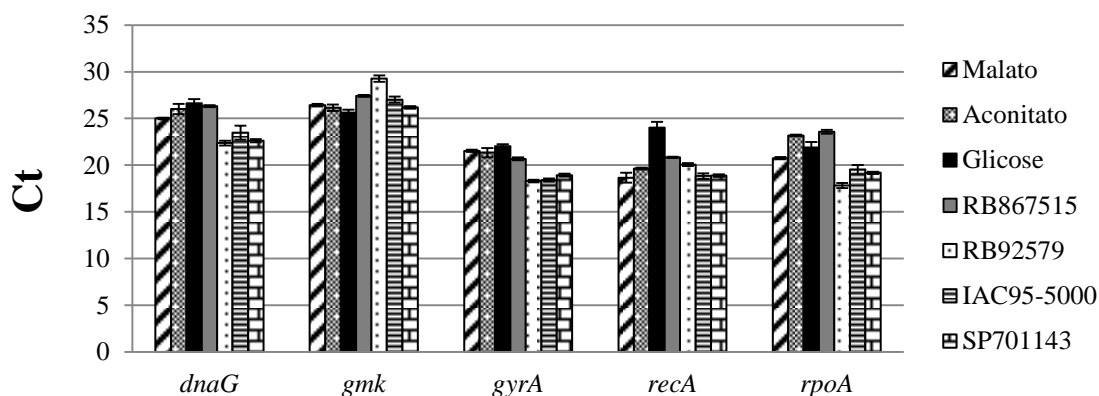
Os níveis de transcrição dos oito genes alvos foram mensurados pela RT-qPCR durante a fase de crescimento exponencial da *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 em ácido málico com fonte de carbono (Tratamento utilizado como calibrador de acordo

com a curva de crescimento nessa fonte). Quantificação relativa (QR) no tratamento calibrador = 1. Os genes *dnaG* e *gyrA* foram utilizados como referência para a normalização dos dados.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Níveis de estabilidade da expressão dos genes candidatos à referência e análise de estabilidade

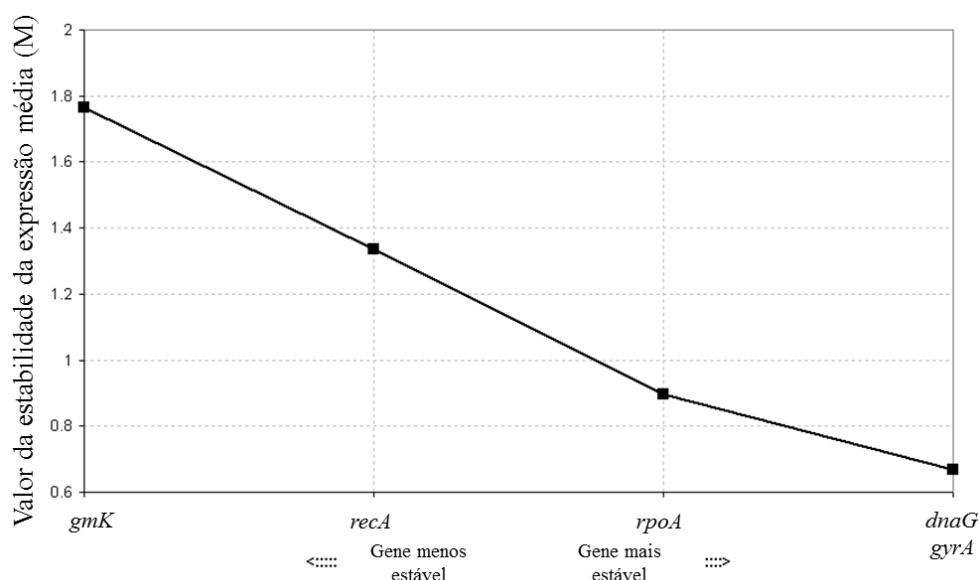
O valor de  $C_t$  para cada gene de referência avaliado a partir do cDNA da estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* cultivada em diferentes fontes de carbono e caldos de diferentes variedades de cana é apresentado na figura 1. Os valores de  $C_t$  variaram de 17,82 a 29,27 indicando diversos níveis de expressão dos genes durante o crescimento bacteriano nas fontes de carbono e nos caldos das diferentes variedades de cana-de-açúcar. O gene *gmK* apresentou os maiores níveis de expressão (Média) em relação aos demais genes, seguido pelo gene *dnaG*, com médias de 26,87 e 24,63, respectivamente. Os genes *rpoA*, *gyrA* e *recA* apresentaram níveis de expressão menores e com valores médios de  $C_t$  20,84, 20,17 e 20,14, respectivamente.



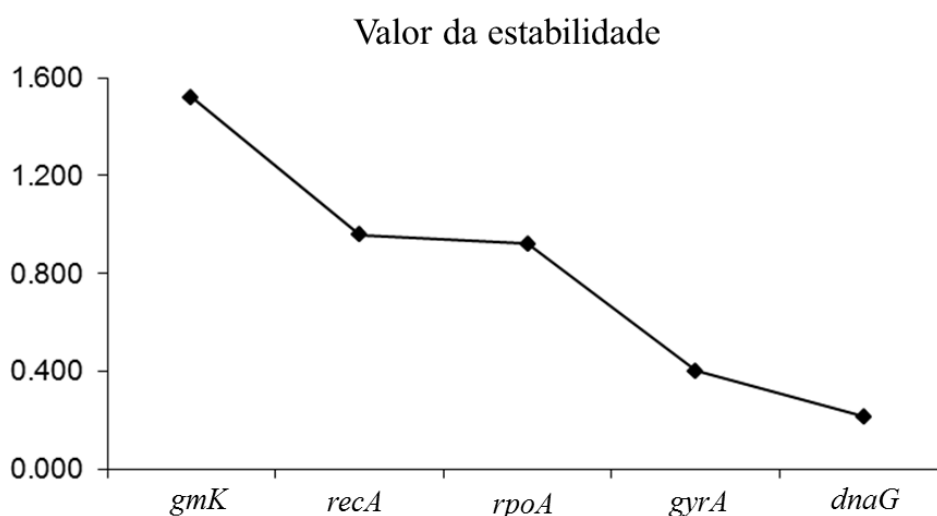
**Figura 1.** Níveis de expressão dos cinco genes candidatos a normalizadores internos da estirpe HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* cultivada em diferentes fontes de carbono e caldos de cana-de-açúcar. Os valores de  $C_t$  foram calculados a partir de três repetições biológicas.  $C_t$  (*Cycle threshold*). As barras indicam o desvio padrão da média.

Os resultados da análise de estabilidade de expressão dos genes candidatos à referência de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103, cultivada no meio JNFb suplementado com as diferentes fontes de carbono e nos caldos de cana de diferentes variedades, são apresentados na figura 2 (Programa GeNorm) e na figura 3 (Programa

NormFinder). Os genes *dnaG* e *gyrA* apresentaram menor média de estabilidade de expressão no GeNorm (0.68), seguidos pelo gene *rpoA* (0.89), e portanto foram os candidatos a genes referência mais estáveis de acordo com as análises em ambos os programas. Em contraste, os genes *recA* e *gmK* foram os menos estáveis nas análises realizadas nos dois programas. De acordo com esses dois programas faz-se a exclusão gradual do gene menos estável (Esquerda) até chegar ao gene mais estável (Direita).



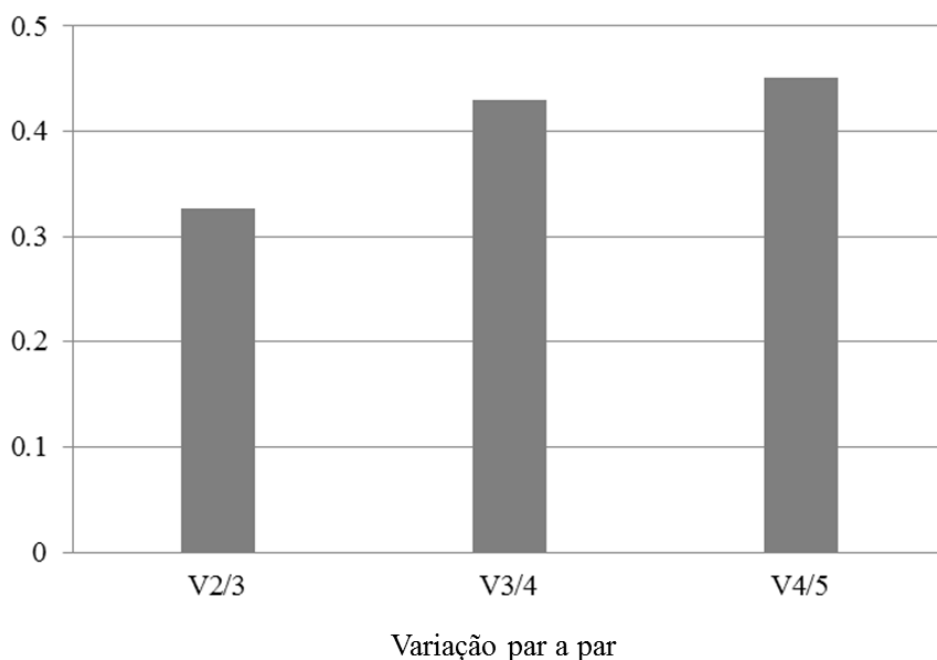
**Figura 2.** Estabilidade média dos níveis de expressão dos genes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 nas condições de crescimento definidas (Meio JNFb suplementado com ácido málico, ácido aconítico ou glicose; e em caldos de cana de diferentes variedades) e analisada através do programa GeNorm.



**Figura 3.** Estabilidade média dos níveis de expressão dos genes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 nas condições de crescimento definidas (Meio JNFb

suplementado com ácido málico, ácido aconítico ou glicose e, em caldos de cana de diferentes variedades) e analisadas através do programa NormFinder.

Além disso, foi realizada a análise através do programa GeNorm para definir o número ideal de genes necessário para a normalização, conhecida como variação par a par ( $V_n/V_{n+1}$ ). Os resultados de variação de pares apresentaram valores de 0,326, 0,429 e 0,450, respectivamente para V2/3, V3/4 e V4/5 (Figura 4). A partir desse resultado verificamos que a normalização do experimento não irá melhorar com a adição de mais genes aos dois mais estáveis, pois a precisão não melhora. De acordo com a literatura o ideal é que esse valor seja menor ou igual a 0.15. Diante disso, apenas os dois genes mais estáveis foram utilizados para a normalização do experimento. Maiores informações baseadas na literatura dão suporte ao uso (A seguir).



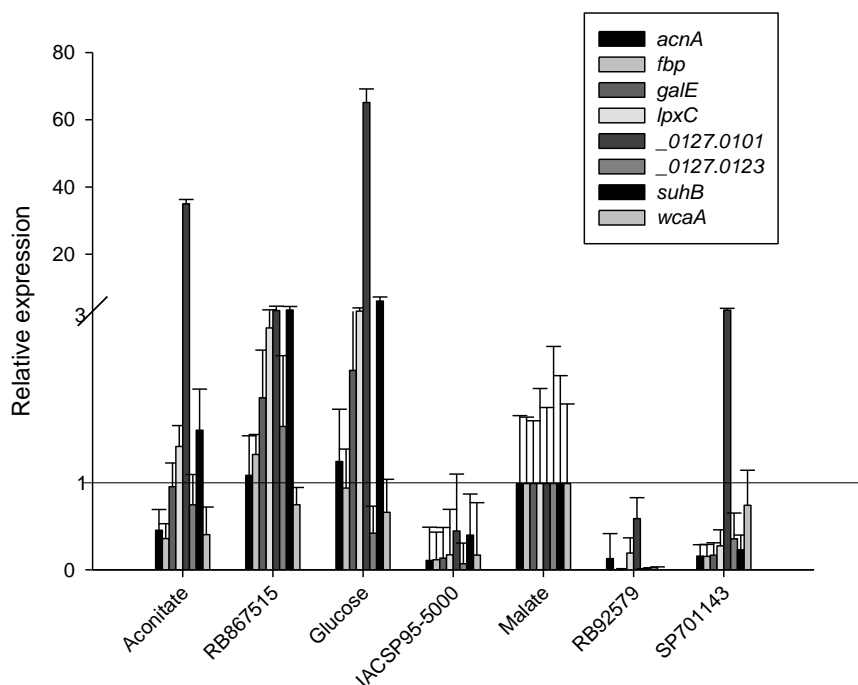
**Figura 4.** Determinação do número ótimo de genes normalizadores. Cada barra representa alteração na precisão quando mais um gene é adicionado de acordo com a ordem estabelecida na figura 3.

### 3.2 Quantificação relativa (RQ) dos genes alvos *acnA*, *fbp*, *galE*, *lpxC*, *suhB*, *wcaA* e *ORF\_0127.0101*, *\_0127.0123*.

Os níveis de expressão relativa dos genes *acnA*, *fbp*, *galE*, *lpxC*, *suhB*, *wcaA*, *ORF\_0127.0101* e *ORF\_0127.0123* de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 variaram

de acordo com as diferentes fontes de carbono e com os caldos de cana das diferentes variedades quando comparado com o ácido málico usado como controle basal. Não houve um comportamento padrão entre os genes, com exceção para a ORF\_0127.0101 (Componente periplasmático de um transportador de açúcar), que apresentou um nível de expressão relativa superior aos outros genes para todos os tratamentos (Figura 5). Os maiores níveis de expressão gênica ocorreram quando a estirpe HCC103 foi cultivada na presença de 0,5% de glicose, de 0,5% de aconitato e nos caldos das variedades de cana de açúcar RB867515 e SP701143, respectivamente.

Os genes alvos variaram seus níveis de expressão quando a bactéria foi crescida nos caldos das quatro variedades de cana de açúcar. Entretanto, a variedade RB867515 se destacou entre as demais com um maior nível de expressão relativa para todos os genes. Em contraste, um menor nível de expressão relativa foi observado para todos os genes quando a estirpe HCC103 foi cultivada nos caldos das variedades de cana-de-açúcar IAC95-5000 e RB92579. Os genes *lpxC* e *suhB* apresentaram níveis de expressão relativa superiores a maioria dos outros genes quando a bactéria foi crescida em 0,5% de glicose, 100% de caldo de cana da variedade RB867515 e 0,5% de aconitato, respectivamente (Figura 5).



**Figura 5.** Expressão relativa de genes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 cultivada em sais do meio JNFb suplementado com diferentes fontes de carbono e em caldos de cana (100%) de diferentes variedades. Os níveis de expressão gênica foram quantificados usando RT-qPCR e o método comparativo threshold



( $\Delta\Delta CT$ ) através do programa qBase v1.3.5. Os genes *dnaG* e *gyrA* foram utilizados como referência para normalização dos dados, e o meio JNFb com ácido málico foi utilizado como calibrador (Controle). As barras indicam o erro padrão da média.

#### 4. DISCUSSÃO

RT-qPCR é um dos métodos mais utilizados para a quantificação de ácidos nucleicos, pois é uma técnica muito específica e apresenta uma alta sensibilidade (BUSTIN et al., 2002; GACHON et al., 2004). Um aspecto essencial dos estudos de RT-qPCR é a utilização de genes de referência (Normalizadores internos) para a normalização dos dados. Trabalhos recentes validaram e/ou sugeriram genes normalizadores internos para bactérias diazotróficas cultivadas na presença de diferentes fontes de carbono, como *gyrA* e *glyA* para *Azospirillum brasilense* estirpes Sp245 e Sp7 (McMILLAN et al., 2014); *rho*, *23S rRNA* e *rpoD* para *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 (GALISA et al., 2012); *rpoA* para *H. seropedicae* estirpe HRC54 (PESSOA et al., 2016); *lpxC*, *gyrB* e *recA* para *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8 (SILVA et al., 2016). Na revisão de Rocha e colaboradores (2015), os autores destacaram a importância de se obter genes normalizadores internos para cada estirpe bacteriana em estudo e para as diversas condições de crescimento as quais o estudo necessite.

Os genes *dnaG* e *gyrA* tiveram os seus níveis de expressão mais estáveis quando a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* foi cultivada em diferentes fontes de carbono e nos diferentes caldos de cana, enquanto que o gene *rpoA* foi o terceiro mais estável. O gene *rpoA* foi o mais estável para a bactéria do mesmo gênero *H. seropedicae* estirpe HRC54, quando crescida em diferentes fontes de carbono (Presença de glicose, ácido cítrico, manitol, ácido málico e extrato de raiz de cana), o que não ocorreu para o gene *dnaG* (PESSOA et al., 2016). O comportamento do gene *rpoA* se repetiu para outra bactéria diazotrófica, *G. diazotrophicus* estirpe PAL5, quando foi cultivada no meio LGI contendo diferentes fontes de carbono. O mesmo esteve entre os três genes mais estáveis, juntamente com os genes *rpoC* e *gmK*, porém o mesmo não ocorreu para o gene *dnaG*, que apresentou uma alta instabilidade (GALISA et al., 2012). Os genes *gyrA* e *recA* foram os mais estáveis na bactéria diazotrófica *A. brasilense* (estirpes Sp245, Sp7, e a mutante Sp7-flcAD - deleção do gene *flcA* não floculante) crescida em três diferentes condições (NB: caldo de nutrientes; Meio de floculação; Meio sem nitrogênio) (McMILLAN et al., 2014).

Os genes *recA* e *gmK* foram os menos estáveis na *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103. Em contraste, o gene *recA* foi o mais estável quando a bactéria patogênica em humanos, *Vibrio parahaemolyticus*, foi crescida sob diferentes temperaturas (15, 25, 37 e 42°C) (MA et al., 2015). Para a bactéria diazotrófica *Paraburkholderia tropica* estirpe Ppe8, os genes mais estáveis nas seis condições testadas (Presença de aconitato, glicose, frutose, manitol, sacarose e caldo de cana da variedade RB867515) foram *recA*, *lpxC*, e *gyrB* (SILVA, et al., 2016). Outros estudos também relatam o gene *recA* entre os mais estáveis (COUTARD et al., 2007; FLORINDO et al., 2012; McMILLAN et al., 2014). Os resultados aqui apresentados confirmam a necessidade da seleção dos genes referência para as condições experimentais estabelecidas (DHEDA et al., 2004). A literatura tem mostrado que os níveis de expressão de genes normalizadores, ocasionalmente constante num determinado tipo de célula ou condição experimental, podem variar consideravelmente (BUSTIN et al., 2000; VANDESOMPELE et al., 2002; ROCHA et al., 2015).

VANDESOMPELE et al. (2002) relatam que a normalização através de mais de um gene normalizador é necessária já que propicia uma maior precisão na avaliação do nível de expressão. Outros autores também destacam a importância do uso de mais de um gene normalizador interno para a normalização de resultados de RT-PCR (BUSTIN et al., 2009; KOZERA e RAPACZ, 2013). Por outro lado, o uso de muitos genes normalizadores internos pode ser impraticável já que a correção da eficiência deve ser testada tanto nos genes alvo quanto nos genes normalizadores (SCHMITTGEN e LIVAC, 2008) quando normalmente a quantidade de amostra é limitante. Na avaliação par a par, calcula-se a variação através de dois fatores de normalização sequenciais, sucessivamente, indicando o efeito da adição de mais um gene na normalização. O ideal é que a variação par a par seja inferior à 0,15, ou seja, abaixo desse valor não é necessário a inclusão de um novo gene normalizador (VANDESOMPELE et al., 2002). Os resultados deste trabalho mostraram valores acima de 0,15, similares aos encontrados e aplicados por SUN et al. (2015), LU et al. (2013), e SILVA et al. (2016) para a validação de genes na larva do inseto *Sesamia inferens*, da Lepdoptera *Spodoptera liturae*, e na bactéria *B. tropica*, respectivamente.

A análise dos níveis de expressão dos genes alvos ORF\_0127.0101 e ORF\_0127.0123, envolvidos com o sistema de transporte de açúcar do tipo ABC (do inglês *ATP-binding cassette*), por meio do uso dos genes normalizadores *dnaG* e *gyrA*, mostrou que os níveis de expressão dos genes alvos variaram de acordo com a fonte de carbono e

com os caldos das diferentes variedades de cana usados para crescimento da estirpe HCC103. O sistema de transporte do tipo ABC de açúcar tem a característica de acoplar a energia de hidrólise do ATP à translocação de uma grande variedade de substâncias para dentro ou fora das células e organelas (ANNILO et al., 2006). Especificamente, a ORF\_0127.0101 teve seus níveis de expressão relativa aumentada em todas as fontes de carbono e nos caldos das variedades de cana. Vários sistemas de transporte de açúcar do tipo ABC, além de um sistema de transporte tipo PEP (fosfoenolpiruvato)/PTS (fosfotransferases) estão presentes no genoma da espécie diazotrófica *H. seropedicae*, pertencente ao gênero *Herbaspirillum* (PEDROSA et al., 2011). Estudos com a bactéria fitopatogênica *Agrobacterium tumefaciens*, mostraram que a região a jusante (*Downstream*) do gene *cheV* (Virulência), codifica para o mesmo sistema de transporte do tipo ABC de açúcar do presente estudo (KEMNER et al., 1997). Os genes *cheV*, *gguA* (Codifica para um possível proteína de ligação a ATP) e *gguB* (codifica para uma possível permease) fazem parte de um operon. Existem relatos de que essas proteínas estão relacionadas ao transporte de xilose em *E. coli* (SUMYA et al., 1995). Já em *A. brasilense* uma proteína similar a CheV, designada SbpA (Proteína A de ligação a açúcar), está envolvida com absorção de D-galactose, além da quimiotaxia da bactéria para D-galactose, L-arabinose e D-fucose (BASTEALAEERE et al., 1999).

A expressão relativamente superior da maioria dos genes da estirpe HCC103 quando cultivada no caldo da variedade RB867515 em relação às outras variedades podem estar relacionadas com a capacidade responsiva dessa variedade a inoculação (SCHULTZ et al., 2012), ou seja, apresenta características e concentrações de constituintes (açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos) favoráveis à expressão desses genes. Essa variedade é considerada promissora para os estudos de inoculação com bactérias diazotróficas (PEREIRA et al., 2013), com aumentos significativos de produtividade quando inoculado com o coquetel de bactérias diazotróficas, que inclui a estirpe HCC103 (REIS et al., 2009). Não há uma explicação lógica para a baixa expressão dos genes na bactéria quando cultivada na presença dos caldos de outras variedades de cana-de-açúcar, já que, normalmente, os macro constituintes (açúcares, macronutrientes) e pH são muito similares nas diferentes variedades. Por outro lado, é sabido que a planta de cana-de-açúcar produz diferentes tipos e teores de flavonoides. COLOMBO et al. (2006) encontraram 0,6 mg de flavonoide por ml de caldo de cana, entre os quais estavam: Schaftoside, Isoschaftoside, vitexina, dimetil-luteolina-8-C-glicosídeo. Outros

flavonoides também foram identificados no caldo de variedades comerciais tais como tricina-7-O-b-(6-metoxicinâmico)-glucosídeo e orientina (DUARTE-ALMEIDA et al., 2007) e a flavona diosmetina-8-C-glicosídeo (VILA et al., 2008). O papel desses flavonoides na expressão de genes da estirpe HCC103 ainda é desconhecido. Sabe-se que em rizóbio alguns flavonoides (Luteolina e genisteína) têm papel na indução da transcrição de genes para a biossíntese dos fatores Nod, que são percebidos pela planta para que ocorra a infecção e, conseqüentemente, a simbiose (LIU e MURRAY, 2016). Flavonoides também atuam como antioxidantes (MIERZIAK et al., 2014), podem ser produzidos (Fitoalexinas) como resposta à penetração do fungo oídio em pepino (McNALLY et al., 2003). Foi possível identificar 25 flavonas em 20 extratos diferentes de folhas de plantas de cana-de-açúcar (COUTINHO et al., 2016), indicando que as mesmas podem apresentar uma diversidade de flavonoides e devem ser investigadas quanto a interação planta-bactérias como também como antioxidantes.

O flavonoide naringenina, tem papel específico na indução de nodulação em *R. leguminosarum* (DÈNARIÈ et al., 1992) e de colonização de arroz por *Azorhizobium caulinodans* (JAIN e GUPTA, 2003). Estudos recentes de transcriptômica foi demonstraram que a naringenina reprime os genes envolvidos na biossíntese de lipopolissacarídeo (LPS), como *rfbG*, *galE*, *rfbBC* e *wcaGA* durante a interação da bactéria *H. seropedicae* SmR1 e plantas de milho (TADRA-SFEIR et al., 2015). Os autores sugerem que alterações na superfície celular são comuns em outras bactérias quando elas interagem diretamente com as plantas ou na presença de seus compostos (TADRA-SFEIR et al., 2015). A indução desses genes sugere a biossíntese de lipopolissacarídeo (LPS) como uma forma de adaptação da bactéria ao ambiente modificado pela adição dos caldos e das fontes de carbono.

As enzimas frutose-1,6-bifosfatase, assim como a fosfoenolpiruvato quinase, D-lactato e L-lactato desidrogenase estão envolvidos no processo de gliconeogênese (PEDROSA et al., 2011). Todos os genes que codificam para essas enzimas estão também estão presentes no genoma de *H. seropedicae* SmR1 (PEDROSA et al., 2011). Em *H. rubrisubalbicans* HCC103 a frutose-1,6-bifosfato é codificada pelo gene *fbp* (NCBI). Nossos resultados mostraram que houve a indução da expressão do gene *fbp* na estirpe HCC103 quando crescida na presença do caldo-de-cana da variedade RB867515, muito provavelmente devido à diversidade de açúcares e ácidos orgânicos presentes no caldo dessa variedade (WALFORD, 1996; ASIS JUNIOR et al., 2004, TEJERA et al., 2006); entretanto, o mesmo comportamento do gene *fbp* não se repetiu para os caldos

das outras variedades de cana, sugerindo a necessidade de pesquisa mais aprofundada dos constituintes do caldo de cana de cada variedade, com o objetivo de identificar algum composto que possa ter limitado a expressão do gene. A frutose-1,6-bifosfato é importante para a produção de glicose, a partir da sua hidrólise em frutose-6-fosfato e em íon fosfato catalisada pela frutose-1,6-bifosfatase que dá continuidade ao processo (KORNBERG et al., 2006). A presença dos genes *fbp* e *fba* (Frutose-1,6-bisfosfato aldolase e frutose-1,6-bisfosfatase) no genoma de *Rhizobium* sp. estirpe TAL1145, sugere que o piruvato obtido da degradação da mimosina (aminoácido produzido pela planta *Leucaena leucocephala*), pode ser utilizado para síntese de glicose por meio da gliconeogênese (AWAYA et al., 2003). A enzima *fbp* é essencial para a simbiose da bactéria nodulífera *Burkholderia phymatum* STM815 e as plantas hospedeiras (CHEN et al., 2016). A atividade dessa enzima frutose-1,6-bifosfatase é estimulada pela presença do ATP, logo se a célula tem ATP disponível, a formação de glicose é favorecida.

A enzima SuhB inositol monofosfato é importante na via de sinalização do fosfatidilinositol, que está envolvida na transdução de sinais em mamíferos e plantas. A enzima é responsável por desfosforilar o inositol fosfato a inositol (DROBAK, 1992). Neste trabalho os maiores níveis de expressão gênica do gene *suhB* ocorreram quando HCC103 cresceu na presença de glicose e de caldo de cana da variedade RB867515. Estudos de proteômica realizados por CORDEIRO et al. (2013) mostraram um aumento da expressão da proteína SuhB inositol monofosfato quando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 foi cultivada na presença do extrato de cana da variedade B-4362. Os autores sugeriram que o evento observado é uma forma de adaptação da bactéria ao ambiente, levando a uma alteração metabólica diante da disponibilidade de nutrientes. Em *Burkholderia cenocepacia* o gene *suhB* foi essencial para a formação de biofilme, secreção de proteínas e motilidade (ROSALES-REYES et al., 2012). Estudos com *Pseudomonas aeruginosa* PAK, causadora de infecções em humanos, mostraram que o gene *suhB* é essencial para a expressão do sistema de secreção do tipo 3, relacionado à infecção aguda. A literatura sugere o envolvimento desse gene desde a formação de biofilme, secreção de proteínas e motilidade até a patogenicidade aguda, porém o comportamento é variável entre as bactérias patogênicas (ROSALES-REYES et al., 2012; LI et al., 2013).

O presente estudo também mostrou que o gene *galE* teve seu nível de expressão aumentado na presença da glicose e do caldo de cana da variedade RB867515, que apresentaram pelo menos o dobro da expressão em relação à estirpe crescida na fonte de

carbono ácido málico (controle). Esse aumento ocorreu provavelmente como forma de adaptação da bactéria ao ambiente rico em açúcares e ácidos orgânicos. Da mesma forma como foi observada para outros genes, também não ocorreu a expressão do gene nos caldos das outras variedades de cana-de-açúcar. O gene *galE*, assim como o gene *wcaAG*, estão envolvidos na biossíntese dos lipopolissacarídeos (LPS) em *H. seropedicae* estirpe SmR1 (TADRA-SFEIR et al., 2015). O nocaute do gene *galE* em *Bradyrhizobium japonicum* 61A101C afetou o perfil do LPS, sugerindo que o *galE* é responsável pela alteração da estrutura do lipopolissacarídeo na bactéria. Além disso, plantas de soja inoculadas com esse mutante *galE* não apresentaram nodulação até os 20 dias após a inoculação, diferente da estirpe selvagem (CHANG et al., 2008). Mutações no gene *galE* na bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* resultou na diminuição da produção de biofilme (LI et al., 2014). Esse gene é considerado um importante fator de virulência em diversas bactérias, como *Erwinia amylovora* (METZGER et al., 1994) e *Aeromonas hydrophila* (AGARWAL et al., 2007). Sabe-se que a espécie *H. rubrisubalbicans* possui representantes que podem causar a doença da estria mosqueada em variedades suscetíveis de cana-de-açúcar (B-4362) (OLIVARES et al., 1997), além da estria vermelha em sorgo (PIMENTEL et al., 1991). Diante disso, genes relacionados à virulência de outras bactérias fitopatogênicas devem ser investigados nessa espécie, de maneira a melhor conhecer essa relação. Sabe-se que a produção de ramnose (*rmlB* e *rmlC*) é importante para a colonização de SmR1 em plantas de milho (BALSANELLI et al., 2010), por isso pesquisas com objetivo de conhecer a estrutura do lipopolissacarídeo vem sendo realizadas para esses genes (SERRATO et al., 2012). Em *H. rubrisubalbicans* M1 foram construídos mutantes (*rmlB*, *waaL* e *wecB*) relacionados com a produção de LPS e os resultados mostraram que esses genes não são essenciais para a colonização de raízes de milho e nem para a formação da doença da estria vermelha em sorgo, no entanto foram importantes para a competição na rizosfera (TOMAZINI, 2016).

O gene *lpxC* tem como produto a UDP-3-O-(3-hidroxi-*miristoil*)-N-acetilglucosamina desacetilase. Esse gene também faz parte do grupo de genes responsáveis pela biossíntese de LPS em *H. seropedicae* (BALSANELLI, 2013). No presente estudo o gene *lpxC* teve sua expressão aumentada na presença de glicose e do caldo de cana da variedade RB867515. Os LPS são essenciais para a sobrevivência de muitas bactérias Gram-negativas, por isso enzimas da sua biossíntese, LpxA, LpxC e LpxD, tem sido alvos de pesquisas (WANG et al., 2010). O gene *lpxC* é estudado como

alvo de antibióticos nas bactérias patogênicas a humanos, pois catalisa o passo da biossíntese de lipídio A (endotoxina) (BARD et al., 2008). Tanto o acúmulo quanto a ausência da enzima LpxC são letais para *E. coli* (OGURA, 1999; FÜHRER, 2006). Não existem muitas informações sobre o papel do gene *lpxC* na estirpe HCC103.

O gene *wcaA*, que codifica para uma glicosil transferase, apresentou elevados níveis de expressão quando a estirpe HCC103 foi cultivada na presença do ácido málico, da glicose e dos caldos de cana das variedades RB867516 e SP701143. Em *Escherichia coli*, o gene *wcaA* é um dos genes chaves para a biossíntese do ácido colônico. O nocaute desse e de outros genes chaves (*wza*, *wzb*, *wzc*, e *wcaA*) interrompeu a produção do exopolissacarídeo (REN et al., 2016). A mutação do gene *wssD* na estirpe M1 de *H. rubrisubalbicans*, também envolvido com a biossíntese de exopolissacarídeo (EPS), afetou negativamente a produção de EPS, sugerindo que possa ter diminuído a síntese de celulose, o que impactou a formação de biofilme, motilidade, adesão, e colonização epifítica e endofítica de raízes de milho, indicando a importância da celulose já no início da interação entre a planta e bactéria (TULESKI, 2013). A composição monossacarídica dos EPSs produzidos pela estirpe selvagem M1 e pela estirpe mutante TRT1 de *H. rubrisubalbicans* foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Foram observadas diferenças no conteúdo de ramnose, xilose e glicose; contudo, não foi observada diferença no conteúdo de EPS produzido, ou seja, a composição foi alterada, mas não a quantidade (TULESKI, 2013). Esses genes, entre outros, estão potencialmente envolvidos na interação planta-*H. seropedicae* (PEDROSA et al., 2011). Nossos resultados sugerem que ocorreu a formação de exopolissacarídeos como forma de adaptação ao ambiente, principalmente ao caldo da variedade RB867515.

O gene *acnA*, que codifica para a aconitato hidratase, catalisa a hidratação reversível de *cis*-aconitato a citrato ou isocitrato no ciclo do ácido cítrico (LEHNINGER, 2011). Neste estudo, verificou-se um decréscimo nos níveis de expressão gene na presença do ácido aconítico no meio de cultivo, porém um aumento na presença de glicose, ácido málico e do caldo de cana da variedade RB867515. Os maiores níveis de maior expressão do gene *acnA* quando crescida no caldo (RB867515) sugere que a bactéria precisa de mais energia para se adaptar ao ambiente e suprir as mudanças metabólicas necessárias. O *trans*-aconitato é um dos ácidos orgânicos encontrados em maiores concentrações no caldo de cana-de-açúcar, assim como a sacarose entre os açúcares (ASIS JÚNIOR et al., 2003). Os teores de *trans*-aconitato são

relativamente maiores se comparados aos *cis*-aconitato, devido à forma *cis* ser utilizada diretamente no ciclo do ácido cítrico, não sendo acumulado na mesma proporção. Nas células da cana a forma *trans* pode isomerizar para a forma *cis*, que é em seguida é consumida (WALFORD, 1998). A enzima responsável por essa reação é a Aconitato isomerase, mas essa reação pode ocorrer espontaneamente (CAI et al., 1999). Existem ainda autores que relatam que o *trans*-aconitato é inibidor de duas enzimas chaves do ciclo do ácido cítrico, a aconitase (ROSE, 1995) e a fumarase (LLOYD et al., 1999). Essas informações poderiam explicar a baixa expressão da aconitase quando a estirpe HCC103 foi crescida na presença do *trans*-aconitato (0,5%). Existem relatos que a bactéria *H. seropedicae* pode utilizar tanto a forma *cis*-, quanto a forma *trans*-aconitato (BELLONE et al., 2006). Os ácidos orgânicos como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato, *cis*- e *trans*-aconitato são as fontes de carbono preferidas do gênero *Herbaspirillum* (BALDANI et al., 1996; BALDANI et al., 2014). Foi demonstrado que a estirpe PA18 de *H. rubrisubalbicans* prefere o aconitato em detrimento a sacarose (ASIS JUNIOR et al., 2003). Existem diferentes estudos sobre a aconitato hidratase, como por exemplo, em *Rhizobium tropici* PRF 81 onde a enzima AcnA foi induzida quando a bactéria foi cultivada a 35°C mas não a 28°C (GOMES et al., 2012). Já em *E. coli*, o gene *acnA* foi induzido na fase estacionária em resposta ao ferro e ao estresse oxidativo (CUNNINGHAM et al., 1997; WILLIAMS et al., 2002). Essa enzima juntamente com *acnB*, são consideradas as responsáveis pelo sucesso da proliferação da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) em tomate e pimenta (KIRCHBERG et al., 2012). Essas informações podem ser importantes, pois estirpes de *H. rubrisubalbicans* (M1, IBSBF175, M4 e HCC103) apresenta um perfil fitopatogênico na variedade de cana-de-açúcar B-4362 (OLIVARES et al., 1997) e em sorgo (PIMENTEL et al., 1991; JAMES et al., 1997).

Existem poucas informações sobre os constituintes dos caldos de cana de açúcar utilizados nesse trabalho. Segundo a literatura as variedades RB867515 e IACSP95-5000 destacam-se pelos altos teores de sacarose (ESALQ, 2011; IAC, 2012), enquanto que as variedades SP701143 e RB92579 o fazem pela alta produção de açúcares de maneira geral (VIERA, 1993; BARBOSA, et al., 2003). BURR et al. (1957) observou a presença de vitamina A, inositol, ácidos aconítico, cítrico, fumárico, glicólico, málico, oxálico, mesacônico, succínico, siringico e ascórbico na garapa. Pesquisas metabólicas sobre os constituintes dos caldos de cana das variedades em estudo são



necessárias para melhor subsidiar a discussão da expressão diferencial de genes nas diferentes bactérias endofíticas que colonizam cana-de-açúcar.

## 5. CONCLUSÃO

- ✓ Foi possível identificar dois genes normalizadores internos, *gyrA* e *dnaG*, entre os cinco genes testados, para uso nas avaliações dos níveis de expressão gênica diferencial por RT-qPCR de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 crescida em diferentes caldos de cana e fontes de carbono.
- ✓ A maioria dos genes alvos desse estudo tiveram seus maiores níveis de expressão quando a bactéria foi cultivada no caldo de cana da variedade RB867515 ou em glicose, com destaque para os genes *subB*, *lpxC*, *galE*, e ORF\_0127.0101.
- ✓ Houve um comportamento diferenciado dos genes alvos na estirpe HCC103 e de acordo com as três fontes de carbono e os caldos das quatro variedades de cana.
- ✓ A grande diferença nos níveis de expressão dos genes nos diferentes caldos abre nova perspectiva para entender as diversas respostas das variedades de cana-de-açúcar a inoculação com bactérias diazotróficas.

### III. CAPÍTULO 2

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA  
ENDOFÍTICA *Herbaspirillum rubrisubalbicans* ESTIRPE HCC103  
CULTIVADA NA PRESENÇA DO LÍQUIDO DO APOPLASTO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR DA VARIEDADE RB867515**

## RESUMO

As bactérias diazotróficas são capazes de realizar o processo de fixação biológica do nitrogênio (BNF) e liberar o N fixado dentro dos tecidos de cana-de-açúcar e, portanto, se torna uma alternativa potencial ao uso do fertilizante nitrogenado. Dentre as bactérias diazotróficas que colonizam a cana-de-açúcar encontra-se a espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; porém os mecanismos da interação desta bactéria com a planta de cana-de-açúcar ainda são pouco explorados. Na busca por informações sobre a funcionalidade bacteriana envolvida na interação bactéria-planta, tem-se utilizado a ferramenta de transcriptômica nos últimos anos. Em adição, existem relatos sugerindo que o apoplasto seja um nicho preferencial das bactérias diazotróficas, logo os componentes presentes no líquido do apoplasto pode oferecer informações importantes sobre essa interação. O presente trabalho teve por objetivo estudar o papel do líquido do apoplasto da variedade RB867515 na expressão gênica global da *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 por meio das análises transcriptômicas. Para tanto, a estirpe HCC103 foi cultivada em meio JNFb líquido a 30°C e 150 rpm até a metade da fase de crescimento exponencial quando então o caldo bacteriano foi dividido em três porções equivalentes, às quais foram adicionados os seguintes tratamentos: 50% de água destilada (MA); 50% de líquido do apoplasto (MLA); 50% de meio JNFb novo (MM). O RNA foi coletado e extraído duas horas após a aplicação dos tratamentos, e analisado quanto à expressão diferencial. Para a identificação dos genes diferencialmente expressos foi empregada a plataforma Ion-Proton e, posteriormente, utilizadas as ferramentas de bioinformática CLC, Blast2Go, WebMGA (Classificação funcional – COG). Os resultados da análise transcriptômica mostraram que as categorias funcionais: i. Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; ii. Transcrição, Mecanismos de tradução de sinal e, iii. Transporte de aminoácidos, se destacaram em números de genes reprimidos. Em contraste, as categorias de Metabolismo e transporte de carboidrato; de aminoácido, Mecanismos de transdução de sinal e Transcrição apresentaram maior número de genes induzidos nas duas comparações (MLA vs. MA e vs. MM). Genes que codificam para a enzima nitrato redutase se destacaram com altos valores de expressão na presença do líquido do apoplasto em ambas as comparações. A expressão dos genes *trpS*, *trpE*, *ORF\_0004.0014* e, *ORF\_0084.0016* por RT-qPCR confirmaram os dados gerados no transcriptoma. Em conclusão, os resultados permitiram à identificação de uma variedade de genes envolvidos na interação planta bactéria em resposta à presença do líquido do apoplasto, como por exemplo, genes que codificam para proteínas do sistema de secreção do tipo 6 (SST6), flagelo e mecanismos de transdução de sinais. Este trabalho, pioneiro, deverá apoiar pesquisas futuras sobre a interação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 com a planta de cana-de-açúcar e possivelmente permitir a identificação de biomarcadores que auxiliem na maximização do potencial biotecnológico da bactéria como biofertilizante em diferentes variedades de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de nitrogênio, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, transcriptoma.

## ABSTRACT

The diazotrophic bacteria are able to perform the biological nitrogen fixation (BNF) process and release de fixed N inside the sugarcane tissues and therefore become a potential alternative to nitrogen fertilizer application. Among the diazotrophic bacteria that colonize sugarcane are the species *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; however, the mechanisms of this bacterial interaction with sugarcane plant are still little explored. In the search for information about the bacterial functionality involved in the bacteria-plant interaction, transcriptomic tool has been applied in the last years. In addition, there are reports suggesting that the apoplast is a preferred niche for diazotrophic bacteria, so the components present in the apoplast fluid can offer important information about this interaction. The objective of the present work was to study the role of the apoplast fluid of variety RB867515 in the gene expression in the *H. rubrisubalbicans* strain HCC103 by transcriptomic analyses. To accomplish that, strain HCC103 was grown in liquid JNFb medium at 30 ° C and 150 rpm until the half of the exponential growth phase when the bacterial broth was then divided into three equivalent portions and the following treatments we added: 50% distilled water (MA); 50% of the apoplast liquid (MLA); 50% of fresh JNFb medium (MM). RNA was collected and extracted two hours after application of the treatments and analyzed for differential expression. For the identification of the differentially expressed genes, the Ion-Proton platform was used and the bioinformatics tools CLC, Blast2Go, WebMGA (Functional Classification - COG) were used. The results of the transcriptomic analysis showed that the functional categories: i. Translation, ribosomal structure and biogenesis; Ii. Transcription, Signal Translation Mechanisms, and iii. Transport of amino acids presented the mostly high number of repressed genes. In contrast, the categories of metabolism and carbohydrate transport; Signal transduction and Transcription mechanisms presented the mostly high number of induced genes in both comparisons (*vs.* MA and *vs.* MM). In the class of production and energy conversion, the genes codifying for nitrate reductase enzyme were highly expressed in the presence of applopastic fluid in both comparisions. The expression of *trpS*, *trpE*, ORF\_0004.0014, and ORF\_0084.0016 genes by RT-qPCR confirmed the data generated in the transcriptome. In conclusion, the results identified a variety of genes involved in the bacterial plant interaction in response to the presence of apoplast fluid, such as genes encoding SST6 proteins, flagellum and signal transduction mechanisms. This pioneering work should support future research on the interaction of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* strain HCC103 with the sugarcane plant and possibly allowing the identification of biomarkers that help to maximize the biotechnological potential of the bacterium as a biofertilizer in different sugarcane varieties.

**Keywords:** Biological fixation of nitrogen, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, transcriptome.

## 1. INTRODUÇÃO

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

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é uma gramínea (Poaceae) que possui grande importância econômica para o Brasil, maior produtor mundial, cujas finalidades são a produção de açúcar e de álcool. A área plantada na safra de 2015/16 foi de 8,7 milhões de hectares, distribuídas em todos estados produtores conforme suas características (CONAB, 2016). A safra 2016/17 está estimada em 684,77 milhões de toneladas, com crescimento de 3,8% em relação à safra anterior (CONAB, 2016). Os maiores produtores são os estados de São Paulo, seguido por Goiás e Minas. A agroindústria do álcool e do açúcar tem importante papel na geração de emprego e estima-se que apenas nas atividades de corte envolvam aproximadamente 335 mil trabalhadores (VILAS BOAS e DIAS, 2009).

No primeiro semestre de 2016 foram fornecidos aos agricultores 1.747 mil toneladas de fertilizantes nitrogenados (N) (ANDA, 2016). O Brasil importou 2.836 mil toneladas de fertilizantes nitrogenados em 2014, e produziu apenas 568 mil (ANDA, 2015), acarretando em altos custos de produção agrícola. Portanto, para a redução de custos de produção pode-se utilizar a Fixação Biológica de Nitrogênio, um processo natural que depende da interação de alguns grupos de bactérias denominadas diazotróficas e algumas espécies de plantas. Estima-se que a tecnologia da FBN em soja (Leguminosa) seja responsável por uma economia ao redor de US\$ 10 bilhões ao ano, que deixam de ser gastos com a compra de fertilizantes nitrogenados no Brasil (HUNGRIA et al., 2007).

A contribuição da FBN para plantas de cana-de-açúcar pode chegar até 60% (BODDEY et al., 2001), sendo que esse valor é dependente da variedade e da interação com as bactérias diazotróficas (OLIVEIRA et al., 2006). Vários mecanismos moleculares estão envolvidos na interação planta-bactéria e diversos genes presentes em diferentes processos fisiológicos podem ser diferencialmente expressos durante a associação com as bactérias endofíticas (NOGUEIRA et al., 2001). Portanto, um maior entendimento desta interação levará a um avanço de conhecimento dos mecanismos que atuam na interação planta-bactéria de maneira a torná-la mais eficiente. ´

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

O nitrogênio na forma gasosa está numa concentração de aproximadamente 78% da atmosfera terrestre. É um dos maiores limitantes para a manutenção da vida no planeta, pois a maioria dos seres vivos não tem acesso a esta forma. Os únicos organismos capazes de converter o N atmosférico a formas assimiláveis são bactérias denominadas diazotróficas. Estas são uma pequena parcela dos procariotos, que apresentam grande diversidade fisiológica, genética e morfológica (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O nitrogênio participa da composição de ácidos nucléicos, proteínas e de alguns polissacarídeos entre outros compostos fundamentais. Sua assimilação dentro dos esqueletos de carbono é um processo vital, que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas, provocando importante efeito na sua biomassa e produção de grãos. A FBN tem grande importância na disponibilização de nitrogênio às plantas, na produção agrícola sustentável, assim como na proteção ambiental (DOBEREINER e URQUIAGA, 1992), pois contribui para a diminuição do consumo de insumos nitrogenados. Essas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbiose com as leguminosas ou estar associadas a outras plantas como, por exemplo, membros da família Poaceae. As bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o desenvolvimento vegetal tanto pelo fornecimento de N quanto por outros mecanismos, como produção de fitormônios e vitaminas essenciais, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógenos, modulação das vias de sinalização, tais como: síntese de etileno e resistência a estresses (DOBBELAERE et al., 2003; ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; SPAEPEN et al., 2007; RYAN et al., 2008; MOREIRA et al., 2010).

Estudos para quantificar a contribuição da FBN em dez variedades de cana-de-açúcar, utilizando o método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e balanço de N, mostraram que valores superiores a 60% de N acumulado na planta eram provenientes da FBN (URQUIAGA et al., 1992). Avaliações em 11 experimentos com cana-de-açúcar, através da técnica de abundância de  $^{15}\text{N}$ , mostraram que entre 25 a 60% do N assimilado pela planta foi proveniente da FBN (BODDEY et al., 2001).

A aplicação da técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em variedades de cana-de-açúcar (SP701143 e SP813250) inoculadas no estágio de micropropagação das mudas com uma mistura de cinco bactérias diazotróficas mostrou que a FBN contribuiu com aproximadamente 30% do N acumulado nos tecidos (OLIVEIRA et al., 2006). Segundo

os estudos realizados por HERRIDGE et al. (2008), a contribuição média brasileira com a FBN em cana-de-açúcar seria de 40 kg de N por hectare, tomando por base uma média de 20% do N assimilado pela planta. Estudos realizados com 6 variedades comerciais de cana-de-açúcar crescidas naturalmente no campo e não inoculadas mostraram que as mesmas foram capazes de obter de 40,2 a 64,0 kg.ha<sup>-1</sup> de N através do processo da FBN (URQUIAGA et al., 2011). Plantas de cana-de-açúcar de diferentes regiões do Brasil (SP, MG, AP, TO, PA e DF), das Filipinas e do Japão, foram avaliadas quanto à abundância natural de N<sup>15</sup> (Referência: plantas invasoras), resultando numa contribuição média de 30% (Variação de 0 a 72%) para o conteúdo total de N total (YONEYAMA et al., 1997). No Brasil a contribuição média obtida foi de 32% (Variação de 0 a 60%) (POLIDORO et al., 2001).

Após experimentação em laboratório e casa de vegetação, cinco estirpes de bactérias diazotróficas foram selecionadas para a formulação do inoculante de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002, 2003). Os estudos demonstraram uma incorporação de até 30% de N total, quando plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foram inoculadas com uma mistura de bactérias diazotróficas (OLIVEIRA et al., 2002). Estudos com duas variedades (RB857515 e RB72454) de cana-de-açúcar, inoculadas com a mistura das bactérias diazotróficas e comparadas com o controle não inoculado e com o fertilizante nitrogenado (120 kg.ha<sup>-1</sup> de N), mostraram um comportamento distinto na resposta à inoculação. Somente a variedade RB867515 respondeu positivamente tanto à inoculação quanto à adubação nitrogenada mineral com uma produtividade similar tanto nas plantas inoculadas como nas plantas adubadas com fertilizante nitrogenado (SCHULTZ et al., 2012). A análise da resposta das variedades de cana-de-açúcar RB857515 e RB72454, cultivadas em duas áreas e três safras, a inoculação com a mistura das 5 estirpes mostrou que apenas a variedade RB72454 foi responsiva à inoculação com aumento do rendimento de colmos (Segunda soca; Usina Cruangi); enquanto que na variedade RB867515 (Cana planta; Cruangi) foi observada uma contribuição da fixação de nitrogênio derivada da inoculação quando avaliada por meio da técnica de abundância natural de <sup>15</sup>N (SCHULTZ et al., 2016). Outro estudo envolvendo as variedades (RB867515, RB855536 e RB92606) inoculadas com as bactérias em mistura e separadamente (Estirpes BR 11512, BR 11724 e BR 11411), mostrou que a variedade RB867515 foi a mais responsiva à inoculação, com diferenças significativas no acúmulo de biomassa seca e fresca (PEREIRA et al., 2013).

### 1.3. Gênero *Herbaspirillum*

As bactérias interagem com as plantas de quatro maneiras: como patógenos, simbioses, epifíticas ou endofíticas sendo que a interação com os endofíticos é a menos compreendida (INIGUEZ et al., 2005). Bactérias endofíticas podem ser classificadas como aquelas que passam a maior parte do seu ciclo de vida no interior dos tecidos de plantas, sem causar sinais de patogenicidade (ROSENBLUETH et al., 2006). As bactérias diazotróficas associadas às plantas não leguminosas também podem ser classificadas como: microrganismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios (BALDANI et al., 1997).

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* possuem ocorrência de forma mais restrita do que as demais espécies diazotróficas atualmente conhecidas, apresentam baixa sobrevivência no solo, sendo consideradas endofíticas obrigatórias (BALDANI et al., 1996). Algumas representantes desse gênero são capazes de colonizar o interior dos tecidos vegetais e transferir compostos nitrogenados produzidos eficientemente para planta, já que não sofrem limitações de substâncias ricas em carbono (OLIVARES et al., 1997). Além disso, esse ambiente é mais protegido do oxigênio e de outros fatores inibitórios, como a competição com outros microrganismos no solo e, portanto apresentam potencial para fixar nitrogênio em maiores níveis.

O gênero *Herbaspirillum* encontra-se no domínio Bacteria, filo Proteobacteria, classe Betaproteobacteria. Bactérias deste gênero são Gram negativas, na maioria das vezes vibróides, possuem entre 0,6-0,7 µm de diâmetro, com comprimento variando de 1,5 a 5,0 µm. Apresentam motilidade e têm de 1 a 3 flagelos em um ou ambos os polos da célula. O metabolismo é respiratório e não fermentam açúcares (BALDANI et al., 1986). Essas bactérias fixam N<sub>2</sub> atmosférico em condições microaeróbicas (BALDANI et al., 2005) e toleram mudanças drásticas de pH (5,3-8,0).

O gênero é constituído por 11 espécies: *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986); *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996); *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001); *H. lusitanum* (VALVERDE et al., 2003); *H. chlorophenicum* (IM et al., 2004); *H. autotrophicum* (DING e YOKOTA, 2004); *H. huttiense* (DING e YOKOTA, 2004) subsp *huttiense* e subsp *putei* (DOBRITSA et al., 2010); *H. rhizosphaerae* (JUNG et al., 2007), *H. aquaticum* (DOBRITSA et al., 2010), *H. hiltneri* (ROTHBALLER et al., 2006). Seis espécies, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. hiltneri* e *H. rhizosphaerae*, são encontradas na rizosfera ou em associação com a planta (CARDOSO, 2015).



Uma das bactérias diazotróficas desse gênero mais estudada e que também é integrante do inoculante de cana-de-açúcar é a *Herbaspirillum seropedicae*. Esta foi isolada primeiramente por BALDANI et al. (1986) em associação com raízes de sorgo (*Sorghum bicolor*), colonizando raízes, caule e parte aérea de arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Zea mays*) (OLIVARES et al., 1996). Posteriormente, algumas espécies do gênero *Herbaspirillum* foram isoladas de abacaxizeiros e bananeiras no Brasil (WEBER et al., 2000). Pesquisas com a cultura do arroz mostraram que dependendo da variedade e da estirpe bacteriana, *Herbaspirillum* pode fixar de 19 a 54% do nitrogênio (KENNEDY et al., 2004). A inoculação com *H. seropedicae* têm apresentado resultados bastante promissores, com incremento de massa seca em plantas de arroz (FERREIRA et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2011). Plantas de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de *H. seropedicae* apresentaram maior contribuição da FBN em relação às plantas não inoculadas (CANUTO et al., 2003).

#### **1.4. *Herbaspirillum rubrisubalbicans***

*Pseudomonas rubrisubalbicans* foi reclassificada por BALDANI et al. (1996) como *H. rubrisubalbicans*, nome derivado de *ruber* - vermelho, e *subalbicans* - esbranquiçado, ou seja, vermelho-esbranquiçado, referindo-se aos sintomas da doença estria mosqueada provocada por este organismo em algumas variedades suscetíveis de cana-de-açúcar (Figura 6) (OLIVARES et al., 1997). A célula apresenta formato curvo, comprimento médio variando de 1,5 a 5 µm e diâmetro de 0,6 a 0,7 µm. É móvel devido aos múltiplos flagelos em um dos polos. Sua temperatura ótima de crescimento é 30°C, podendo ser cultivada até 40°C, e cresce em meio semi-sólido livre de nitrogênio formando uma película em forma de véu, assim como *H. seropedicae*. Os ácidos orgânicos são as principais fontes de carbono para crescimento destas espécies (BALDANI et al., 1996). Como brevemente citado acima, representantes de *Herbaspirillum* apresentam um perfil fitopatogênico em variedades susceptíveis de cana-de-açúcar e em sorgo. Nas plantas de sorgo, tanto *H. rubrisubalbicans* quanto *H. seropedicae* (Z67) colonizam os vasos do xilema, enquanto em cana-de-açúcar (B-4362) estirpes de *H. rubrisubalbicans* (M1, M4, IBSBF175 e HCC103), também colonizam o mesófilo foliar. Essas características que resultam na diferença de sintomatologia/doença, uma vez que nas plantas de sorgo (Doença: estria vermelha) ocorre a colonização do sistema vascular seguida pela necrose, devido à deficiência de nutrientes e água causados pelo bloqueio dos vasos. Já em cana-de-açúcar (Estria

mosqueada), os sintomas são de estrias vermelhas (Devido ao bloqueio dos vasos), adicionado ao fundo mosqueado verde-amarelo, devido à invasão dos espaços intercelulares das células do mesófilo foliar (OLIVARES, 1997).



**Figura 6.** Sintomas da doença estria mosqueada, causada por *H. rubrisubalbicans* na variedade B-4362 de cana-de-açúcar, 20 dias após a inoculação. A seta grande indica região necrosada e a seta pequena o ponto de inoculação (Fonte: OLIVARES et al., 1997).

*H. rubrisubalbicans* é uma bactéria endofítica, pois passa a maior parte de seu ciclo de vida no interior de tecidos vegetais, principalmente de gramíneas, sem causar dano aparente ao seu hospedeiro. Diversos autores relatam a ocorrência desta espécie em raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1996; OLIVARES et al., 1996). Além de ser associativa, promove o crescimento vegetal através da produção e secreção de reguladores de crescimento, possui atividade antagonística contra fitopatógenos, ainda fornece à planta o nitrogênio fixado biologicamente (RONCATO-MACCARI et al., 2003). A relação entre a bactéria e a planta hospedeira é obrigatória no caso de *H. rubrisubalbicans*, característica que lhe dá alto potencial de uso na agricultura, por ser um nicho livre de fatores inibitórios da FBN (BALDANI et al., 1997).

Existem alguns estudos referentes à doença estria vermelha, por exemplo, em plantas de sorgo, onde foi observada densa colonização do sistema vascular das folhas, 5 dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans* (Estirpes M1, M4 e IBSBF175)

(JAMES et al., 1997). Plantas de sorgo, depois de inoculadas artificialmente com *H. seropedicae* (Z67 e Z78), apresentaram sintomas da doença estria vermelha, mas não em cana (PIMENTEL et al., 1991).

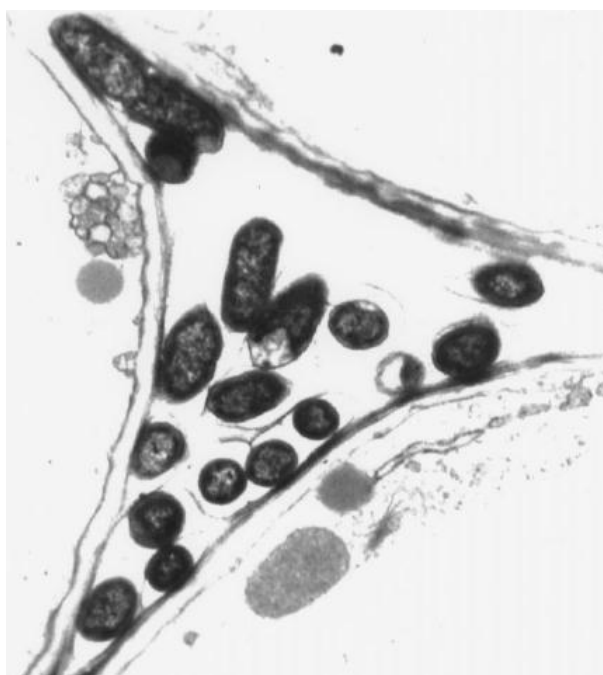
Quando a variedade suscetível de cana de açúcar B-4362 foi inoculada com mutantes de *H. rubrisubalbicans* para os genes *hrpE* e *hrcN* [Envolvidos no Sistema de Secreção do tipo III (SST3)], não foram observadas lesões da doença estria mosqueada, evidenciando assim a importância desse sistema no desenvolvimento da doença (SCHMIDH et al., 2013). No mesmo viés, esse sistema tem se mostrado importante para a colonização endofítica, que foi prejudicada em plantas de arroz e de milho, quando inoculadas com estirpes mutantes nocauteadas para os mesmos genes citados. Estudos de proteômica em plantas de milho (cv. DKB240) inoculadas com a estirpe *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, cultivadas *in vitro* e colhidas 7 dias após a inoculação observaram a expressão da proteína bacteriana ATP sintase do SST3 durante a interação *H. seropedicae* e raízes (FERRARI et al., 2014).

Estudos sobre os efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas (*H. rubrisubalbicans* M4; *H. seropedicae* ZAE72, ZAE94 e ZAL152; e *Burkholderia brasilensis* M130) em arroz de sequeiro em experimentos de casa de vegetação e de campo, mostraram que a ZAE94 foi a que promoveu maior aumento (50%) na produção de grãos (GUIMARÃES et al., 2003). Vinte e uma estirpes de *Herbaspirillum* (*H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* e *H. frisingense*) foram avaliadas quanto à contribuição da FBN em duas variedades de milho, empregando a técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ). As estirpes HCC103 e B4362 de *H. rubrisubalbicans*, ZAE94 de *H. seropedicae* e 74B de *H. frisingense* tiveram excelente desempenho no total de N acumulado na planta derivado da FBN. A estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* destacou-se, apresentando o melhor desempenho sob condições controladas e no campo, aumentando o rendimento de milho em até 34% (ALVES et al., 2015).

### 1.5. Líquido do apoplasto

O apoplasto é o conjunto dos compartimentos existentes exteriormente à membrana plasmática vegetal, incluindo a parede celular e o xilema (HASLAM et al., 2003). O apoplasto desempenha um papel importante numa variedade de processos, incluindo a sinalização intercelular, interações planta-microrganismo, além de desempenhar o transporte de água e nutrientes/solutos através de um tecido ou órgão (SATTELMACHER, 2001; CAMBELL e REECE, 2002). Acredita-se que bactérias

diazotróficas preferem o apoplasto das plantas, pois o simplasto apresenta restrição a íons, açúcares e outros solutos principalmente pela permeabilidade da membrana (STEUDLE e FRESCH, 1996). Estudos evidenciam esse nicho como preferencial para a colonização pelas diazotróficas endofíticas (DONG et al., 1994; HECHT-BUCHHOLZ, 1998; MCCULLY, 2001; JAMES, 2000). Essas bactérias, da mesma forma que as fitopatogênicas, possuem a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto (Figura 7), vasos condutores e, eventualmente, o interior da célula (KLOEPER, 1978).

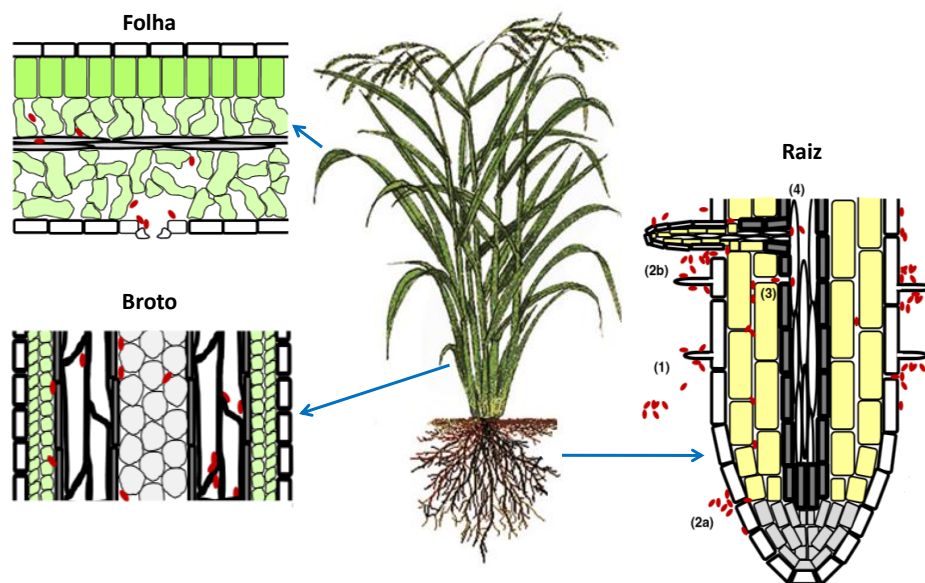


**Figura 7.** Colonização da região apoplástica de hastes da planta de milho por bactérias endofíticas (Fonte: SATTELMACHER, 2001).

Durante a interação com seu hospedeiro, a bactéria detecta metabólitos vegetais específicos, que são usados como sinais para a expressão gênica bacteriana. A solução do apoplasto da cana-de-açúcar contém ácidos orgânicos, tais como aconitato, malato e citrato, além de açúcares, como a sacarose, a frutose e a glicose (ASIS JÚNIOR et al., 2003). Vários compostos estiveram presentes no apoplasto e no simplasto de três variedades de cana-de-açúcar, inoculadas e não inoculadas com *Gluconacetobater diazotrophicus*, com concentração de solutos orgânicos no simplasto 1,5 vezes maior que no apoplasto, independente variedade, além de maior quantidade de nitrito no

apoplasto. Os açúcares, aminoácidos, proteínas, amônia e nitrato estiveram em maiores quantidades no simplasto na maioria das variedades (TEJERA et al., 2006).

Algumas bactérias sistêmicas também podem usar o lúmen dos vasos do xilema para se espalhar por toda a planta (COMPANT et al., 2008a). Esse tipo de colonização tem sido mais relatado como percurso para a propagação da bactéria endofítica para alcançar as diversas partes da planta (Figura 8). Várias bactérias rizosféricas também podem entrar na planta, colonizar os tecidos internos e promover o crescimento vegetal (HALLMANN e BERG, 2007).



**Figura 8.** Colonização de plantas por *Herbaspirillum seropedicae*. A associação de *H. seropedicae* (pontos vermelhos) com a planta hospedeira em condições de laboratório inicia com a quimiotaxia das bactérias em direção à raiz da planta e adesão à superfície radicular, preferencialmente na zona dos pêlos radiculares (1). A maior parte das bactérias permanecem aderidas à superfície das raízes, algumas penetram através de discontinuidades da epiderme, como a zona de alongamento (2a) e fendas laterais de raiz (2b). A colonização interna é rápida, com ocupação dos espaços intercelulares de raiz, juntamente com a colonização de aerênquimas (no arroz) e xilema (3). Algumas bactérias movem-se a partir das raízes para as partes aéreas através do xilema (4), e eventualmente colonizam brotos e folhas, onde eles podem se espalhar para os espaços intercelulares e cavidades subestomais. Adaptado de MONTEIRO et al. (2012).

## **1.6. Transcriptômica e outras ferramentas no conhecimento da interação bactéria-planta**

O conhecimento da estrutura de um gene ou de outro elemento funcional é somente parte da resposta que precisamos, a necessidade vai mais além, está na elucidação da função dos genes e o que resultará da comparação de dados, como interação de genomas com o ambiente ou níveis de expressão gênica com o desenvolvimento normal e patológico.

A transcriptômica é uma importante ferramenta em biologia molecular e que vem sendo utilizada para a interpretação dos elementos funcionais do genoma e o entendimento dos componentes moleculares de células e tecidos (WANG et al., 2009). O transcriptoma refere-se ao conjunto completo dos transcritos de um organismo em um determinado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica, importante para compreensão da estrutura gênica e da regulação RNA-dependente (SOREK e COSSART, 2010). As proteínas são os componentes do processo ativo da maquinaria celular, sendo o DNA que armazena as informações para sua síntese, a qual é mediada pelos respectivos RNAm (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 RNAm (MAGALHÃES, 2007). O transcriptoma é variável de acordo com os diferentes tipos de células, tecidos e órgãos de um dado indivíduo e da condição fisiológica (PASSOS et al., 2000).

Análises do transcriptoma da bactéria *Deinococcus gobiensis* (Resistente à radiação UV), através da metodologia de sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-Seq), indicaram que 30 proteínas reguladoras induzidas imediatamente depois da exposição à radiação UV, incluindo proteínas quinases desconhecidas, além de 13 RNAs não-codificantes. Os resultados ajudaram a explicar a capacidade excepcional que *D. gobiensis* tem para suportar condições ambientais extremas do Deserto de Gobi, e destacar as características metabólicas deste organismo que tem potencial biotecnológico (YUAN et al., 2012).

A partir da análise do transcriptoma da bactéria rizosférica *Azospirillum brasilense*, cultivada na ausência e na presença de ácido indol-3-acético (AIA) acrescido ao meio de cultura o estudo concluiu que o AIA é uma molécula de sinalização em *A. brasilense* (VAN PUYVELDE et al., 2011). Além disso, os autores observaram que

quando exposta ao AIA, a bactéria adapta-se à rizosfera da planta, mudando o seu arsenal de proteínas de transporte e da superfície celular. Experimento de transcriptômica da bactéria promotora de crescimento *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, em resposta aos exsudados radiculares de milho, mostraram o desencadeamento de uma gama de respostas biológicas da bactéria, com indução de genes envolvidos com vias metabólicas para a utilização de nutrientes, quimiotaxia e motilidade (FAN et al., 2012).

A fim de melhor entender as interações endofíticas e patogênicas em plantas de milho, as sequências genômicas de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 e de *H. seropedicae* SmR1 foram comparadas. Foram encontrados fatores moleculares potencialmente envolvidos nas diferenças de comportamento, tais como lipopolissacarídeos e adesinas (MONTEIRO et al., 2012). A planta de cana-de-açúcar pode atuar ativamente no estabelecimento da associação com bactérias diazotróficas endofíticas, uma vez que foram identificados genes na planta que são exclusivamente ou preferencialmente expressos na associação com cada espécie bacteriana, *G. diazotrophicus* e/ou *H. rubrisubalbicans* (NOGUEIRA et al., 2001).

A mutação é uma ferramenta importantíssima na biologia molecular e tem auxiliado bastante o melhor entendimento da interação planta bactéria. O nocaute dos genes *rfbB* e *rfbC* em *H. seropedicae* estirpe SmR1, responsáveis pela biossíntese e incorporação de ramnose a lipopolissacarídeos (LPSs), resultou na diminuição da capacidade de adesão à superfície radicular e colonização endofítica de raízes de milho (BALSANELLI et al., 2010). Outros genes, também ligados à biossíntese de LPS, foram induzidos durante a interação, como por exemplo, o gene *waaL* (Codifica para ligase O-antígeno). O silenciamento desse gene na estirpe SmR1 prejudicou significativamente a colonização, com a diminuição da adesão às raízes de milho (BALSANELLI et al., 2013). Genes envolvidos na produção de LPS (*rfbG*, *galE*, *rfbBC*, *wcaGA*) e EPS (*epsG*, *ddlB* e *ftsQAZ*) foram reprimidos quando a estirpe SmR1 foi crescida na presença da naringenina (TADRA-SFEIR et al., 2011; 2015).

Os EPS possuem uma diversidade de funções na fisiologia bacteriana, sugere-se que a principal delas seja de adesão tanto em superfícies sólidas quanto a outras células com formação de agregados. Essa característica pode ser uma vantagem contra mudanças abruptas no ambiente de crescimento e na retenção de nutrientes e íons (COSTERTON et al., 1995). Mutação do gene *wssD* em *H. rubrisubalbicans* alterou a produção de exopolissacarídeos (EPS), além de afetar a formação de biofilme e a

motilidade. A ausência de celulose influencia negativamente o processo de adesão da bactéria às raízes de milho, indicando a importância da celulose já no início da interação planta-bactéria (TULESKI, 2013). A mutação do gene *epsB* na mesma estirpe SmR1, afetou severamente a produção de EPS e a formação de biofilme, mas não apresentou alteração na colonização de plantas de milho (BALSANELLI et al., 2014). Esses genes, entre outros, estão potencialmente envolvidos na interação da bactéria *H. seropedicae* com a planta hospedeira (PEDROSA et al., 2011).

Estudos de metabolismo e controle regulatório de polihidroxibutirato (PHB) em *H. seropedicae* estirpe SmR1 mostraram que a proteína PhbF regula a expressão de genes relacionados com a produção de PHB, agindo como um repressor da transcrição (KADOWAKI et al., 2011). Os autores ainda consideram que o conhecimento do metabolismo de PHB nesta associação planta-bactéria pode contribuir para o entendimento do processo de colonização de plantas, resistência do organismo e sobrevivência na planta.

Com objetivo de melhor conhecer a interação planta-bactéria, raízes de arroz foram coletadas três dias após a inoculação com a estirpe SmR1 de *H. seropedicae*. No transcriptoma da planta (Inoculada ou não inoculada), foi observada a repressão de genes relacionados com a defesa da planta (Proteínas de resistência a doenças e enzimas envolvidas na biossíntese de flavonóides) na presença da SmR1, sugerindo que a bactéria module as respostas de defesa da hospedeira durante o processo de colonização (BRUSAMARELLO-SANTOS, 2013). Quando *H. seropedicae* SmR1 foi cultivada na presença do caldo de cana-de-açúcar (B-4362), pôde-se observar alterações no perfil proteômico, mostrando que vias metabólicas como da biossíntese de purina e de aminoácidos foram reprimidas e, segundo os autores, essas alterações foram devidas provavelmente à disponibilidade destes nutrientes no caldo de cana-de-açúcar (CORDEIRO et al., 2013).

Baseado na importância do genoma funcional para o conhecimento de interações complexas, o presente trabalho tem como objetivo estudar o perfil transcriptômico da bactéria diazotrófica endofítica *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 cultivada (*in vitro*) na presença do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar da variedade RB867515 e identificar genes envolvidos na interação endofítica.



## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta do líquido do apoplasto**

A coleta do líquido do apoplasto foi realizada seguindo a metodologia descrita por DONG et al. (1994). Foram coletados pedaços dos entrenós de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 com 12 meses de idade, cultivadas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia. Os pedaços foram desinfestados superficialmente com álcool etílico a 70% (v/v), cortados transversalmente de 5 a 10 cm com auxílio de faca esterilizada, flambados e, em seguida, acondicionados em tubos de centrífuga de fundo cônico com capacidade para 50 ml (Tipo Falcon). As porções foram pesadas, balanceadas e centrifugadas por 20 minutos a 3.000  $\times g$ , seguida pela coleta do fluído extraído. O líquido do apoplasto foi filtrado em membranas Millipore (0,22  $\mu m$ ). O líquido do apoplasto foi armazenado a  $-80^{\circ}C$  até o uso.

### **2.2. Estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans***

A estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* (= BR11504) foi obtida no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) na Embrapa Agrobiologia.

### **2.3. Curva de crescimento da estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans***

O estabelecimento da curva de crescimento da estirpe HCC103 foi essencial para o presente estudo, pois permitiu conhecer as diferentes fases do crescimento bacteriano, como a fase de crescimento exponencial, ponto de aplicação dos tratamentos do transcriptoma. Para o experimento da curva de crescimento, primeiramente a estirpe de HCC103 foi cultivada em meio sólido JNFb (pH 5,5) contendo cloreto de amônio ( $NH_4Cl$ ) como fonte de única N (DOBEREINER, 1995). Uma colônia foi transferida para frascos de vidro contendo 5 ml de meio Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986) e mantidos em agitação orbital por 18 horas. Para a inoculação, as células foram contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e do microscópio ótico. Alíquotas contendo  $10^5$  UFC. $ml^{-1}$  foram inoculados em 100 ml de meio de JNFb líquido (18,7  $mmol.l^{-1}$  de  $NH_4Cl$ ; sem indicador; pH: 5,5), foram utilizadas 4 repetições e 2 frascos controles (sem inoculação). Os frascos com 100 ml de meio JNFb inoculados foram mantidos a  $30^{\circ}C$  sob agitação de 150 rpm e, a densidade ótica foi medida em espectrofotômetro (600 nm) (Turbimetria; PORTO, 2010), sendo usada uma repetição biológica e técnica. Também foi utilizada a Técnica de Plaqueamento por Microgotas (ROMEIRO, 2007) para a contagem do número de células viáveis, com as coletas realizadas em intervalos de 3

horas. A suspensão bacteriana foi diluída de forma seriada (1:10) em solução salina [0,85% (p/v) de cloreto de sódio (NaCl), estéril e já distribuída em microtubos com capacidade para 1,5 ml]. As microgotas foram depositadas em placas de Petri contendo o meio JNFb sólido (pH 5,5) e mantidas em estufa a 30°C. Após o crescimento, as colônias das microgotas foram contadas com auxílio de binocular estereoscópica e o número final de colônias foi obtido pela média aritmética das repetições. Para a determinação da taxa de crescimento foi utilizado o pacote estatístico SigmaPlot (SIGMAPLOT, 2008).

## **2.4. Experimento do transcriptoma**

### **2.4.1. Microrganismo, preparo do inóculo, e condições de crescimento**

O pré-inóculo foi feito como citado anteriormente. Para o experimento de transcriptômica foram inoculadas  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup> em frascos de vidro (Capacidade de 250 ml) contendo 100 ml de meio JNFb líquido sem indicador e com NH<sub>4</sub>Cl como fonte de N. Os frascos foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm até a metade da fase exponencial de crescimento (D.O.<sub>600nm</sub> 1,25). Neste momento o caldo bacteriano foi dividido em partes iguais (50 ml), e nestas foram aplicados os tratamentos:

- a) MA = 50 ml caldo bacteriano mais 50 ml água destilada;
- b) MLA = 50 ml caldo bacteriano mais 50 ml de líquido do apoplasto – RB867515;
- c) MM = 50 ml caldo bacteriano mais 50 ml de meio JNFb novo.

As culturas foram novamente incubadas a 30°C e 150 rpm de agitação até a metade da fase de crescimento exponencial. As células foram coletadas 2 horas após a aplicação dos tratamentos, a partir da centrifugação de 5 ml de cultura bacteriana a 3.000 *xg* a 4°C por 10 minutos. O sedimento celular foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido e armazenado a - 80°C, para posterior extração do RNA.

### **2.4.2. Extração de RNA com Trizol**

Para a extração de RNA foram usados 1 ml de cultura bacteriana, com cerca de  $10^7$  células.ml<sup>-1</sup>, as quais foram adicionados 1 ml de TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies, Cat. No. 15596), previamente aquecido até 65°C, homogeneizado por 30 segundos e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio, agitado por 15 segundos e incubados a temperatura ambiente de 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 *xg* por 15 minutos a 4°C. Ao

sobrenadante foi adicionado 0,5 ml de álcool isopropílico, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 12.000  $xg$  por 10 minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 ml de álcool etílico a 75% (v/v) [preparado com água ultrapura previamente tratada com dietilpírocarbonato (DEPC)], com auxílio de agitador do tipo vórtex, sendo posteriormente centrifugado a 12.000  $xg$  por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o excesso de álcool etílico foi removido. O sedimento correspondente ao RNA foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos, dissolvido em água ultrapura livre de RNase (25-50  $\mu$ l) em função do tamanho do precipitado, e finalmente incubado por 10 minutos a 55-65°C.

A integridade e qualidade dos RNAs extraídos foi verificada em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão de corrida TAE 1X [40 mmol.l<sup>-1</sup> de Tris Base, 1 mol.l<sup>-1</sup> de ácido acético glacial e 50 mmol.l<sup>-1</sup> de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), em pH 8,0] e, a quantificação foi realizada por espectrofotometria no ultravioleta (260-280 nm) NanoDrop, seguida de quantificação no fluorímetro Qubit 2.0 empregando o kit Qubit<sup>®</sup> RNA Assay (Life Technologies).

### **2.4.3. Depleção do rRNA**

#### **a) Enriquecimento do mRNA por meio de remoção de rRNAs bacteriano**

O enriquecimento de mRNA das amostras de RNA total extraídas foi realizado com o kit MICROBE<sup>Express</sup><sup>™</sup> (Ambion) seguindo as instruções do fabricante. Este kit preconiza a remoção (depleção) dos RNAs ribossomais 23S e 16S, permanecendo na sua amostra somente mRNAs, rRNA 5S e pequenos RNAs. A primeira etapa para a remoção dos rRNAs envolveu a transferência de 200  $\mu$ l de tampão de ligação (*Binding Buffer*) para um tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 ml, onde foram adicionados 3  $\mu$ l de RNA total livre de DNA, correspondendo a 10  $\mu$ g. Após agitação vigorosa dos tubos para efetiva mistura do conteúdo, a eles foram adicionados 4  $\mu$ l da mistura de oligonucleotídeos de captura (*Capture Oligo Mix*), seguindo de agitação vigorosa. A mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos para desnaturar as estruturas secundárias de 16S e 23S rRNA, a fim de facilitar a máxima hibridização do rRNAs aos oligonucleotídeos de captura (*Capture Oligo Mix*). Os tubos foram incubados a 37°C por 15 minutos propiciando o anelamento dos oligonucleotídeos às sequências

homólogas presentes das moléculas do 16S e 23S rRNAs. Durante este período de 15 minutos de incubação, as esferas magnéticas acopladas a oligonucleotídeos [*Oligo Mag Beads* (OMBs)] foram reconstituídas, ou seja, uma alíquota correspondente a 50 µl de solução contendo as OMBs foram transferidas para tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 ml e colocados na estante magnética por 3 minutos para decantação. Após esse período o sobrenadante foi removido cuidadosamente por aspiração e descartado.

#### **a) Preparo dos *Oligo Mag Beads***

Aos OMBs foram adicionados 50 µl água livre de RNase para ressuspensão dos OMBs. Os tubos foram novamente colocados na estante magnética por 3 minutos, seguido de remoção e descarte do sobrenadante. Aos OMBs foram adicionados 50 µl de tampão de ligação (*Binding Buffer*) para a ressuspensão dos OMBs, colocados na estante magnética por 3 minutos, seguido de remoção e descarte do sobrenadante. E finalmente, foram adicionados 50 µl de tampão de ligação (*Binding Buffer*) às amostras, homogeneizadas e incubadas a 37°C.

#### **b) Captura do rRNA e recuperação do mRNA enriquecido**

Os 50 µl de OMBs, já reconstituídos, foram adicionados em cada amostra de RNA, homogeneizados e, incubados a 37°C por 15 minutos. Após este período as amostras foram colocadas na estante magnética por 3 minutos e, o sobrenadante contendo o mRNA enriquecido foi transferido para tubos novos e mantidos em gelo.

#### **c) Precipitação e ressuspensão do mRNA enriquecido**

Na etapa precipitação e ressuspensão do mRNA enriquecido, ao mRNA enriquecido foram adicionados 1/10 do volume de sulfato de sódio a 3 mol.l<sup>-1</sup>, 1/50 de glicogênio, 3 vezes de álcool etílico a 100% gelado. O mRNA foi incubado a -20°C por cerca de 16 horas (*Overnight*). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 10.000 *xg* e o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento foi adicionado etanol 70% gelado, homogeneizado e, seguido por centrifugação a 10.000 *xg* por 5 minutos, descartando o sobrenadante. As amostras foram centrifugadas por 5 segundos para remoção do excesso do álcool etílico e secas ao ar por 5 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 12 µl de água ultrapura livre de RNase e reidratado por 15 minutos a

temperatura ambiente. Após a ressuspensão, os tubos foram colocados na estante magnética para remover o restante de OMBs, o sobrenadante foi transferido para tubos novos. A eficiência de remoção dos rRNAs foi acompanhada por meio da quantificação em equipamento Agilent Bioanalyser empregando com o RNA Pico Chip obtendo-se assim a quantificação real do mRNA após a remoção dos rRNAs.

#### **2.4.4. Preparo de cDNA**

##### **a) Fragmentação do mRNA**

Para fragmentação do mRNA foi empregado o protocolo conforme o manual do Ion Total RNA-Seq Kit v2. A reação de PCR foi preparada incubada no gelo, aos tubos de microcentrífuga com capacidade para 0,2 ml foram adicionados 8-10 µl (rRNA total depletado 10-500 ng). Em seguida foram adicionados 1 µl de tampão de reação 10x RNase III e 1 µl de RNase III, com homogeneização por meio de cinco pipetagens. A reação foi incubada em termociclador a 37°C por 10 minutos (rRNA depletado 100-200 ng). Após a incubação, foram adicionados 20 µl de água livre de nuclease ao RNA fragmentado e, o material acondicionado em banho de gelo.

##### **b) Preparo das esferas magnéticas para a purificação do mRNA**

Para o preparo das esferas magnéticas (*Beads*), empregadas na purificação, os tubos contendo as mesmas foram agitados para a completa ressuspensão; posteriormente, uma alíquota de 5 µl dessa suspensão de esferas magnéticas foi adicionada a 90 µl de solução de ligação (*Binding Solution*), seguido de homogeneização por pipetagens. A mistura com os fragmentos de RNA (30 µl de cada reação) foi transferida para os tubos que continham as esferas magnéticas, e colocados no suporte. À mistura foi adicionado 150 µl de etanol 100%, seguido por homogeneização com pipetagem (10 vezes). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos nas estantes magnéticas, seguido pela remoção e descarte do sobrenadante. Em seguida, foram adicionados 150 µl de solução de lavagem concentrada (*Wash Solution Concentrate*) com etanol em cada amostra. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 segundos nas estantes magnéticas. O sobrenadante foi removido e descartado e as esferas magnéticas foram secas ao ar. Posteriormente, os tubos com as esferas magnéticas foram removidos das estantes, aos quais foram adicionados 12 µl de água livre de nuclease (Pré-aquecida a 37°C) e a

mistura foi homogeneizada por pipetagem (10 vezes). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto, em seguida os tubos foram colocados nas estantes magnéticas. Após a solução ficar clara (5 minutos) o sobrenadante foi coletado.

#### **c) Construção da biblioteca de cDNA**

A mistura para a hibridização foi preparada incubada no gelo. Esta 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 3 µl de solução do RNA mensageiro (mRNA) fragmentado a 5 µl da mistura. A solução foi homogeneizada gentilmente por pipetagem (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. Posteriormente, foram adicionados 10 µl de tampão de ligação 2X concentrado e 2 µl de mistura de enzima de ligação em cada amostra. A solução foi homogeneizada por pipetagem (5 vezes) e incubada no termociclador a 30°C durante 1 hora. Em seguida, a mistura para realização da transcrição reversa foi preparada em banho de gelo. À mistura, com volume de 16 µl [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], foram adicionados 20 µl da reação de ligação, seguido por homogeneização. A reação foi incubada em termociclador a 70°C por 10 minutos, e em seguida a reação foi incubada no gelo. Após foram adicionados 4 µl de 10X SuperScript® Enzyme Mix, a reação foi homogeneizada e incubada em termociclador a 42°C por 30 minutos.

#### **d) Purificação do cDNA**

A purificação do cDNA foi realizada de acordo com o protocolo SOLiD® Total RNA-Seq Kit. Esta etapa tem o objetivo de selecionar fragmentos de 100 pb ou maiores. A cada 40 µl de amostra foram adicionados 72 µl de Agencourt® AMPure® XP Reagent, seguido por homogeneização. A solução foi transferida para microplacas de 96 poços com suporte magnético e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida a placa foi colocada no suporte magnético por 2-5 minutos, com finalidade de separar as esferas magnéticas da solução. Após a deposição das microesferas, o sobrenadante foi removido e descartado. As esferas magnéticas foram lavadas com 200 µl de solução de etanol 70% (v/v), seguido pela incubação da solução à temperatura ambiente por 30 segundos. Posteriormente, o etanol foi aspirado e descartado, e a placa

foi retirada da estante quando 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, até a solução ficar clara. O sobrenadante (40 µl) foi transferido para novo poço vazio para uma segunda fase de purificação e seleção do tamanho de fragmentos de 150 pb ou mais. A placa foi então removida da estante, e a cada 40 µl de amostra foram adicionados 64 µl de Agencourt® AMPure® XP Reagent, seguido por homogeneização por pipetagem (10 vezes). A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Após, placa foi colocada na estante magnética por 2-5 minutos para separar as esferas magnéticas da solução. Quando a solução ficou clara, o sobrenadante foi aspirado e descartado. Foram adicionados 200 µl de etanol 70% (v/v) a cada amostra, seguido por incubação à temperatura ambiente por 30 segundos. Após a solução ficar clara, o sobrenadante foi aspirado e descartado. Após a retirada da placa da estante magnética, as esferas magnéticas foram secas à temperatura ambiente por 5 minutos. A cada amostra foram adicionados 40 µl de água livre de nuclease e o material foi homogeneizada para eluir o cDNA. A placa foi colocada na estante magnética por 2-5 minutos para separar as esferas magnéticas da solução. Após a ficar clara 40 µl da solução foram transferidos para tubo com capacidade de 0,2 ml.

#### **e) Amplificação do cDNA**

Para cada amostra de cDNA, foi preparada uma mistura de PCR com volume total de 44 µl [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)]. Um total de 5 µl de cada amostra de cDNA foi transferida para tubos novos de PCR. Em seguida, 44 µl da mistura de PCR foram adicionados às amostras de cDNA. Foi adicionado 1 µl de 3' PCR Primer diferente em cada amostra. As reações de PCR foram realizadas em termociclador, com as seguintes etapas: 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.

#### **f) Purificação do DNA amplificado**

Os tubos foram invertidos para homogeneização, depois foi transferido todo o produto de PCR com *Binding Buffer* para um micro kit coluna PureLink™ com tubo de coleta. Estes foram centrifugados por 1 minuto a 10.000 *xg* em temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 650 µl de tampão de lavagem (W1 – *Washing Buffer*) com etanol por amostra no micro kit Coluna Pure Link™ e centrifugados a 10.000 *xg* por 1 minuto em temperatura ambiente. O material que passou pela coluna foi descartado e a coluna foi reinserida dentro do tubo de coleta, seguido por centrifugação a 14.000 *xg* por 1 minuto (Para secagem), a membrana sílica foi removida e o buffer foi lavado com etanol. Novamente foi descartado o material que passou pela coluna e micro kit coluna PureLink™ foi reinserido dentro do tubo de eluição.

Foram adicionados 10 µl de tampão de eluição (E1 - 10 mmol.l<sup>-1</sup> de Tris-HCl, pH 8,5) no centro da coluna e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. Para a coleta do cDNA purificado, centrifugou-se a 14.000 *xg* por 1 minuto, e descartou-se a coluna. O volume eluído recuperado foi de 9-10 µl e para armazenamento a longo prazo, o cDNA purificado foi estocado a -20°C, obtido assim o cDNA purificado.

#### **g) Quantificação do cDNA**

Para a quantificação do cDNA foi realizada a qPCR de acordo com o manual KAPA Library Quantification Kits: Foram adicionados 5 mL de KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) a 1 ml de iniciadores 10X (Illumina Primer Premix 10X). Foram realizadas duas diluições da biblioteca de cDNA, 1:10 e 1:100, em solução com 10mM de Tris-HCl pH 8,0 e 0,05% de Tween 20. Para a montagem da placa de qPCR foram utilizados 12 µl de KAPA SYBR® 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 realizada com as seguintes etapas: ativação inicial a 95°C por 5 minutos; e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; e anelamento e extensão a 60°C por 45 segundos.

#### **h) PCR em emulsão do cDNA purificado**

Para a PCR em emulsão foi utilizado o Ion One Touch™ 200 Template Kit v2 DL. Para isso foi preparada uma solução contendo: 280 µl de água livre de nuclease; 500 µl de Ion One Touch™ 2X Reagent Mix; 100 µl de Ion One Touch™ Enzyme Mix e 20 µl da biblioteca de DNA. Nesta solução foram adicionados 100 µl de Ion OneTouch™ 200 Ion Sphere™ Particles (ISPs) com volume total de 1.000 µl. Esse



volume foi inserido na entrada de amostra do Ion OneTouch™ Plus Reaction Filter Assembly e, posteriormente, foram adicionados 1.500 µl de Ion OneTouch™ Reaction Oil no mesmo local, dando início a PCR em emulsão no equipamento. Posterior a corrida os tubos de recuperação foram removidos do aparelho, o sobrenadante foi removido e o sedimento contendo os ISPs foi ressuspensionado com a solução restante do tubo. Os ISPs ressuspensionados foram centrifugados a 15.500 xg por 2,5 minutos. O sobrenadante foi removido.

#### **i) Sequenciamento**

O sequenciamento foi realizado de acordo com protocolo Ion PITM Sequencing 200 Kit v2. Primeiramente, 5 µl de Ion PITM Control Ion Sphere foram adicionados aos ISPs previamente transferidos para tubos de PCR (Capacidade de 0,2 ml), seguido por homogeneização. A mistura foi centrifugada a 15.500 xg por 5 minutos, e após o sobrenadante foi removido. Foram adicionados 15 µl de Ion PITM Annealing Buffer, 20 µl de Ion PITM Sequencing Primer. O material foi homogeneizado e colocado em termociclador a 95°C por 2 minutos seguido de 37°C por 2 minutos. Foram adicionados 10 µl de tampão de corrida (Ion PITM Loading Buffer) e após o conteúdo foi homogeneizado. A amostra foi inserida CHIP e o mesmo foi por 10 minutos. Em seguida, o CHIP foi colocado no Ion Proton Semiconductor Sequence (Life).

#### **2.4.5. Análises de bioinformática do transcriptoma**

As 9 bibliotecas foram construídas a partir de 3 réplicas biológicas de cada um dos três tratamentos. As bibliotecas sequenciadas foram analisadas através do programa de bioinformática CLC *Genomics Workbench*, com remoção de sequências de baixa qualidade ( $\leq 10$  pb), remoção de adaptadores e dos ribossomais (16S, 23S e 5S), quantificação do total de *contigs* e do total de *contigs* únicos mapeados no genoma da estirpe HCC103. Os valores de expressão RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) foram calculados. A expressão diferencial dos genes foi determinada a partir da combinação de tratamentos comparando a abundância de transcritos entre os pares de tratamentos. A partir dos valores de expressão normalizados foram selecionados os genes com *fold change* maior que 2 (Induzidos) e menor que -2 (Reprimidos) nas três comparações (Cultura crescida + Água destilada vs. Cultura crescida + Líquido do apoplasto (Sigla: MA vs. MLA); Cultura crescida + Água vs. Cultura crescida + Meio JNFb novo (Sigla: MA vs. MM); e Cultura crescida + Meio

JNFb novo vs. Cultura crescida + Líquido do apoplasto (Sigla: MM vs. MLA)) e valor  $p$  ( $p$  value) menor que 0,05 no teste Baggerley no CLC Workbench. O gráfico Volcano Plot também foi construído no programa CLC.

A fim de conhecer as proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos utilizou-se a ferramenta de bioinformática Blast2GO (<https://www.blast2go.com/>) (CONESA et al., 2005), esta faz a identificação e classificação por similaridade com banco de dados. Esse banco é construído a partir da comparação de sequências de proteínas de genomas completos, e através dele é possível identificar similaridade e diferenças entre espécies, além de identificar famílias de proteínas e predição de novas proteínas (TATUSOV et al., 2000); no entanto, foi utilizado para apresentação dos dados a classificação das categorias funcionais (COG) realizada pelo servidor *on-line* WebMGA (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/metagenomic-analysis/server/cog/>). Para a anotação manual dos genes diferencialmente expressos da estirpe HCC103, depositada no banco de dados da Embrapa Agrobiologia, foi utilizado o programa Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>) (RUTHERFORD et al., 2000).

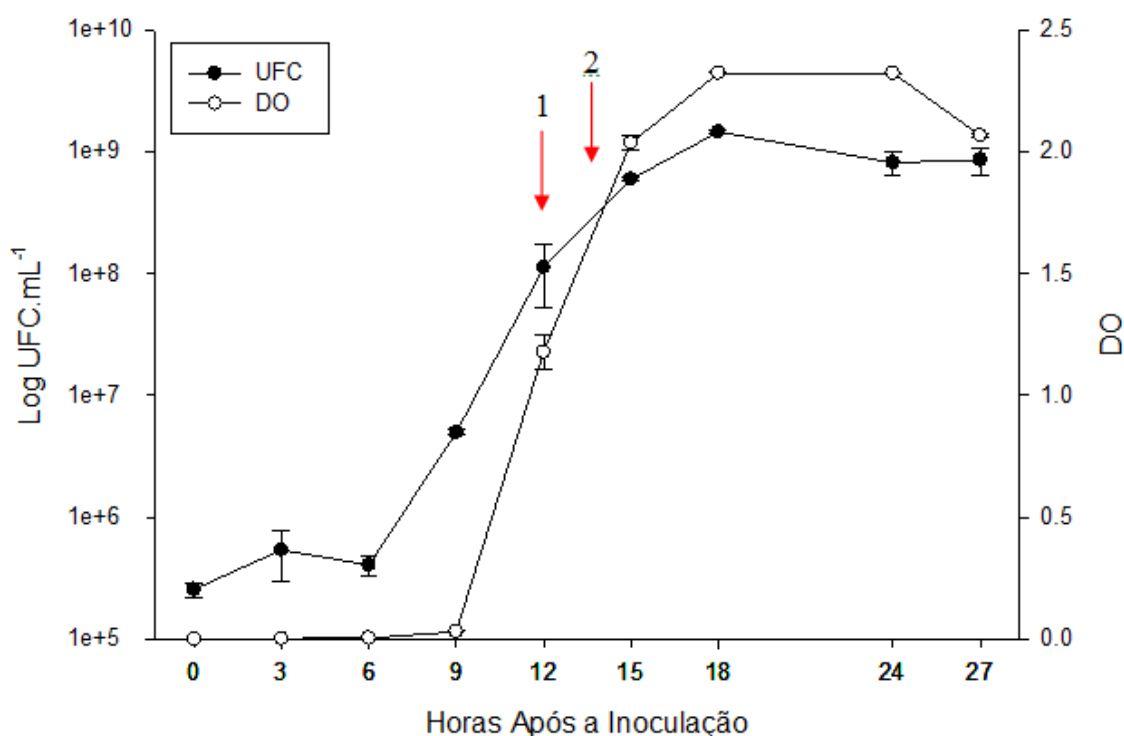
#### **2.4.6. Confirmação dos dados dos transcriptoma por RT-qPCR**

Para a validação de genes de expressão diferencial identificados no transcriptoma foi empregada a RT-qPCR, foi utilizado o mesmo RNA do experimento do transcriptoma. Os iniciadores para RT-qPCR foram desenhados com os programas Oligo (RYCHLIK, 2007) e Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007) e as sequências foram confeccionadas pela *Integrated DNA Technologies*. Os genes *rpoA* e *dnaG* foram utilizados como normalizadores internos selecionados no Capítulo 1 e a expressão gênica relativa foi determinada usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2008). Para a validação foram selecionados quatro genes diferencialmente expressos no estudo de RNA-Seq: *trpS*, *trpE*, ORF\_0004.0014 e, ORF\_0084.0016.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Curva de crescimento da estirpe bacteriana *H. rubrisubalbicans* HCC103

A partir da curva de crescimento bacteriano da estirpe HCC103 foi possível identificar a fase de crescimento exponencial (Figura 9). Na metade desta fase (12 horas após a inoculação) foi realizada a aplicação dos diferentes tratamentos e, 2 horas após foram coletadas para extração de RNA.



**Figura 9.** Curva de crescimento de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, estirpe HCC103 em meio JNFb suplementada com 18,7 mmol.l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl e agitação 150 rpm e a 30°C. Seta 1 – aplicação dos tratamentos 12 horas após a inoculação. Seta 2 – coleta do RNA. D.O. - densidade ótica.

#### 3.2. Análises de bioinformática do transcriptoma

##### 3.2.1. Sequenciamento

Para identificar os genes envolvidos na interação endofítica entre a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* e cana-de-açúcar, realizou-se uma análise de

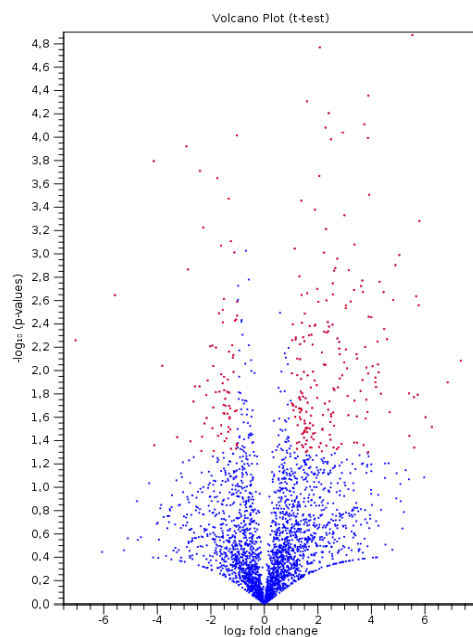
transcriptoma comparativa entre a estirpe HCC103 cultivada na presença ou ausência de líquido do apoplasto da variedade RB857515 de cana-de-açúcar.

O genoma da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* foi utilizado como referência, devido à proximidade filogenética entre as duas espécies e ao fato do genoma já ter sido publicado, proporcionando assim uma maior confiabilidade nas análises. Foram removidas as sequências de baixa qualidade, os adaptadores e os RNAs ribossômicos (5S, 16S e 23S rRNA de *H. seropedicae* SmR1). A tabela 4 apresenta a quantidade total de leituras e a quantidade de leituras únicas mapeadas no genoma da bactéria. Pode-se observar que as leituras únicas variaram de 8,2% a 14,13%, havendo diferenças entre os tratamentos.

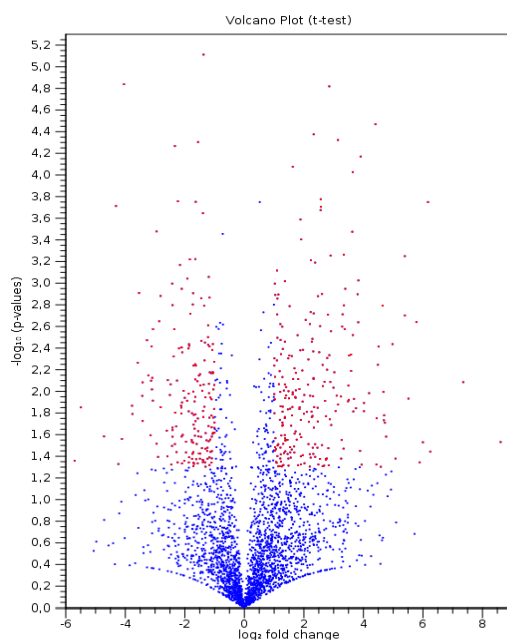
**Tabela 4.** Mapeamento do transcriptoma da estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* por meio do programa CLC.

Amostra	Número de leituras	Número de leituras após remoção dos rRNAs	Número de leituras mapeadas unicamente no genoma de HCC103	Total de leituras mapeadas unicamente em cada tratamento
MA_1	8.090.512,0	1.486.885,0	1.305.885,0	4.945.186,0
MA_2	7.922.263,0	2.020.887,0	1.765.044,0	
MA_3	7.319.520,0	2.054.654,0	1.874.257,0	
MM_1	8.165.795,0	1.899.074,0	1.715.951,0	4.489.265,0
MM_2	5.178.278,0	1.005.100,0	908.176,0	
MM_3	8.230.928,0	2.031.789,0	1.865.138,0	
MLA_1	6.036.052,0	866.584,0	767.645,0	4.202.921,0
MLA_2	5.228.375,0	1.091.789,0	991.757,0	
MLA_3	15.856.262,0	2.845.464,0	2.443.519,0	

Os gráficos do tipo Volcano Plot, apresentados nas figuras 10 e 11 mostram a distribuição dos genes, onde os pontos vermelhos representam os genes diferencialmente expressos, em que os genes reprimidos apresentam  $p\text{-value} < 0,05$  e  $Fold\ change < -2$ , e os induzidos apresentam  $p\text{-value} < 0,05$  e  $Fold\ change > 2$ . É possível observar que a quantidade de genes reprimidos (99 genes) quando a estirpe HCC103 foi cultivada na presença do líquido do apoplasto em relação ao Meio+Água foi inferior à metade da quantidade de genes induzidos (227 genes). Em contraste, a quantidade de genes reprimidos (211 genes) e induzidos (257 genes) não foi tão diferente na comparação de MLA vs. MM.



**Figura 10.** Gráfico do tipo Volcano Plot construído com os dados do transcriptoma da estirpe HCC103 cultivada em meio JNFb + 50% de líquido do apoplasto comparado ao meio JNFb diluído com 50% de água destilada. Os pontos vermelhos indicam os genes reprimidos ( $p$ -value <0,05;  $Fold\ change < -2$ ) e induzidos ( $p$ -value <0,05;  $Fold\ change > 2$ ).



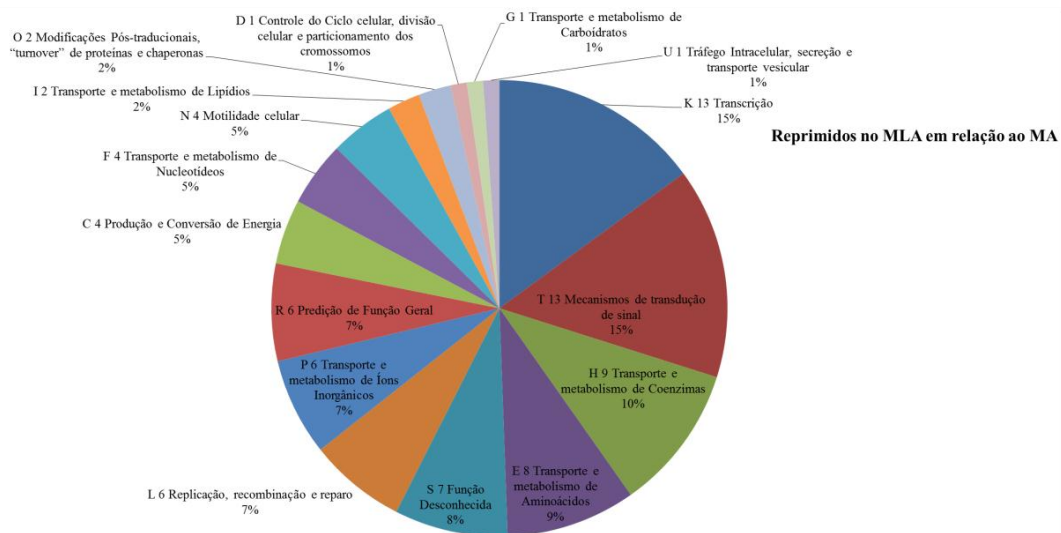
**Figura 11.** Gráfico do tipo Volcano Plot construído com os dados do transcriptoma da estirpe HCC103 cultivada em meio JNFb + 50% de Líquido do apoplasto em comparação com o meio JNFb completo. Os pontos vermelhos indicam os genes reprimidos ( $p$ -value <0,05  $Fold\ change < -2$ ) e induzidos ( $p$ -value <0,05  $Fold\ change > 2$ ).

A análise das sequências gênicas realizadas no Banco de dados do NCBI mostrou que, na maioria das vezes, havia uma maior similaridade e identidade com a estirpe SmR1, cujo genoma tem todas as características importantes para uma boa caracterização de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 (Tamanho da sequência, os códons de iniciação e de parada para procariotos, as funções e produto a sequência possui).

### **3.2.2. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos da estirpe HCC103 cultivada na presença do líquido do apoplasto**

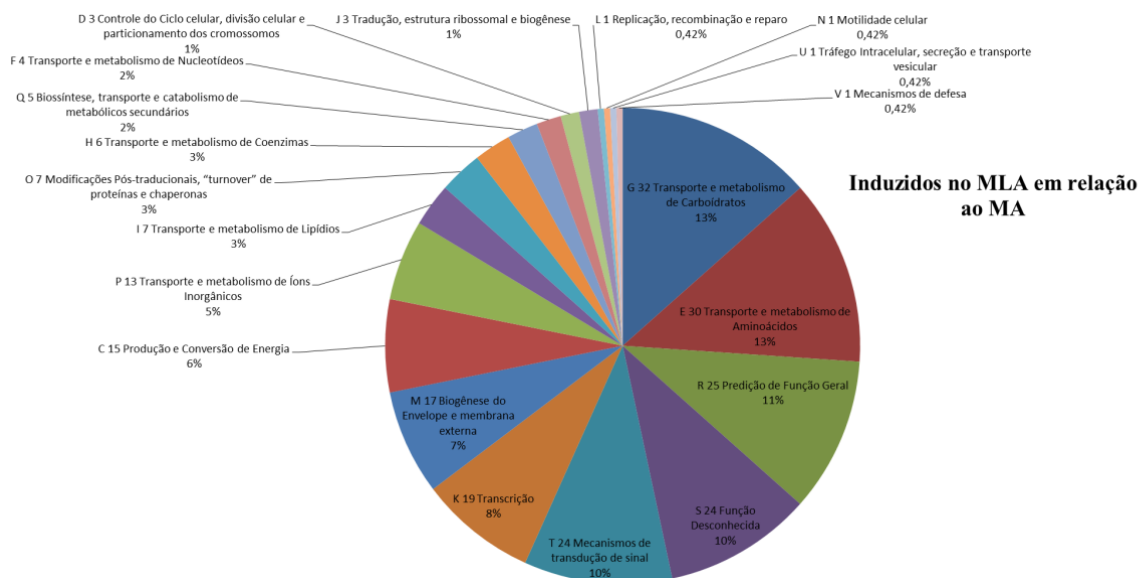
A anotação funcional das sequências através do programa de anotação funcional Blast2GO e classificação dos produtos gênicos em categorias funcionais através do servidor *on line* WebMGA (Busca no COG) são demonstradas nas figuras 12, 13, 14 e 15.

A distribuição em categorias funcionais dos produtos dos genes reprimidos no MLA em comparação ao MA é apresentada na figura 12. Foi identificado um total de 99 genes reprimidos, porém não foi possível identificar produtos (Proteínas) para 11 desses genes. As categorias que tiveram maior número de genes representantes foram: Tradução, estrutura ribossomal e biogênese (15%); Transcrição (15%); Mecanismos de transdução de sinal (10%). Em contraste, as categorias que apresentaram menos genes nessa comparação foram: Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular (1%), Transporte e metabolismo de carboidrato (1%) e Controle do ciclo celular, divisão celular e particionamento cromossômico (1%).



**Figura 12.** Classificação funcional dos genes reprimidos da estirpe HCC103 cultivada no meio JNFb na presença de 50% de líquido do apoplasto (MLA) em relação ao cultivo em meio JNFb diluído com 50% de água destilada (MA). A legenda refere-se respectivamente a classe, ao número de genes, à descrição da classe, e ao percentual de genes diferencialmente expressos.

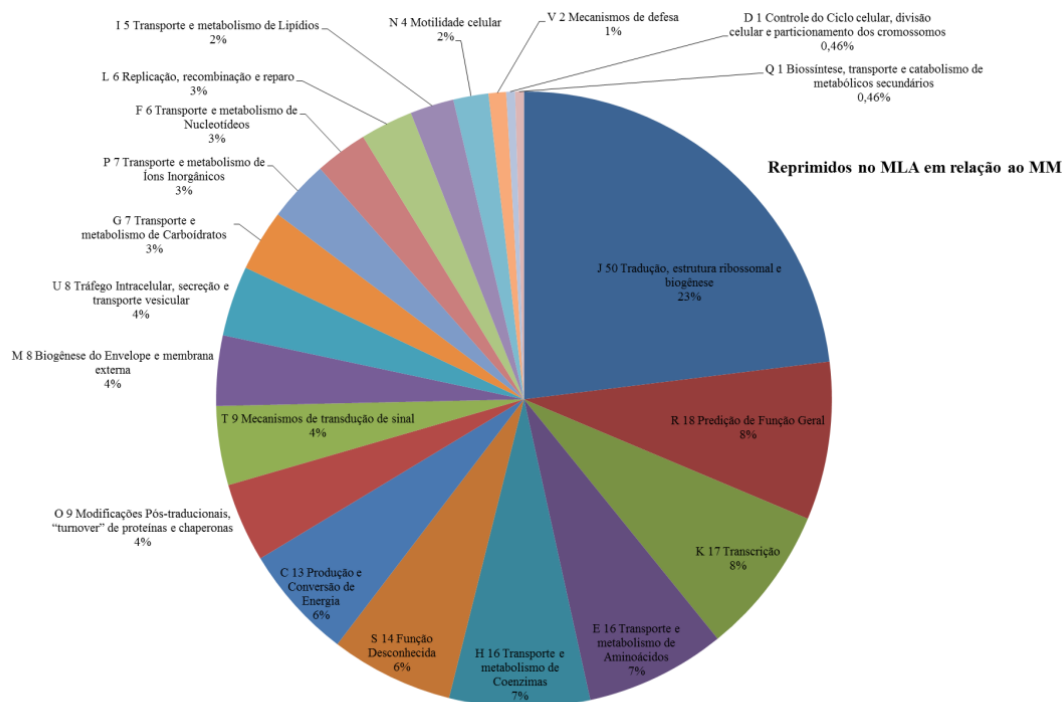
Na figura 13 pode-se observar a distribuição em categorias funcionais, dos produtos dos genes induzidos no MLA em comparação ao MA. As categorias que apresentaram maior número de genes foram: Metabolismo e transporte de carboidratos (13%); de Aminoácidos (13%); Função geral (11%); enquanto que as categorias Mecanismos de defesa (0,42%); Motilidade celular (0,42%); Trafego intracelular, secreção e transporte vesicular (0,42%) apresentaram menos genes na análise comparativa entre os tratamentos MLA vs. MA.



**Figura 13.** Classificação funcional dos genes induzidos da estirpe HCC103 cultivada no meio JNFb na presença de 50% de líquido do apoplasto (MLA) em relação ao cultivo em meio JNFb diluído com 50% de água destilada (MA). A legenda refere-se respectivamente a classe, e ao percentual de genes diferencialmente expressos.

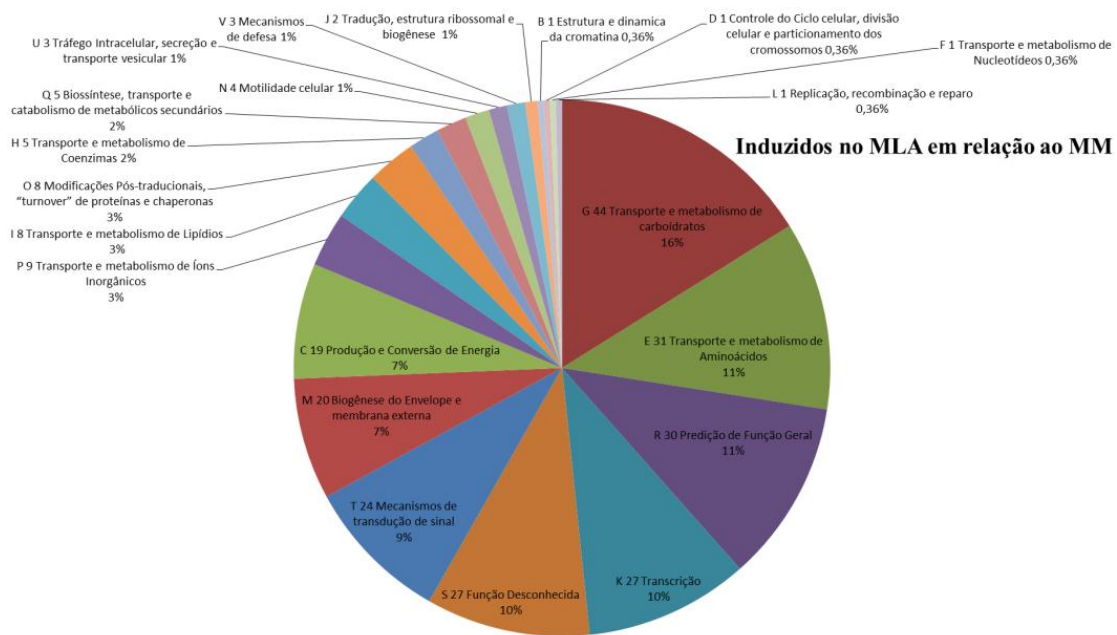
A distribuição em categorias funcionais dos produtos dos genes reprimidos no líquido do apoplasto em relação ao Meio+Meio está apresentada na figura 14. As categorias que apresentaram maior número de genes foram: Tradução, estrutura ribossomal, biogênese (23%); Transcrição (8%); Função geral (8%). Em contraste, as categorias que tiveram menos genes foram: Mecanismos de defesa (1%); Controle do ciclo celular, divisão celular e particionamento cromossômico (0,46%); Biossíntese metabolismo e transporte de metabólitos secundários (0,46%).





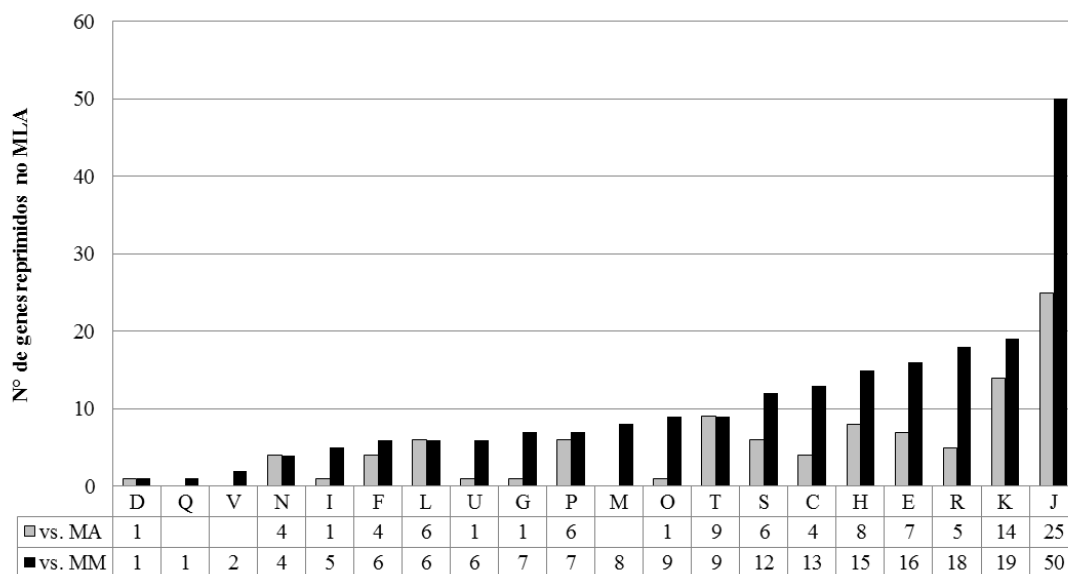
**Figura 14.** Classificação funcional dos genes reprimidos na estirpe HCC103 cultivada no meio JNFb na presença de 50% de líquido do apoplasto (MLA) em relação ao cultivo em meio JNFb diluído a 50% com meio fresco (MM). A legenda refere-se respectivamente a classe, ao número de genes, à descrição da classe, e ao percentual de genes diferencialmente expressos.

As categorias funcionais (Figura 15) que apresentaram maior número de genes induzidos na comparação entre os tratamentos MLA vs. MM foram: Transporte e metabolismo de carboidrato (16%); Transporte e metabolismo de aminoácidos (11%); Função geral (11%). Por outro lado, as categorias que tiveram menos genes reprimidos foram: Metabolismo e transporte de nucleotídeo (0,4%); Controle do ciclo celular, divisão celular e particionamento cromossômico (0,4%); Replicação, recombinação e reparo (0,4%).



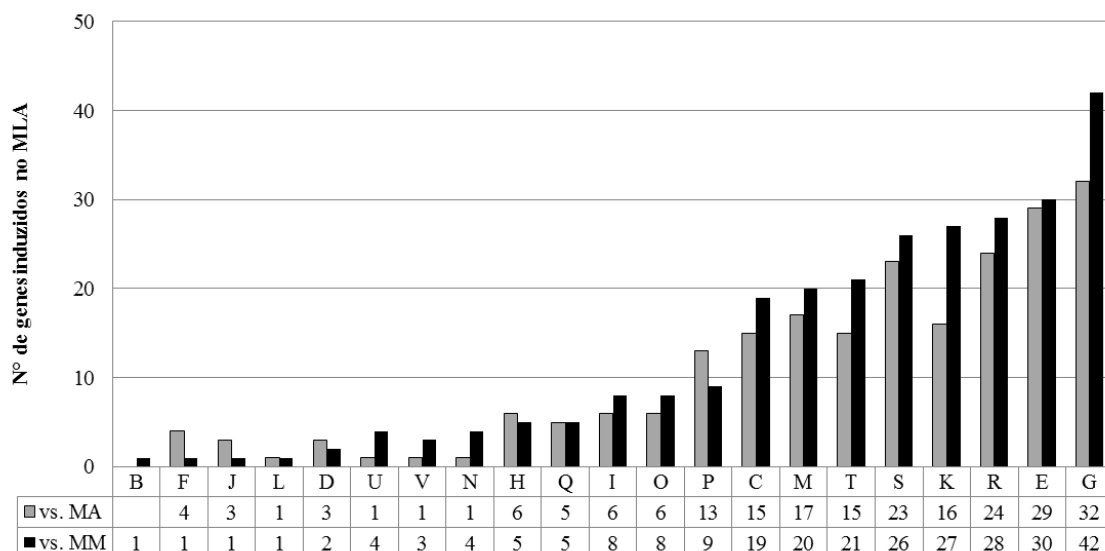
**Figura 15.** Classificação funcional dos genes induzidos estirpe HCC103 cultivada no meio JNFb na presença de 50% de líquido do apoplasto (MLA) em relação ao cultivo em meio JNFb diluído a 50% meio fresco (MM). A legenda refere-se respectivamente a classe, ao número de genes, à descrição da classe e ao percentual de genes diferencialmente expressos.

A distribuição dos genes diferencialmente expressos no transcriptoma da estirpe HCC103 cultivada na presença do líquido do apoplasto nas diferentes classes do COG está apresentada nas figuras 16 e 17. Independente das comparações MLA vs. MA ou MLA vs. MM, a maior quantidade de genes reprimidos esta presente na classe funcional de Tradução, estrutura ribossomal e biogênese (J) (Figura 16). Já entre as classes como menor número de genes representantes induzidos estão: D - Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo; V - Mecanismos de defesa; I - Metabolismo e transporte de lipídeos; N - Motilidade celular, que podem ser muito importantes para a interação planta-bactéria.



**Figura 16.** Distribuição dos genes diferencialmente regulados de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 pelo líquido do apoplasto de acordo com a categorização do COG. Barras em cor cinza indicam os genes diferencialmente expressos na presença do líquido do apoplasto (MLA) quando em relação ao Meio+Água (MA); Barras em cor preta indicam os genes diferencialmente expressos na presença do fluido do apoplasto (MLA) quando comparado ao Meio+Meio (MM). Categorias: D - Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo, Q - Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, V - Mecanismos de defesa, I - Metabolismo e transporte de lipídeos, N - Motilidade celular, F - Transporte e metabolismo de nucleotídeos, L - Replicação, recombinação e reparo, T - Mecanismos de transdução de sinais, U - Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular, G - Metabolismo e transporte de carboidratos, P - Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, M - Parede celular, membrana e biogênese do envelope, O - Modificação pós-transducional, recuperação de proteínas e chaperonas, C - Produção e conversão de energia, S - Função desconhecida, H - Metabolismo e transporte de coenzimas, E - Metabolismo e transporte de aminoácidos, K - Transcrição, R - Funções gerais, J - Tradução, estrutura ribossomal e biogênese.

Já em relação à quantidade de genes induzidos na presença do líquido do apoplasto, as comparações MLA vs. MA e MLA vs. MM foram mais homogêneas em quantidade de genes (Figura 17). Mesmo assim, algumas classes se destacaram tais como: G - Metabolismo e transporte de carboidratos, E - Metabolismo e transporte de aminoácidos, R - Funções gerais e K - Transcrição. Classes que tiveram poucos genes representantes diferencialmente expressos, porém muito importantes na interação planta-bactéria foram: U - Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular; V - Mecanismos de defesa; N - Motilidade celular, entre outras.



**Figura 17.** Distribuição dos genes diferencialmente regulados de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 pelo líquido do apoplasto de acordo com a categorização do COG. Barras em cor cinza indicam os genes diferencialmente expressos na presença do líquido do apoplasto (MLA) quando em relação ao Meio+Água (MA); Barras em cor preta indicam os genes diferencialmente expressos na presença do líquido do apoplasto (MLA) quando comparado ao Meio+Meio (MM). Categorias: B - Dinâmica e estrutura da cromatina, D - Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo, F - Transporte e metabolismo de nucleotídeos, L - Replicação, recombinação e reparo, J - Tradução, estrutura ribossomal e biogênese, U - Transporte intracelular, secreção e transporte vesicular, V - Mecanismos de defesa, N - Motilidade celular, H - Metabolismo e transporte de coenzimas, Q - Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, I - Metabolismo e transporte de lipídeos, O - Modificação pós-transducional, recuperação de proteínas e chaperonas, P - Metabolismo e transporte de íons inorgânicos, C - Produção e conversão de energia, M - Parede celular, membrana e biogênese do envelope, T - Mecanismos de transdução de sinais, S - Função desconhecida, K - Transcrição, R - Funções gerais, E - Metabolismo e transporte de aminoácidos, G - Metabolismo e transporte de carboidratos.

### 3.3. Confirmação dos dados do transcriptoma por RT-qPCR

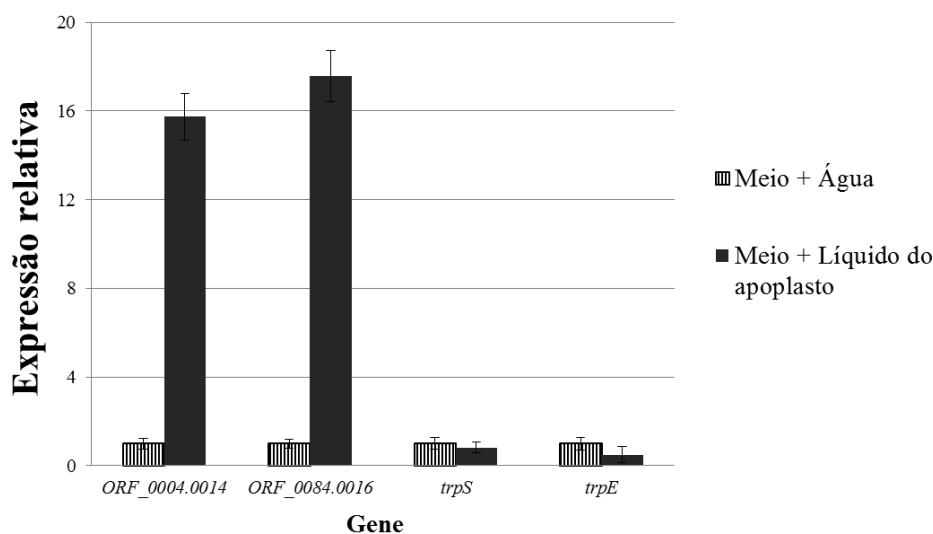
Análises de RT-qPCR foram realizadas com quatro genes identificados como diferencialmente expressos pelo RNA-Seq de modo a confirmar o padrão de expressão obtido previamente (Tabela 5 e Figura 18). Dos quatro genes selecionados, as ORFs *\_0004.0014* e *\_0084.0016*, que codificam, respectivamente, para transportador ABC de aminoácidos e proteína do sistema de secreção do tipo VI, foram induzidas na estirpe HCC103 no tratamento MLA em comparação ao MA. Os genes *trpS* e *trpE*, que codificam respectivamente, para componente Triptofanil tRNA sintetase, component i da Antranilato sintase, foram reprimidos nessa mesma comparação. Os genes *dnaG* e

*rpoA* (Capítulo 1) foram utilizados como referência para normalização dos dados nas análises de RT-qPCR e o Meio+Água (MA) foi utilizado como tratamento calibrador (Controle).

**Tabela 5.** Valores da expressão gênica no RNA-Seq (*Fold change*) e na RT-qPCR (Método comparativo *threshold* ( $\Delta\Delta CT$ )).

Gene	Descrição	Comparação	Expressão	
			RNA-Seq ( <i>Fold change</i> )	RT-qPCR (Expressão relativa)
ORF_0004.0014	Transportador ABC de aminoácido	Induzidos no MLA em relação ao MA	32,88	15,74
ORF_0084.0016	Proteína do sistema de secreção tipo VI	Induzidos no MLA em relação ao MA	8,53	17,57
<i>trpS</i>	<i>trpS</i> triptofânil-trna sintetase	Reprimidos no MLA em relação ao MA	-4,45	-1,21
<i>trpE</i>	Componente i da antranilato sintase	Reprimidos no MLA em relação ao MA	-3,20	-2,01

Os genes *dnaG* e *rpoA* foram utilizados como normalizadores internos da RT-qPCR.



**Figura 18.** Níveis de expressão de quatro genes identificados em HCC103 como diferencialmente expressos pelo RNA-Seq validados por RT-qPCR. A expressão gênica empregou o método comparativo *threshold* ( $\Delta\Delta CT$ ) através do programa qBase v1.3.5. Os genes *dnaG* e *rpoA* foram utilizados como referência para normalização dos dados e o tratamento Meio+Água (MA) foi utilizado como tratamento calibrador (Controle). As barras indicam o erro padrão. As ORFs estão descritas na tabela 5.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Classes funcionais

Noventa e nove genes foram reprimidos e 227 genes induzidos na presença do líquido do apoplasto (Meio+Líquido do Apoplasto - MLA) quando comparado ao Meio+Água (MA). Por outro lado, 211 e 257 genes foram, respectivamente, reprimidos e induzidos na presença do líquido do apoplasto quando comparado ao MM (Meio+Meio). Os produtos dos genes diferencialmente expressos estão distribuídos nas diferentes classes funcionais conforme estabelecido no banco *Clusters of Orthologous Groups* (COG) (Quadro 1). Os genes que não tiverem proteínas identificadas no banco de dados COG, foram descritos a partir do Blast2GO. Nesse estudo foi dado enfoque principalmente para as classes que possivelmente estejam relacionadas à interação bactéria-planta, que são: Tráfego Intracelular, secreção e transporte vesicular; Motilidade Celular; Biogênese do Envelope/Parede celular e membrana; Mecanismos de Defesa; Transdução de sinais; Transporte entre outros.

**Quadro 1.** Classes funcionais do COG (*Clusters of Orthologous Groups*).

Categoria Funcional	Código	Função
Armazenamento de Informação e de Processamento	J	Tradução, estrutura e biogênese dos ribossomos
	K	Transcrição
	L	Replicação, recombinação e reparo
Processos celulares e sinalização	D	Controle do Ciclo celular, divisão celular e particionamento dos cromossomos
	V	Mecanismos de Defesa
	T	Mecanismo de tradução de Sinais
	M	Biogênese do Envelope e membrana externa
	N	Mobilidade Celular e secreção
	U	Tráfego Intracelular, secreção e transporte vesicular
	O	Modificações Pós-traducionais, “turnover” de proteínas e chaperonas
	C	Produção e Conversão de Energia
Metabolismo	G	Transporte e metabolismo de Carboidratos
	E	Transporte e metabolismo de Aminoácidos
	F	Transporte e metabolismo de Nucleotídeos
	H	Transporte e metabolismo de Coenzimas
	I	Transporte e metabolismo de Lipídios
	P	Transporte e metabolismo de Íons Inorgânicos
	Q	Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários
	R	Predição de Função Geral
Pobremente caracterizadas	S	Função Desconhecida

#### 4.1.1. Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular (U)

A análise dos resultados mostrou que somente o gene *fimV* foi reprimido na presença do líquido do apoplasto em relação ao MA, enquanto que, outros 7 genes (*pilN*, *secY*, *secE*, *tatB*, *tatC*, *fhaC*, e *ORF\_0105.001*) foram reprimidos quando comparado com MM. Por outro lado, 2 genes (*pilA* e *ORF\_0064.0031*) foram induzidos

no líquido do apoplasto em relação ao MA e 4 genes (ORFs\_0105.0046, \_0147.0001, \_0166.0006, \_0064.0031) foram induzidos em relação ao tratamento MM. Alguns dos genes, classificados pelo COG como classe de Função desconhecida, foram identificados no Blast2GO como sistema de secreção tipo VI, que estão intimamente ligados à interação planta bactéria. O sistema de secreção do tipo VI (SST6) apresentou 10 genes induzidos na presença do líquido do apoplasto em relação ao MA (ORFs\_0065.0006, \_0084.0007, \_0084.0008, \_0084.0012, \_0084.0015, \_0084.0016, \_0084.0019, \_0084.0020, \_0084.0021, \_0181.0001), e 11 genes induzidos em relação ao MM (ORFs\_0065.0006, \_0084.0007, \_0084.0010, \_0084.0014, \_0084.0015, \_0084.0016, \_0084.0017, \_0084.0019, \_0084.0020, \_0084.0021, \_0181.0001).

Entre os genes reprimidos na presença do líquido do apoplasto (*vs.* MM) encontram-se os genes *secE* e *secY*, que codificam, respectivamente, para a pré-proteína translocase subunidade *SecE* e pré-proteína translocase subunidade *secY*; *tatB* e *tatC*, que são componentes da proteína do sistema de secreção Sec-independente. A literatura relata a presença de seis tipos de sistemas de secreção em bactérias Gram-negativas, I ao VI. Os sistemas de transporte podem ser classificados como Sec-dependente (Tipos II e V), Sec-independente (Tipos I e III), ou ainda conter vias Sec-dependente ou independente (Tipo IV) (TSENG et al., 2009). Os sistemas Sec-independente transportam proteínas através das duas membranas em uma única etapa. Alguns sistemas possuem aparatos para injetar proteínas bacterianas diretamente na célula eucariótica (TSENG et al., 2009). Nos sistemas Sec-dependente, um complexo de proteínas Sec- catalisa a translocação de proteínas através da membrana interna para o espaço periplasmático através de um peptídeo de sinalização localizado na porção N-terminal. Esse sistema é diferente do sistema Sec-independente, em que os componentes do próprio complexo de secreção encaminham as proteínas para o meio externo (REMAUT e WAKSMAN, 2004). Em *E. coli*, as proteínas *SecE* e *SecY*, juntamente com *SecD* e *SecF*, são proteínas de membrana que compõe esse sistema. Além dessas, participam uma ATPase citoplasmática (*SecA*), uma chaperona (*SecB*) e uma peptidase de sequência sinal periplasmática (HUECK, 1998). Em *E. coli* a exportação de proteínas é dependente das duas proteínas de membrana *SecY* e *SecE* (MURPHY et al., 1994). Na bactéria *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* foram encontrados homólogos para os genes *SecA*, *SecB*, *SecD*, *SecE*, *SecF*, *SecG* e *SecY* (KREHENBRINK e DOWNIE, 2008). Estudos de transcriptômica na estirpe SmR1 cultivada na presença de naringenina mostraram a indução dos genes *secE* e *secY* (TADRA-SFEIR, 2011). Em

outra bactéria diazotrófica, *Paraburkholderia tropica* Ppe8, ocorreu a indução dos genes que codificam para a pré-proteína translocase, quando a bactéria foi crescida na presença do líquido do apoplasto em comparação ao meio JMV diluído (SILVA, 2016). Outro importante sistema é o Tat (do inglês *Twin-arginine Translocator*), que se localiza na membrana interna e é constituído por 3 tipos de proteínas de membrana: TatA, TatB e TatC. Proteínas transportadas por este sistema possuem um motivo de argininas geminadas no peptídeo sinal (CLINE et al., 2007). Estudo com a bactéria *E. coli* identificou dois complexos, um formado pela proteína TatA, chamado de módulo transportador, e o outro complexo, formado pelas proteínas TatB e TatC, conhecido como módulo de reconhecimento de sinal (BUCK et al., 2008). As bactérias promotoras de crescimento vegetal do gênero *Methylobacterium* ajudam a diminuir o ataque de fitopatógenos à hospedeira. A fim de investigar essa interação com as plantas (Citros e Milho), Salguero Londono (2015) identificou os exsudados vegetais (Açúcares, ácidos orgânicos, etc) e estudou a expressão gênica de um grupo de genes de sistema de transporte. O autor notou que genes do sistema Sec- foram induzidos durante a interação, enquanto os genes Tat-dependente foram reprimidos, sugerindo que os exsudados regulam diferencialmente a expressão do grupo de genes de transporte de moléculas (Salguero Londono, 2015). Estudos com a bactéria *Streptomyces scabies*, causadora da sarna da batata, sugerem que o sistema Tat seja essencial no processo de patogenicidade. A inativação da via Tat resultou no crescimento mais lento dessa bactéria e maior permeabilidade do envelope celular. O mutante DtatC foi completamente avirulento em mudas de *Arabidopsis*, indicando que o sistema Tat secreta proteínas fundamentais para a virulência (JOSHI et al., 2010). A repressão dos genes *tat-* e genes *sec-*, quando HCC103 cresceu na presença do líquido do apoplasto (vs. MM), indica a inibição desses dois sistemas de translocação de proteínas, sugerindo desta forma que as proteínas secretadas podem ser importantes nos estágios iniciais da interação, como na infecção dos tecidos vegetais, com função de degradação da parede celular vegetal. Os sistemas de secreção estão frequentemente relacionados com esse papel, como citado para *R. leguminosarum* bv. *viciae* (KREHENBRINK e DOWNIE, 2008).

O gene *fhaC* e ORF\_0105.0018, que codificam para proteína de ativação/secreção de hemolisina, foram reprimidas no líquido do apoplasto (vs. MM). Acredita-se que os produtos desses genes sejam necessários para a adesão e formação do biofilme durante a colonização dos tecidos vegetais (GOTTIG et al., 2009). Vinte



genes relacionados à Hemaglutinina/Hemolisina estão presentes no genoma da estirpe SmR1, além de nove genes que codificam para proteínas acessórias (Ativadoras ou transportadoras) (PEDROSA et al., 2011). No transcriptoma da SmR1 cultivada na presença de nitrato (*vs.* amônio) esses genes foram reprimidos (BONATO, 2013). A repressão desses genes quando a estirpe HCC103 foi cultivada na presença do líquido do apoplasto (*vs.* MM) sugere efeitos negativos na formação do biofilme e no processo de adesão. Além desses, o gene *pilN* (*Pilus* tipo IVb) foi reprimido enquanto que dois genes que codificam para flagelo (*flgL* e ORF\_0127.0199) foram induzidos (MLA *vs.* MM), o que fortalece essa hipótese. Será abordado adiante o papel do pili tipo IV que está relacionado com importantes processos da interação planta bactéria tais como a motilidade e formação de biofilme.

Entre os genes induzidos na presença do líquido do apoplasto em ambas às comparações (*vs.* MA e *vs.* MM), está o SST6, que é um dos mais recentemente conhecidos sistemas de secreção, presente em muitos patógenos humanos (PUKATZKI et al., 2006; 2009). Pesquisas tem mostrado que o SST6 está frequentemente envolvido com as interações da célula procarionte com seus hospedeiros eucariontes, seja ela patogênica ou simbiótica (FILLOUX et al., 2008; JANI e COTTER, 2010). Diferentemente dos outros sistemas, o SST6 é capaz de transportar proteínas de uma bactéria para outra por meio do contato entre elas. Existe a hipótese de que o SST6 tenha surgido de caudas de fago invertido, por compartilharem da homologia estrutural, com função de excretar proteínas da célula bacteriana, ao invés injetar como fazem os fagos (RUSSELL et al., 2014). Os genes do SST6 normalmente codificam de 12 a 25 proteínas, das quais apenas duas existem em outros sistemas de secreção (DotU e IcmF) (FILLOUX et al., 2008). Sabe-se que a proteína Hcp (Proteína hemolisina-corregulada) é secretada por todas as bactérias que contêm este sistema, o que se tornou um indício sobre função do SST6 (MOUGOUS, 2006; FILLOUX et al., 2009). Ela é requerida para a montagem do aparato de secreção, e interage com proteínas da família Vgr (Do inglês: *valine-glycine repeat*), também exportadas pelo SST6. Em *Pseudomonas aeruginosa* o SST6 foi considerado participante da formação de biofilme (HOOD et al., 2010). Os autores ainda sugeriram que esse sistema produz uma toxina que ajuda na relacionada evolutivamente e estruturalmente ao bacteriófago (HOOD et al., 2010). Além das interações com a célula hospedeira, existem relatos desse sistema sobre a competição com bactérias concorrentes e a interação com o ambiente, através do mecanismo de “Disparo” realizado pela ação das caudas contráteis (CIANFANELLI et al., 2016),

mostrando então a relevância desse sistema de secreção em relações intraespecíficas e interespecíficas. Genes do SST6 foram induzidos quando a estirpe *H. seropedicae* SmR1 foi cultivada em meio mínimo, porém foram reprimidos na rizosfera de plantas de milho, sugerindo que o SST6 não seja essencial no início da colonização do hospedeiro (BALSANELLI et al., 2016). No presente transcriptoma, a indução desses genes pode estar relacionada com a rica fonte de nutrientes, com açúcares e ácidos orgânicos disponíveis no líquido do apoplasto, podendo o SST6 ter papel nas etapas posteriores da colonização. Entretanto, muito pouco se pode afirmar sobre o SST6, por ainda ser brevemente conhecido.

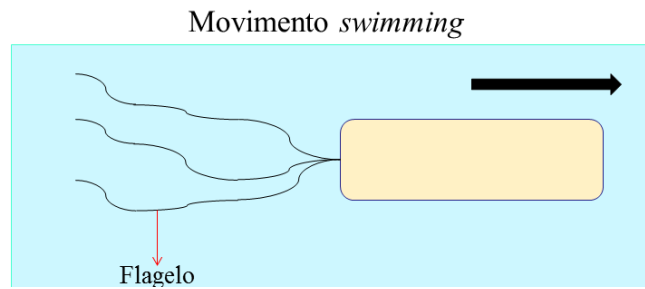
A ORF\_0064.0031, que codifica para Ferritina, foi induzida na presença do apoplasto com o *fold change* de 50,9 e 13,9 em relação aos tratamentos MA e MM, respectivamente. Existem diferentes tipos de ferritinas já relatados em bactérias: ferritina bacteriana, bacterioferritina e ferritina dodecamérica (SMITH et al., 2004). Suas funções nas bactérias não são totalmente elucidadas e cada bactéria pode ter um ou mais tipos e funções variadas (SMITH et al., 2004). A célula pode se proteger contra metais tóxicos translocando-os através da membrana e/ou os armazenando em proteínas como as ferritinas (JOHNSON et al., 2005). As ferritinas possuem a capacidade de secretar ferro para fora da célula, liberando-o de forma controlada, evitando assim a toxicidade pelo excesso do metal (ANDEWS et al., 2010). Estudos mostraram que as sequências dos genes que codificam para ferritina nas bactérias *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* e *E. coli* são bastante semelhantes (WAI et al., 1996). O nocaute do gene que codifica para ferritina na bactéria *C. jejuni* (Gram-negativa; Patogênica em humanos) resultou na inibição do crescimento sob limitação de ferro, sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, indicando a contribuição desse gene para a estocagem do ferro e a proteção contra o estresse oxidativo (WAI et al., 1996). Para *C. jejuni* e *E. coli* a ferritina serve como fonte de ferro (SMITH et al., 2004). Existem outros sideróforos liberados por bactérias na ausência de ferro, como as serobactinas (Conjunto de sideróforos lipopetídicos) pela espécie *H. seropedicae* Z76 (ROSCONI et al., 2013). Estas parecem não ser necessárias para a sobrevivência da bactéria no solo ou para a colonização da planta de arroz e os autores sugeriram que a bactéria pode ter usado o estoque de bacterioferritinas nos estágios iniciais (ROSCONI et al., 2016). A indução desse gene no MLA sugere a disponibilidade de ferro nessa condição e seu acúmulo na forma de ferritina, principalmente na comparação MLA vs. MA (*fold change* 50,9), em que a cultura crescida foi diluída com 50% de água destilada. Já na comparação MLA

vs. MM (*fold change* 13,9) houve uma reposição de nutrientes (50% de meio JNFb), por isso uma menor diferença de expressão.

#### 4.1.2. Motilidade celular (N)

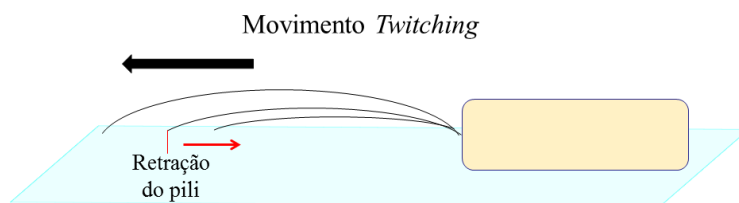
Os resultados mostram que os genes *flgE*, *aer* e ORF\_0068.0109 foram reprimidos na presença do líquido do apoplasto em relação ao MA, enquanto que os genes *trs*, *cheZ*, *pilN*, ORF\_0037.0192 foram reprimidos na comparação MLA vs. MM. Apenas o gene *pilA* foi induzido no tratamento MLA em relação ao MA, enquanto que 4 genes foram induzidos em comparação ao tratamento MM (*flgL*, e ORFs\_0127.0199, \_0164.0020, \_0058.0022). Vale ressaltar que alguns desses genes estão inclusos em outras classes funcionais, principalmente na transdução de sinal, indicando uma estreita relação entre essas classes.

Os genes que codificam para a formação do flagelo, *flgL* (Proteína de junção gancho-filamento flagelar) e a ORF\_0127.0199 (Proteína do gancho flagelar) estão no grupo de genes induzidos no líquido do apoplasto em relação ao MM. Os flagelos são as principais estruturas responsáveis pelo movimento bacteriano, dando motilidade celular em resposta aos diversos estímulos ambientais. Um grupo desses genes, que inclui o *flgL* e *flgE*, foi reprimido quando a *H. seropedicae* estirpe SmR1 foi cultivada na presença do flavonoide naringenina, considerado um estimulante ambiental (TADRASFEIR et al., 2015). De forma similar, ocorreu a repressão de genes que codificam para flagelo no transcriptoma da estirpe SmR1 durante a colonização de plântulas de milho (vs. a forma planctônica/sozinhas). Os autores consideraram que esse resultado esteja relacionado à mudança do estilo de vida no momento que a bactéria adere-se à raiz, saindo do estilo *free-swimming* para ao sésil, com indução do gene *pilT*, que codifica para o pili tipo IV relacionado com a motilidade *twitching* (PANKIEVICZ et al., 2016). Talvez a indução desses dois genes (*flgL* e ORF\_0127.0199) no líquido do apoplasto (vs. MM) esteja relacionada com a manutenção do estilo *free-swimming* (Figura 19) da bactéria nesse ambiente, adicionado à repressão do gene *pilN* e da ORF\_0084.0039 (*Fold change*: -52,06) que são pili tipo IV e que estão relacionados, por exemplo, com a formação do biofilme.



**Figura 19.** *Swimming*: Movimento individual da bactéria em meio líquido, também realizado por um flagelo rotativo. Adaptado de Kearns. (2010).

Em relação à comparação dos tratamentos MLA vs. MA, os genes *flgE*, *FimV*, ORF\_0049.0162 foram reprimidos, enquanto que o gene *pilA* (Pili tipo IV) foi induzido. Os pili são apêndices de superfície não flagelar, importantes na interação, envolvidos na adesão a outras bactérias, células hospedeiras ou superfícies ambientais (FRONZES et al., 2008). Diversos autores relatam a importância do pili tipo IV nas interações fitopatogênicas ou benéficas, sua ausência reduz a motilidade, a formação de biofilme e a virulência ao hospedeiro de planta (ROMANTSCHUK et al., 1986; ROINE et al., 1998; TAGUCHI et al., 2011). Em *P. aeruginosa* o pili tipo IV ajudou na formação do biofilme (VAN SCHAIK et al., 2005). O nocaute de genes de vias de secreção, envolvidos com a biogênese de flagelo, genes envolvidos na síntese EPS, função do pili tipo IV em *V. cholerae*, prejudicou a formação de biofilme (WATNICK e KOLTER, 1999). A motilidade é muito importante para o processo de colonização bacteriana de *A. brasilense* (CROES et al., 1993). O Pili do tipo IV está relacionado à motilidade independente de flagelo (Movimento *twitching* – Figura 20) e este possui dois subtipos: o tipo IVa, que em *P. aeruginosa* é composto principalmente pelo pili *pilA* e por pili menores (*FimU*, *PilV*, *PilW*, *PilX* e *PilE*), todos processados por *pilD*, esse tipo está mais relacionado à motilidade *twitching* (JOHNSON et al., 2011), e o tipo IVb está mais associado com a fixação/adesão, já relatado em *V. cholerae* (BERNE et al., 2015). O nocaute do gene *pilA* na bactéria *Burkholderia pseudomallei* resultou na diminuição da adesão da bactéria às células epiteliais humanas e menor virulência (ESSEX-LOPRESTI et al., 2005).



**Figura 20.** *Twitching*: movimento de superfície da bactéria através da extensão do Pili, que aderido à superfície, posteriormente é retraído puxando a célula, fazendo com que a mesma fique próxima do local de fixação. Adaptado de Kearns (2010).

Na bactéria *Ralstonia solanacearum* estudos tem mostrado que o gene *pilA* está relacionado com a motilidade *twitching*, e a mutação desse gene resultou em redução da virulência e redução da formação de biofilme pela bactéria (KANG et al., 2002). Na bactéria diazotrófica *Azoarcus* sp. BH72, o gene *pilA* parece depender da densidade populacional para a sua indução, onde o aumento de seu nível de expressão ocorreu com o aumento da população quando houve deficiência de carbono (HAUBERG-LOTTE et al., 2012). Genes que codificam para quimiotaxia e para flagelo (*flgF*, *flgB*, *flgC*, *flgG*, *flgE*, *flgL*) foram reprimidos quando *Sinorhizobium meliloti* 1021 foi crescida em pH ácido (5,75) (HELLWEG et al., 2009). A indução do gene *pilA* (Motilidade *twitching*), somada à repressão dos genes que codificam para flagelo (*flgE* e ORF\_0049.0162) quando a HCC103 foi cultivada no líquido do apoplasto (vs. MA), indica uma forte mudança na condição de crescimento com a adição do líquido do apoplasto, sugerindo com que a bactéria diminua a locomoção ou não precise se locomover. No transcriptoma de *Paraburkholderia tropica* Ppe8, SILVA (2016) observou resultados semelhantes, onde muitos genes que codificam para flagelo (Ex. *flgF*, *flgE*, *flgL*) foram reprimidos na presença do líquido do apoplasto, tanto na comparação com o meio completo (JMV+JMV) quanto no meio diluído (JMV+Água), sugerindo que a bactéria não precise se locomover em direção à diferença de gradiente (SILVA, 2016).

#### 4.1.3. Mecanismos de transdução de sinal (T)

O crescimento da estirpe HCC103 na presença do líquido do apoplasto promoveu a indução de 15 genes em relação ao MA (*prpR*, *rseA*, *uspA*, *dctD1*, *ntrC*, *ygiX*, *vsrD* ORFs\_0004.0014, \_0026.0039, \_0095.0007, \_0049.0040, \_0054.0039, \_0093.0059, \_0093.0062, e \_0105.0035) e de 21 genes em relação ao tratamento MM (*prpR*, *sixA*, *phoH*, *fnr*, *ntrX*, *dctD1*, *ygiX*, ORF\_0004.0014, \_0095.0007, \_0058.0065,

\_0058.0022, \_0164.0020, \_0037.0111, \_0049.0184, \_0054.0039, \_0064.0030, \_0093.0062, \_0105.0035, \_0118.0175, \_0203.0024, \_0118.0168). Por outro lado, 9 genes foram reprimidos na presença do MLA em relação ao MA (*cheY*, ORFs\_0030.0116, \_0068.0109, \_0002.0018, \_0030.0116, \_0049.0487, \_0079.0117, \_0002.0019, \_0084.0039) e 9 genes reprimidos em relação ao MM (*trs*, *phoH*, *cheZ*, ORFs\_0037.0192, \_0002.0018, \_0002.0025, \_0002.0166, \_0105.0015, \_0058.0010).

Entre os genes reprimidos no MLA (vs. MA) foram encontrados muitos representantes que codificam para proteínas com domínio GGDEF, EAL; histidina quinases (ORF\_0084.0039 - *Fold change*: -133,05) e quimiotaxia (*cheY* e ORF\_0068.0109, *aer*) e *fimV* (Proteína fimbrial). GGDEF e EAL são domínios conservados, responsáveis pela síntese ou degradação do di-GMP-cíclico, um importante mensageiro secundário em bactérias. Essa molécula está envolvida na produção de celulose, além de estar envolvida em processos como a formação de biofilme, motilidade, virulência (SIMM et al., 2004). O domínio GGDEF está presente em Gram-negativas como, por exemplo, na bactéria patogênica *P. aeruginosa* PAO1, que possui 33 desses domínios (GALPERIN et al., 2005). AUGIMERI et al. (2015) revisaram a importância da produção de celulose tanto para relações benéficas quanto patogênicas, principalmente nos processos de fixação, adesão e colonização. A regulação da biossíntese da celulose, entre outras moléculas importantes na interação, é feita principalmente através da diguanilato cíclico (c-di-GMP) (AUGIMERI et al., 2015). A repressão desses genes de HCC103 na presença do líquido do apoplasto (vs. MA) sugere a inibição de sinalizadores para produção de compostos, como a celulose, o biofilme, que são importantes tanto em interações benéficas quanto patogênicas. No caso da estirpe HCC103, maiores investigações sobre sua interação com a planta hospedeira são necessárias, pelo fato de dessa estirpe e outras da mesma espécie (M1, IBSBF175 e M4) causarem a doença da estria mosqueada na variedade suscetível de cana de açúcar B-4362 (OLIVARES et al., 1997) e estria vermelha (Estirpes M1 e M4) em plantas de sorgo (PIMENTEL et al., 1991).

Um grupo de genes que codifica para a quimiotaxia, processo importantíssimo na interação planta-bactéria, está entre os genes diferencialmente expressos (Reprimido ou induzido) da estirpe HCC103 em ambas as comparações. A quimiotaxia é a locomoção de microrganismos quando são submetidos às mudanças químicas no seu habitat. Na bactéria, a quimiotaxia refere-se principalmente por seus receptores, que identificam as mudanças químicas, e pelos flagelos que executam o movimento

(MANSON, 1998). Os exsudados vegetais fazem com que ocorra a fosforilação com consequente transdução de sinais aos receptores flagelares (CELANI e VERGASSOLA, 2010).

**Quadro 2.** Tipos de movimentos bacterianos observados no transcriptoma de HCC103 e os respectivos gêneros que já foram relatados.

Tipo de motilidade	Organelas	Características	Função	Gênero (Exemplos)
Enxame - <i>Swarming</i>	Flagelo	Movimento de um grupo de bactérias	Superfície de colonização	<i>Azospirillum</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodospirillum</i> .
Natação - <i>Swimming</i>	Flagelo	Movimento individual da bactéria de forma aleatória (sentido horário) ou reta (Sentido anti-horário)	Superfície de colonização	<i>E. coli</i>
Extensão e retração - <i>Twisting</i>	Pili Tipo IV	As células se movem predominantemente isoladas, embora possa ocorrer agregados móveis. O movimento aparece como intermitente e espasmódico e não acompanha regularmente o eixo ao longo da célula	Adesão, superfície de colonização, formação de biofilme.	<i>Azoarcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Vibrio</i> .

O complexo é formado por cerca de sete receptores, duas ou quatro moléculas de CheW e um dímero de CheA (Histidina quinase) (LIU et al., 1997). Percebido o sinal, CheA torna-se autofosforilada, podendo autofosforilar CheY, que determinará qual o sentido da rotação do flagelo (Horário ou anti-horário). Uma metiltransferase CheR e uma metilesterase CheB modulam a sinalização, a proteína 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 e ARMITAGE, 2004). Em *E. coli* alguns estímulos quimiotáticos se ligam diretamente nos receptores específicos, chamados de MCP's (Proteína de quimiotaxia metil-receptora). A genômica comparativa da bactéria *Pseudomonas syringae* pathovar *tomate* (Pto), fitopatogênica foliar, indicou genes para a quimiotaxia (*che1* e *che2*). Mutantes com disrupção de *cheA2*, não tiveram motilidade superficial e *swimming* a 21°C (CLAKE et al., 2016). O gene *cheY* foi induzido quando *H. seropedicae* estirpe SmR1 foi crescida na presença da naringenina, enquanto *cheZ* foi reprimido (TADRA-SFEIR, 2011). De forma semelhante ao presente transcriptoma, um grupo de genes da categoria motilidade celular (*cheA*, *cheB*, *cheC*, *cheD*, *cheW*, *cheZ* e *cheR*) foi reprimido quando a

diazotrófica *P. tropica* Ppe8 foi cultivada na presença do líquido do apoplasto, sugerindo a redução da motilidade (SILVA, 2016). A inibição de *cheY* de HCC103 no MLA vs. MA sugere a repressão do movimento bacteriano com a adição do líquido do apoplasto.

#### 4.1.4. Biogênese de parede celular / membrana / envelope (M)

Oito genes (*mreD*, *metB*, *kdsB*, e ORFs\_0002.0173, \_0037.0041, \_0127.0151, \_0163.0028, \_0049.0215) foram reprimidos no tratamento MLA em relação MM; enquanto não houveram genes reprimidos no MLA vs. MA. A maioria dos genes pertencentes a essa classe foi induzida no MLA, sendo 17 e 20 genes, respectivamente em comparação ao MA e MM. Entre os genes induzidos durante o crescimento da estirpe HCC1103 no líquido do apoplasto (vs. MM), estão os genes *wcaG* (Epimerase nucleosídeo-difosfato-açúcar) e *wcaA* (Glicosiltransferase). Esses dois genes, e outros envolvidos na biossíntese de LPS (*rfbG*, *galeE*, *rfbBC*), foram reprimidos quando a *H. seropedicae* SmR1 cresceu na presença de naringenina, sugerindo alterações na superfície celular quando a bactéria interage diretamente com as plantas ou com a presença de compostos vegetais (TADRA-SFEIR et al., 2015). O gene *lpxC*, pertencente ao grupo de genes responsáveis pela biossíntese de LPS, também foi induzido na presença do líquido do apoplasto (vs. MA). A indução desses genes sugere que a biossíntese de LPS ocorreu como forma de adaptação ao ambiente de crescimento modificado pela adição do líquido do apoplasto, e o incremento de açúcares.

#### 4.1.5. Mecanismos de defesa (V)

Poucos genes dessa classe estiveram entre os diferencialmente expressos da estirpe HCC103. Apenas a ORF\_0037.0087 (Bomba de efluxo de cátions/multidrogas) foi induzida na presença do líquido do apoplasto em relação ao MA. A mesma também foi induzida no MLA vs. MM, juntamente com o gene *yhhJ* e a ORF\_0210.0002 (Componente permease do sistema de transporte tipo ABC de multidrogas). Em contraste, apenas os genes *emrA* e *hlyD* foram reprimidos na presença do líquido do apoplasto (vs. MM), estes codificam para bomba de efluxo de resistência a multidrogas. Genes envolvidos com o transporte de multidrogas foram induzidos (Ex. *ompC* e *Hsero\_1358*) quando a estirpe SmR1 cresceu na presença de naringenina, (TADRA-SFEIR et al., 2015). Alguns sistemas de efluxo de multidrogas excluem de forma



seletiva, enquanto outros, como os sistemas de efluxo de resistência multidrogas, caracterizam-se por expulsar drogas de estrutura química distinta (LEE et al., 2000). Essa característica é favorável a sobrevivência da bactéria em condições hostis, como por exemplo, na presença de compostos antimicrobianos (POOLE, 2005). As bombas de efluxo de resistência a multidrogas podem diminuir a suscetibilidade a antibióticos pelas bactérias, sendo também importantes na patogenicidade do microrganismo durante o processo de colonização do hospedeiro (PIDDOCK, 2006). No presente estudo, a repressão dos genes *emrA* e *hlyD* (Bomba de efluxo de resistência a multidrogas) na presença do líquido do apoplasto (vs. MM), sugere que a ativação desse sistema não foi necessária, dando indícios da colonização favorável nos espaços intercelulares. Talvez esse sistema seja mais importante nas etapas iniciais da colonização, fases que ocorre a liberação de compostos vegetais através das raízes. Balsanelli et al. (2016) observaram a indução do gene *hlyD* (Fold change: 20) em *H. seropedicae* SmR1 aos três dias após a inoculação em plantas milho (vs. forma planctônica), juntamente com *Hsero\_0317* (Domínio esterase parcial). Na bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, o gene BjG30, que codifica para bomba de efluxo de drogas, foi induzido na presença de genisteína, que é indutor dos genes para a nodulação oriundo da soja (TAKESHIMA et al., 2013). Os autores consideraram que essa indução pode desempenhar um importante papel no estágio inicial da simbiose, equilibrando a dupla função da genisteína como indutor de genes *nod* e componente tóxico. O nocaute do gene afetou negativamente a nodulação e a capacidade de fixar nitrogênio (TAKESHIMA et al., 2013).

#### **4.1.6. Tradução, estrutura ribossomal e biogênese (J)**

Foram observados 25 e 50 genes reprimidos quando a estirpe HCC103 foi cultivada na presença do líquido do apoplasto em comparação ao MA e ao MM, respectivamente. Em contraste, somente 3 genes foram induzidos no líquido do apoplasto em comparação ao MA (*gatA*, *hemK*, *\_0127.0009*) e 2 genes em comparação ao MM (*yhbH* e *miaA*). Entre os genes reprimidos no MLA vs. MA, muitos codificam para a proteína 30S e para a subunidade 50S. De forma semelhante, entre os reprimidos no MLA vs. MM, 13 genes que codificam para a proteína 30S (Ex. *rpsA*, *rpsB*, *rpsD*) e 16 para proteína 50S (Ex. *rplR*, *rplE*, *rpmA*). A análise transcriptômica de *P. aeruginosa* exposta ao peróxido de hidrogênio mostrou a repressão de 41 genes que codificam para 30S e 50S (PALMA et al., 2004). A resposta de *P. aeruginosa*, estirpes M18 e PAO1, a temperaturas relacionadas ao seu habitat na rizosfera (28°C) e em humanos (37°C),

respectivamente mostrou a indução de muitos genes que codificam para as proteínas 30S e 50S na estirpe M18 quando crescida a 37°C, que não é a temperatura de seu nicho natural (WU et al., 2012). Quando a bactéria *Rhizobium tropici* CIAT 899 cresceu sob estresse salino houve a indução dos genes que codificam para proteínas 30S e 50S (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2016). Nossos resultados sugerem a repressão da atividade metabólica da estirpe HCC103 na presença do líquido do apoplasto em ambas as comparações. O que também significa que esses muitos genes foram induzidos no MM (50 genes) e no MA (25 genes) e importantes nessas condições.

Na análise transcriptômica da estirpe HCC103, o gene *trpS* (Triptofanil-tRNA sintetase) foi reprimido na presença do líquido do apoplasto (vs. MA). Também foram reprimidos nessa comparação os genes *trpG* e *trpE*, que codificam respectivamente, para os componente i e ii da enzima antranilato sintetase. O gene *trpE* também foi reprimido na presença do líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MM. Diferentes vias de biossíntese de AIA em plantas e em bactérias já foram caracterizadas, entretanto muitos genes, enzimas, e intermediários ainda devem ser elucidados. O triptofano é o precursor mais conhecido, e somente uma via de síntese de AIA independe deste aminoácido (ZAKHAROVA, et al., 1999; KUSS et al., 2007). O gênero *Azospirillum* é um exemplo de bactérias diazotróficas que podem produzir AIA de forma dependente e independente do triptofano (FERREIRA, 2011). O triptofano é produzido a partir do corismato, numa reação codificada pelos genes *trp* (SPAEPEN, 2011), como observado na figura 21.



**Figura 21.** Biossíntese de triptofano: a partir do corismato as enzimas TrpE e TrpG sintetizam o antranilato, que é convertido a triptofano pela enzima TrpS.

A biossíntese de triptofano na bactéria *Azospirillum brasilense* já é conhecida e inicia-se pela conversão de corismato a antranilato pela ação da antranilato sintetase, que é formada por dois componentes i e ii (TrpG e TrpE) (AGUILAR-PIEDRAS et al., 2008). A triptofano sintetase é requerida no final do processo que catalisa duas reações, a primeira faz a quebra da molécula Indol-3-glicerol-fosfato em duas, indol e

gliceraldeído-3-fosfato, a partir da molécula indol que se condensa com uma serina e então forma-se o triptofano (HUANG et al., 2001; RABONI et al., 2009). A repressão desse grupo de genes que codificam para enzima do triptofano no tratamento MLA em relação ao MA, sugere a produção do precursor da biossíntese de AIA (Triptofano), porém mais informações são necessárias, uma vez que as bactérias podem conter mais de uma via de biossíntese de AIA. A síntese de auxina, *in vitro*, já foi observada no gênero *Herbaspirillum* (PEDRINHO et al., 2010), especificamente em *Herbaspirillum seropedicae* (BASTIÁN et al., 1998) e em *H. rubrisubalbicans* (RADWAN et al., 2002). No genoma de *H. seropedicae* SmR1 há quatro possíveis vias de biossíntese de AIA, a via mais provável é a Indol-3-Piruvato (IPA). Genes que codificam para outras vias também estão presentes no genoma, como a via Indol-3- Acetamida (IAM), Via Triptamina, Via indol-3-acetonitrila (IAN) (PEDROSA et al., 2011).

#### 4.1.7. Transporte

Entre os genes induzidos, estão, por exemplo, aqueles que codificam para transportadores do tipo ABC de: bacteriocina (ORF\_0210.0002), aminoácidos (ORFs\_0004.0013, \_0004.0014, *livK*), íons (*afuA*), transportador ABC C4-dicarboxilato (*dctA*, *dctM*, *dctQ*, *dctP*, ORF\_0110.0011), de açúcar (ORFs\_0053.0017, \_0110.0052, \_0127.0101, \_0127.0123), nitrato (*tauA*, *tauB*), e ribose (ORF\_0127.0086). Entre os genes reprimidos, pode-se citar genes que codificam para transportadores de metais (\_0127.0147, *ssuB*), nitrato/sulfonato/bicarbonato (*ssuC*) e transportadores de açúcar (*ugpA*, *suhB*, \_0037.0077, \_0054.0009, \_0110.0026).

Os transportadores tipo ABC (Proteína de ligação-ATP) estão entre os mais importantes transportadores na célula bacteriana. Eles acoplam a energia da hidrólise do ATP à translocação de uma variedade de substâncias para dentro ou para fora da célula (ANNILO et al., 2006), como íons, açúcares, aminoácidos, vitaminas, lipídios, antibióticos, drogas, oligossacarídeos, oligopeptídeos e proteínas (BIEMANS-OLDEHINKEL et al., 2006). Esses transportadores também atuam no efluxo de substâncias em bactérias, incluindo os componentes superficiais celulares (polissacarídeos capsulares e lipopolissacarídeos), proteínas relacionadas à patogenicidade bacteriana, antibióticos peptídeos, drogas e sideróforos (DAVIDSON, 2004; BIEMANS-OLDEHINKEL et al., 2006). Na bactéria *Liberibacter asiaticus*, da família dos rizóbios, o sistema de transporte ABC desempenha um importante papel na

sua fitopatogenicidade, através da troca de compostos químicos com a planta hospedeira. Foram identificados 14 sistemas de transporte do tipo ABC, com capacidade para importar aminoácidos, fosfatos, e cofatores de enzimas e dessa forma mantendo a composição da membrana externa e secretando os fatores de virulência (LI et al., 2012). No genoma da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* foram encontrados vários sistemas de transporte ABC como o de açúcar (PEP/PTS) e de nitrato (nasFED) (PEDROSA et al., 2011). A presença de transportadores, como os de açúcares, propiciam o crescimento bacteriano em diferentes fontes de monossacarídeos, logo podem favorecer a adaptação do microrganismo a diferentes ambientes. A análise do transcriptoma de *H. seropedicae* estirpe SmR1 mostrou 10 genes de transporte ABC induzidos e 19 reprimidos durante a colonização da bactéria na raiz da planta de trigo (vs. Planctônica). Esses genes estão relacionados ao transporte de diferentes compostos como açúcares, íons e fármacos, entre outros. Entre os genes induzidos está um transportador responsável pelo efluxo de compostos antimicrobianos (PANKIEVICZ et al., 2016), sugerindo ser uma forma de adaptação durante o processo de colonização. Quando a estirpe SmR1 foi crescida na presença de naringenina muitos genes que codificam para transportadores do tipo ABC foram reprimidos (29 genes), e apenas 6 foram induzidos, entre estes últimos estão os de transporte de fosfato, sulfato e alcanosulfatos (TADRA-SFEIR et al., 2015). A seguir serão abordados os diferentes tipos de transportadores.

#### **a) Transporte e metabolismo de Íons Inorgânicos (P)**

Foram encontrados 6 genes reprimidos na presença do líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA (*modAI*, *cirA*, *fju*, *fhuA*, ORFs\_0093.0054, e \_0105.0012) e 7 genes reprimidos em relação ao MM (*emrE*, *ssuB*, *ssuC*, \_0002.0002, \_0105.0012, \_0118.0037, \_0127.0147); enquanto que 13 genes foram induzidos na presença do líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA (*copZ*, *afuA*, *amtH*, *tauA*, *tauB*, *tauC*, *ygjT*, ORF\_0002.0127, \_0002.0128, \_0099.0020, \_0110.0093, \_0131.0067) e 9 genes foram induzidos em comparação ao MM (*cysI*, *copZ*, *afuA*, *tauA*, *tauC*, *ygjT*, ORFs\_0002.0036, \_0002.0128, \_0099.0020).

Os genes envolvidos no transporte do sideróforo do tipo catecolato estiveram entre os diferencialmente expressos. Em condições de deficiência de ferro, o principal mecanismo empregado pelas bactérias, com objetivo de aumentar a disponibilidade de ferro no interior da célula, é a produção e secreção de uma diversidade de compostos

com elevada afinidade pelo íon  $\text{Fe}^{3+}$ , conhecidos como sideróforos (NEILANDS, 1981). No transcriptoma de *Rhizobium etli* CFN42, o gene *afuB1* (Permease do transportador de ferro) foi induzido nas células presentes no biofilme (*vs.* planctónica) após a coleta às 72 h, provavelmente indicando a limitação de ferro no biofilme (REYES-PÉREZ et al., 2016). Sideróforos liberados por *Pseudomonas fluorescens*, como pseudobactina e pioverdina, têm aumentado o crescimento das plantas, pois controlam organismos tóxicos no solo através da quelação destes (BURD et al., 2000). O sideróforo produzido por *P. fluorescens* aumentou a captação de ferro em plantas de milho (SHARMA et al., 2003). A espécie *H. seropedicae* libera serobactinas (Conjunto de sideróforos lipopetídicos) na ausência de ferro (ROSCONI et al., 2013). O crescimento da estirpe Z67 de *H. seropedicae* sob concentrações baixíssimas de ferro reprimiu a expressão dos genes *nifA* e *nifH* e conseqüentemente inibiu a atividade da enzima nitrogenase (ROSCONI et al., 2006). O mutante defectivo na síntese e na internalização de serobactinas (Receptor TonB-dependente) teve seu crescimento prejudicado quando co-inoculado (Estirpe selvagem) em plantas de arroz, indicando a importância da aquisição de ferro mediada por serobactinas nessa estirpe. Os genes *cirA* e *fhuA*, que codificam para uma enzima responsável pela biossíntese de serobactina, estão adjacentes ao gene nocauteado (*Hsero\_2343*) sugerindo que um desses genes possa codificar para um receptor (ROSCONI et al., 2016). Os genes que codificam o receptor de membrana externa para catecóis monoméricos (*fiu*, *fhuA*, e ORF\_0093.0054) e para a proteína receptora de membrana/Transporte de ferro (*cirA*) foram reprimidos quando a estirpe HCC103 cresceu na presença do líquido do apoplasto (*vs.* MA). Os dados sugerem que a concentração de ferro no líquido do apoplasto estivesse favorável à manutenção e ao crescimento bacteriano, de modo que a estirpe HCC103 não precisasse utilizar o mecanismo de liberação de sideróforos para captar o ferro (Se escasso), adicionado à alta indução do gene que codifica para a ferritina, que é uma forma de armazenar ferro. Pesquisas mais aprofundadas são fundamentais para identificar a função específica desses genes, que tem papel importante no metabolismo da bactéria e na associação com as plantas.

Os genes *ssuB*, *ssuC* e *ssuF*, *emr* (Transportador de membrana de cátions e drogas catiónicas) e as ORFs\_0002.0002, \_0037.0107, \_0105.0012, \_0118.0037, \_0127.0147 foram reprimidos quando a estirpe HCC103 foi cultivada no líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MM. Os genes *ssuB* e *ssuC* também foram reprimidos no líquido do apoplasto quando comparado ao MA. O enxofre é um

elemento indispensável para a produção de proteínas. Os genes *ssu* em bactérias, como *Pseudomonas putida* S-313, estão relacionados normalmente ao transporte ABC de compostos de enxofre, e estão organizados num *operon* contendo *ssuABC* e *ssuD* (Monooxigenase) (KAHNERT et al., 2000). Estudos mostraram a importância do transportador ABC de sulfonatos alifáticos na bactéria *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (KOCH et al., 2005), que se torna uma vantagem adaptativa, já que pode utilizar outras fontes de enxofre além das formas inorgânicas. As bactérias fixadoras de nitrogênio *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* preferem as formas inorgânicas de enxofre para crescimento em condições de laboratório, no entanto, foram capazes de crescer em sulfato, cisteína, sulfonatos ou compostos de éster de enxofre (SUGAWARA et al., 2011). O nocaute de dois genes (*bll6451* ou *bll7010*) relacionados com a utilização de sulfonatos na bactéria *B. japonicum* não afetou a simbiose com plantas de soja, sugerindo que outros genes podem desempenhar esse papel ou a planta fornece outras fontes de enxofre (SUGAWARA et al., 2011). A presença dos transportadores ABC para sulfonatos, sistemas de transporte e oxidação de alcanosulfonatos (*SlfASsuDACB*) e organosulfuretos (*SsuDEACB*) na bactéria fitopatogênica dos citros *Xanthomonas citri* pv. *citri* ofereceu vantagens à bactéria (Manutenção do crescimento bacteriano) por assimilar e transportar diferentes fontes de enxofre (PEREIRA et al., 2015). Em contraste, a forma de infecção e patogenicidade são diferentes na outra bactéria do mesmo gênero, *Xanthomonas campestris*, que não possui esses transportadores, reforçando assim a importância dos transportadores ABC para sulfonatos na interação (PEREIRA et al., 2015). O nocaute do gene *ssuA* (Proteína de ligação de alcanos) na bactéria *X. citri* não alterou o crescimento *in vitro*, porém foi confirmada a importância desse gene *in vivo* no desenvolvimento da doença do cancro, afetando a produção da goma xantano e a geração de lesões em folhas de laranja (ARAÚJO et al., 2013). Vale registrar que esse sistema de transporte tipo ABC, além de transportar sulfonato, transporta também bicarbonato e nitrato. A repressão desses genes no líquido do apoplasto (vs. MM) é o mesmo que a indução no MM, mostrando que com a adição do meio JNFb novo ao caldo de crescimento houve a suplementação desses ânios.

#### b) Transporte e metabolismo de aminoácidos (E)

Foram encontrados 7 e 16 genes reprimidos no transcriptoma da estirpe HCC103 cultivada no líquido do apoplasto em comparação aos tratamentos MA (*ttuC*, *dada*,

*leuA*, *trpE*, *carA*, *ilvI* e ORF\_0030.0116) e MM (Ex. *dapB*, *cobC*, *pheA*), respectivamente. Em contraste, 29 genes foram induzidos no líquido do apoplasto em comparação ao meio MA (ex. *livK*, *livG*, *iscS1*, *dadA*, *gdhA*, *eutB*, *opuA*, *opuBB1*, *dppC2*, *adhC*, *hisJ*) e 30 genes no meio MM (ex. *livK*, *livG*, *livM*, *trpC*, *livH*, *livF*, *goaG*, *eutB*, *potC*, *dadA*, *potH*, *potA*, *gltD*, *serA*), respectivamente. No transcriptoma da bactéria mutante *R. leguminosarum* bv. *trifolii* rosR<sup>-</sup> (vs. Selvagem) muitos genes envolvidos no transporte de aminoácidos foram induzidos. Esse gene está envolvido na regulação da síntese de exopolissacarídeos em várias espécies de rizóbio, e o seu produto afeta processos celulares e a adaptação da bactéria ao ambiente (RACHWAŁ et al., 2015). No presente transcriptoma de HCC103, os genes *liv* destacam-se entre os transportadores ABC de aminoácidos, com representantes induzidos na presença do líquido do apoplasto (vs. MA e vs. MM). Quando a estirpe *H. seropedicae* SmR1 foi cultivada na presença de nitrato (vs. Amônio), obteve-se representantes *liv* tanto entre os genes induzidos quanto entre os reprimidos (BONATO, 2013). Já quando essa mesma estirpe cresceu na presença de naringenina os representantes desse grupo foram reprimidos (*livG*, *livF*, *livK*, *livH*) (TADRA-SFEIR, 2011). Estudos com o objetivo de melhor conhecer a interação de *Azospirillum lipoferum* 4B com plântulas de arroz (cv. Cigalon e cv. Nipponbare) mostraram a presença de um operon envolvido no transporte de aminoácidos e a indução (vs. sésil) de genes do metabolismo de arginina e prolina quando *Azospirillum lipoferum* 4B foi inoculada na cv. Nipponbare (DROGUE et al., 2013). No apoplasto das variedades de cana-de-açúcar PR 60-170, NCo310 e RD 75-11 predominam os conteúdos de ácido aspártico, alanina, serina e prolina, enquanto que ácido glutâmico, tirosina, cisteína, metionina, glicina e lisina foram encontrados em baixas concentrações (TEJERA et al., 2006). A indução de muitos genes envolvidos no transporte de aminoácidos quando HCC103 cresceu na presença do líquido do apoplasto, indica a utilização desses compostos no seu metabolismo. Resultados diferentes foram encontrados por SILVA (2016), em que a maioria dos genes diferencialmente expressos pertencentes à classe metabolismo e transporte de aminoácidos foram reprimidos quando a diazotrófica *P. tropica* Ppe8 cresceu na presença do líquido do apoplasto. Os autores sugerem que a indução ocorreu devido à presença de arginina e prolina entre exsudados vegetais aos 7 dias de idade da plântula. Nossos resultados indicam que o líquido do apoplasto é uma rica fonte de aminoácidos, como citado por TEJERA et al. (2006), dessa forma favorecendo e ativando o transporte e metabolismo pela estirpe HCC103.

### c) Transporte e metabolismo de lipídio (I)

Foi encontrado um gene reprimido (*paaJ*) na estirpe HCC103 cultivada no líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA e 5 genes em comparação ao MM (*atoA*, *atoD*, *ato*, *caia*, e ORF\_0049.0475). Em adição, 6 genes foram induzidos no líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA (*prpE*, *tsaC*, ORFs\_0058.0075, \_0058.0076, \_0127.0200, \_0118.0222) e 8 genes no meio MM (*prpE*, *tsaC*, *fabG*, *phbB*, \_0002.0181, \_0058.0075 \_0105.0050 \_0127.0200). O gene *ato* codifica para Acil CoA: acetato/3-cetoácido CoA transferase, subunidade  $\alpha$ , enquanto os genes *atoA* e *atoD*, para a subunidade  $\beta$ , *caia* para Acil-CoA desidrogenases, e a ORF\_0049.0475 para a proteína de transporte de Acil. O gene *atoA* faz parte de um operon *atoDAB*, que é regulado pela expressão dos componentes dos sistemas de transdução de sinal AtoS-AtoC (LIOLIOU et al., 2003). A forma ativada deste operon conduz o catabolismo de ácido graxo de cadeia curta e ativa a biossíntese de Poli-hidroxibutirato (PHB) via proteína AtoDA (RHIE et al., 1995). Produtos deste operon estão envolvidos em quimiotaxia (OSHIMA et al., 2002). O gene *atoA* foi induzido na estirpe SmR1 cultivada na presença de nitrato (BONATO, 2013). O PHB está correlacionado com a melhoria da sobrevivência bacteriana sob estresse e em condições de competição, logo essa produção pode ser uma vantagem durante as etapas iniciais da colonização (KADOURI et al., 2003). A bactéria diazotrófica *A. brasilense* Sp7 produz altas quantidades de PHB em condições sub-ótimas (KADOURI et al., 2003). O nocaute no gene *phbC* resultou na ausência de produção de PHB, além do aumento da motilidade, adesão, produção de EPS, e outros fatores envolvidos na interação bactéria-planta (KADOURI et al., 2002). A síntese e a capacidade de armazenar PHB foram identificadas em *H. seropedicae* estirpe SmR1 que expressou o gene *phbF* quando foi cultivada em meio NfbHPN (Malato) (KADOWAKI et al., 2011). Entretanto, os genes *phbABC* foram reprimidos quando a bactéria foi inoculada na planta, levando aos autores sugerirem que esse perfil de expressão ocorreu devido ao ambiente nutricionalmente pobre. Além disso, houve o aumento da expressão da PHB depolimerase (*phaZ2*), indicando o provável uso do PHB estocado para a sobrevivência da bactéria (BALSANELLI, 2013). Na estirpe SmR1 de *H. seropedicae* as proteínas *Phasin* homólogas PhaP1 e PhaP2 controlam a formação do PHB. Foram construídos mutantes com nocaute para cada um desses genes, ou em ambos. O nocaute do gene



*phaP1* reduziu a acumulação de PHB em 50% em relação ao mutante *phaP2*; enquanto que o nocaute de ambos os genes (*phaP1.2*) resultou na ausência de acumulação PHB, além de ter causado efeito negativo no crescimento bacteriano quando a fonte de C foi a glicose (ALVES et al., 2016). A repressão dos genes *ato* sugere que não foi necessário produzir o PHB na presença do líquido do apoplasto (vs. MM), indicando que o líquido do apoplasto foi favorável à manutenção da bactéria. Esses dados sugerem a importância do PHB na interação da bactéria com os compostos vegetais.

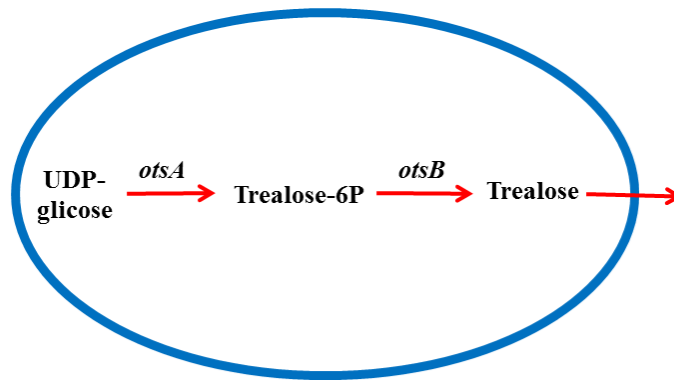
#### **d) Transporte e metabolismo de nucleotídeo (F)**

Foram encontrados 4 genes reprimidos na presença do líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA (*xdhA*, *xdhB*, *ndk*, *carA*) e 6 genes em comparação ao MM (*xdhA*, *xdhB*, *purU*, *ndk*, *carA*, ORF\_0002.0081); enquanto que 4 genes foram induzidos no líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA (*daT*, *deoC*, *upp*, ORF\_0119.0032) e, somente 1 no meio MM (*dgt*). Os genes *xdhA*, *xdhB* e *ndk* codificam para xantina desidrogenase. A xantina desidrogenase (XDH) e a xantina oxidase (XO) são as duas formas da xantina oxireductase (XOR). Esta última é membro da família das enzimas molibdênicas que catalisa a degradação de purinas e metaboliza a hipoxantina a xantina, e esta a ácido úrico (CANTU-MEDELLIN e KELLEY, 2014). Essa enzima é alvo de muitos estudos em eucariotos, por ser fonte central de produção de espécies reativas de oxigênio em lesões teciduais ischemia-reperfusão, busca-se a sua inibição em doenças que o estresse oxidativo contribua (CANTU-MEDELLIN e KELLEY, 2014). Na bactéria *Rhodobacter capsulatus*, três genes, *xdhA*, *xdhB* e *xdhC*, codificam as funções necessárias para a atividade da xantina desidrogenase (LEIMKUHNER et al., 1998). As subunidades da xantina foram identificadas e sequenciadas a partir da bactéria Gram-negativa, *Comamonas acidovorans*, e analisada a sua expressão heteróloga (*xdhAB*) em *E. coli*. A atividade de XDH aumentou seis vezes quando a estirpe de *xdhAB*- *E. coli* foi cultivada em baixa aeração em relação a alta aeração (IVANOV et al., 2003). A enzima XO foi considerada importante na interação entre *E. coli* e o hospedeiro (Enteropatogênica), por desencadear efeitos biológicos devido a formação de peróxido de hidrogênio pela enzima (CRANE et al., 2016). O gene *xdhA* é considerado termotolerante na bactéria *Acetobacter tropicalis* SKU1100, seu produto (Xantina desidrogenase) é conhecido por regular o choque térmico e as respostas ao estresse (SOEMPHOL et al., 2011). A xantina desidrogenase também foi caracterizada na bactéria Gram-negativa *Acinetobacter*

*baumannii*, nesta a enzima mostrou-se termoestável e tolerante a alcalinidade (Wang et al., 2016). Purinas estimulam o crescimento de células de *E. coli* sob limitação de nitrogênio, a enzima xantina desidrogenase (XDH) contribui para a recuperação de purinas. Mutante nocauteado para *xdh*, sob limitação de N, teve catabolismo de aminoácidos alterado (Xi et al., 2000). A repressão dos genes *xdhA* e *xdhB* no MLA, sugere que a bactéria não tenha sofrido estresse oxidativo quando crescida na presença do líquido do apoplasto, porém a função desses genes em HCC103 deve ser confirmada.

#### e) Transporte e metabolismo de carboidratos (G)

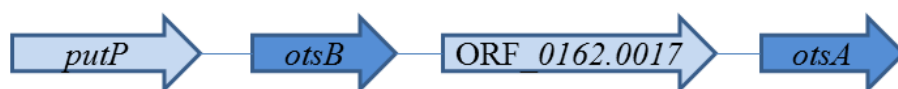
Foi encontrado 1 gene reprimido (*rpe*) no líquido do apoplasto em comparação ao MA e 7 genes em comparação ao MM (*ugpA*, *suhB*, *rpe*, ORFs\_0002.0021, \_0037.0077, \_0054.0009, \_0110.0026); enquanto que 32 e 42 genes foram induzidos no líquido do apoplasto em comparação ao MA e MM, respectivamente. Genes relacionados ao estresse osmótico, *otsA* e *otsB*, que codificam, respectivamente, a trealose-6-fosfato sintase (TPS) e a trealose-6-fosfato fosfatase (TPP), foram induzidos quando a bactéria foi cultivada no líquido do apoplasto para ambas as comparações (vs. MM e vs. MA). A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose, produzida por diversos organismos, como as leveduras, bactérias e plantas (ELBEIN et al., 2003). Existem relatos que a produção de trealose seja um mecanismo utilizado por diferentes organismos contra o estresse osmótico (CARVALHO et al., 2011), com funções de proteção das membranas e proteínas, além de servir como fonte de carbono e energia (FARIA, 2016). A via de produção de trealose (Figura 22), inicia-se ação da trealose-6-fosfato sintase (Codificada pelo gene *otsA*) que condensa a glicose-6-fosfato a UDP-glicose, em seguida a trealose-6-fosfato fosfatase (Codificada por *otsB*) atua na desfosforilação, produzindo então a trealose (CARVALHO et al., 2011). Genes que codificam para o estresse osmótico (*otsA* e *otsB*) foram reprimidos quando a bactéria patogênica da cana de açúcar, *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* foi exposta ao polietilenoglicol 6000 (vs. sem estresse) (FARIA, 2016).



**Figura 22.** Via OtsAB de biossintese de Trealose.

Genes que codificam para trealose estão presentes nos genomas *H. seropedicae* SmR1 (*otsA* e *otsB*) (PEDROSA et al., 2011) e de *G. diazotrophicus* (*otsA*, *otsB* e *treY*). O mutante *G. diazotrophicus* PAL5 *otsA*<sup>-</sup> não afetou o perfil de resistência ao estresse osmótico quando comparado à estirpe selvagem, não sendo considerado essencial para a biossintese da trealose (DA SILVA, 2014). Vale ressaltar que além da via *otsAB*, existem outras vias de produção de trealose já identificadas em procariontos (ELBEIN et al., 2003; CARPINELLI et al., 2006; FREEMAN et al., 2010; CHEN et al., 2012); entretanto, nenhum gene destas vias esteve entre os diferencialmente expressos na estirpe HCC103. A organização destes genes no genoma de diferentes bactérias é altamente conservada e observa-se que esses dois genes estão sempre próximos um ao outro, geralmente *otsB* antecede *otsA* e, em alguns casos, como de *H. seropedicae*, são separados pelo gene que codifica uma glucoamilase. Essa organização se mantém na estirpe HCC103, exceto para a ORF\_0162.0017 que não teve o seu produto caracterizado (Figura 23). Sugere-se que Mg<sup>2+</sup> seja cofator da enzima em *H. seropedicae*, uma vez que a atividade da trealose-6-fosfato fosfatase mostrou-se dependente do mesmo (PETRUZZIELLO, 2009). Os genes *otsA* e *otsB* foram altamente induzidos na bactéria fitopatogênica *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) durante o desenvolvimento da doença do cancro, mostrando a importância destes na patogenicidade (PIAZZA et al., 2015). Estudos com o mutante Xcc-*otsA*<sup>-</sup> mostram que o mesmo produziu menores quantidades de trealose, foi menos tolerante aos estresses salino e osmótico do que a estirpe selvagem, além de apresentar menor colonização das folhas de citros (PIAZZA et al., 2015). Na bactéria *R. solanacearum* um dos genes que codifica para trealose-6-fosfato sintase chama-se *ripTPS*. Este gene está envolvido com a translocação de proteínas para a planta através do SST3 e o nocaute do mesmo não

alterou o perfil de virulência em plantas de berinjela, tomate e *Geranium sanguineum* (POUEYMIRO et al., 2014). Os genes *otsA* e *otsB* podem ser importantes para o conhecimento da interação da estirpe HCC103 com a planta de cana-de-açúcar, uma vez que essa estirpe e outras (M1, M4, IBSBF 175) de *H. rubrisubalbicans* apresentam um perfil fitopatogênico na variedade de cana B-4362 suscetível à estria mosqueada, e estrias vermelhas (Estirpes M1 e M4) em plantas de sorgo (OLIVARES et al., 1997; PIMENTEL et al., 1991). A indução dos genes da biossíntese de trealose na presença do líquido do apoplasto sugere a proteção da estirpe HCC103 diante da modificação do ambiente de crescimento, possivelmente oriunda de um estresse osmótico.



**Figura 23.** Organização dos genes *otsA* e *otsB* no genoma de *H. rubrisubalbicans* HCC103. Esses genes foram anotados manualmente através do programa Artemis.

O gene *gpmA* foi induzido no líquido do apoplasto para ambas as comparações (vs. MA e vs. MM), enquanto o gene *gltD* foi induzido apenas na comparação com o tratamento MM. No proteoma de SmR1, as proteínas GltD e GpmA não apresentaram expressão quando a estirpe SmR1 foi cultivada na presença do caldo de cana-de-açúcar (vs. Ausência), sugerindo a inibição da glicólise, uma vez que a enzima GpmA catalisa conversão de 2-fosfoglicerato a 3-fosfoglicerato (CORDEIRO, 2013). Os genes *suhB* e *tufB* foram reprimidos na presença líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MM. A enzima SuhB inositol monofosfato é importante na via de sinalização do fosfatidilinositol, que está envolvida na transdução de sinais em mamíferos e plantas. A enzima é responsável por desfosforilar Inositol Fosfato a Inositol (DROBAK, 1992). Em *Burkholderia cenocepacia* o gene *suhB* foi essencial para a formação de biofilme, secreção de proteínas e motilidade (ROSALES-REYES et al., 2012). Estudos com *P. aeruginosa* PAK, causadora de infecções em humanos, mostraram que o gene *suhB* é essencial para a expressão do SST3, relacionado a infecções agudas. A literatura sugere o envolvimento desse gene desde a formação de biofilme, secreção de proteínas e motilidade até a patogenicidade aguda, porém o comportamento é variável entre bactérias patogênicas (ROSALES-REYES et al., 2012; LI et al., 2013). O cultivo da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* na presença do caldo de cana de açúcar promoveu a

indução da proteína SuhB inositol monofosfato, enquanto que a proteína TufB estava ausente (CORDEIRO et al., 2011). Os autores consideraram esse resultado como forma de adaptação da bactéria ao ambiente. Da mesma forma, a repressão desses dois genes (*suhB* e *tufB*) na estirpe HCC103 cultivada na presença do líquido do apoplasto (vs. MM) sugere uma alteração metabólica da bactéria diante da disponibilidade de nutrientes. Ou seja, esses foram induzidos no MM, o que pode indicar a produção do biofilme nessa condição.

#### **f) Transporte e metabolismo de coenzima (H)**

Foram encontrados 8 genes reprimidos na estirpe HCC103 quando cultivada na presença do líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA (*ilvI*, *trpE*, *chII*, *ahcY*, *cbiD*, *thiC*, *thuC* e ORF\_0135.0047) e 15 em comparação ao tratamento MM (*trpE*, *cobA*, *cobN*, *cobL*, *cobH*, *ahcY*, *chII*, *cbiD*, *ssuF*, *thiG*, *thuC*, *thuD*, *rifB*, ORF\_0037.0141 e ORF\_0135.0047); enquanto que 6 e 5 genes foram induzidos na estirpe cultivada no líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA (*menG*, *moaA*, *panB*, ORF\_0037.0141, \_0167.0049 \_0049.0090) e ao MM (*menG*, *moeA*, *hemH*, *serA*, e ORF\_0058.0088) respectivamente. O grupo de genes *cob*, os genes *cbiD* e ORF\_0118.0094, reprimidos na sua maioria na estirpe cultivada no líquido do apoplasto em relação ao MM, estão envolvidos na produção de cobalamina (Vitamina D). Alguns desses genes estão agrupados nas classes produção e conversão de energia. A biossíntese de cobalamina tem sido alvo de estudos em muitas bactérias, com destaque para as formadoras de nódulos. Na *Ensifer adhaerens* CSBa foram identificados 22 genes *cob* da via aeróbica de produção de cobalamina (VU et al., 2013). Especula-se que as bactérias da ordem *Rhizobiales* têm a capacidade de produzir a cobalamina, e que a produção dessa substância seja chave na simbiose (VU et al., 2013). Estudos demonstraram que *E. meliloti* requer uma ribonucleotídeo redutase cobalamina-dependente no processo de simbiose com a planta hospedeira (TAGA et al., 2010) e que a isoenzima cobalamina-dependente seja importante para a sobrevivência da bactéria *E. meliloti* dentro do hospedeiro vegetal (CAMPBELL et al., 2006). A produção de cobalamina já foi observada por *Rhizobium* sp. Rb122, essa estimulou o crescimento e a oxidação do metano de *M. miyakonense* HT12 em co-culturas (IGUCHI et al., 2011). Sabe-se que o  $\text{Co}^{2+}$  tem papel importante no processo de FBN em plantas leguminosas (PALIT et al., 1994; WITTE et al., 2002). Nas bactérias *E. coli* e *S. typhimurium*, a metilação de homocisteína a metionina é catalisada por duas enzimas:

MetH (cobalamina-dependente) e MetE (Cobalamina-independente). O gene *metE*, que codifica uma Metionina sintase-Cobalamina independente, foi induzido na ausência de cobalto (GREENE, 1997). A repressão desse grupo de genes *cob*, *metE* e do transportador de cobalto (*\_0118.0094*) no tratamento MLA (vs. MM) sugere que a produção de cobalamina não foi necessária, diante do ambiente favorável a manutenção bacteriana.

#### 4.1.8. Produção e Conversão de Energia (C)

Foram encontrados 4 genes reprimidos na estirpe HCC103 cultivada no líquido do apoplasto em comparação ao tratamento MA (*adhC2*, *cydB*, *cydA* e *ttuC*) e 13 genes no meio MM (*glpP*, *fdx*, *aceA*, *atpB*, *nuoC*, *nuoB*, *nuoA*, *adhC*, *cobN*, *prpC*, *cydA*, *icd*, ORF\_0065.0003); enquanto que 15 genes foram induzidos na estirpe cultivada na presença do líquido do apoplasto em comparação ao MA (*glcD*, *glcE*, *glpK*, *glpD2*, *gabD1*, *gbd*, *icd* ORFs\_0002.0008, \_0002.0124, \_0002.0125, \_0002.0262, \_0049.0051, \_0127.0118, \_0127.0210, \_0203.0103) e 19 genes ao MM (*dctA*, *glcD*, *glcE*, *glpK*, *glpD2*, *lldD*, *gbd*, *putA*, *ttuC*, *por*, ORFs\_0002.0008, \_0002.0124, \_0002.0125, \_0002.0262, \_0049.0051, \_0127.0118, \_0127.0210, e \_0203.0103). A geração de energia é um processo celular básico, com participação dos genes constitutivos, que normalmente apresentam pouca variação nos níveis de expressão, entretanto existem situações em que esses níveis podem variar significativamente (GUÉNIN et al., 2008), como nos exemplos citados a diante. Os genes *nuoA*, *nuoB* e *nuoC*, reprimidos em comparação ao tratamento MM, codificam respectivamente para NADH: ubiquinona oxidoreductase subunidade a, NADH: ubiquinona oxidoreductase subunidade b e, NADH desidrogenase (WEIDNER, 1993). A bomba de prótons NADH: ubiquinona oxireductase, é a principal fonte de entrada de elétrons na cadeia respiratória de diversas bactérias (WEIDNER, 1993). Esse complexo é composto por 14 subunidades em *E. coli*, que são codificadas pelos genes *nuoA* e *nuoN*, enquanto que os genes *nuoC* e *nuoD* estão dispostos em outro complexo (ERHARDT et al., 2012). Entre os genes induzidos na presença do líquido do apoplasto (vs. MM), estão os genes que codificam para proteínas transportadoras de dicarboxilato-C4 (Dct), tais como *dctA* e *dctP* (Transportador de dicarboxilato-C4 do tipo ABC), *dctM* e *dctQ* (Permease do transportador de dicarboxilato-C4 do tipo ABC) e *dctD1* (Regulador de resposta). Os genes *dctM*, *dctP* e *dctD1* também foram induzidos quando a estirpe foi cultivada no líquido do apoplasto em relação ao tratamento MA. Os dicarboxilatos C4, como

fumarato, aspartato e malato, podem ser metabolizados por bactérias em ambientes aeróbicos ou anaeróbicos. Os transportadores *dct* são apenas um dos tipos de transporte dessas moléculas (JANAUSCH et al., 2002). O nocaute do gene *dct* em *R. leguminosarum* resultou na produção de nódulos inativos e na incapacidade de transportar dicarboxilatos C4 (FINAN et al., 1983). Nossos resultados dados sugerem que o líquido do apoplasto é rico em dicarboxilatos C4, o que conseqüentemente, favoreceu a indução desse grupo de genes.

Os genes *glcD* e *glcE* (subunidade glicolato oxidase e glicolato oxidase) foram induzidos na estirpe cultivada no líquido do apoplasto nas duas comparações (*vs.* MM e *vs.* MA). Esses genes e o *glcF* foram reprimidos quando a bactéria *H. seropedicae* SmR1 foi crescida na presença de naringenina (TADRA-SFEIR, 2011). Mutações dos genes *glcD*, *glcE* e *glcF* na bactéria *E. coli* impediram a atividade da glicolato oxidase, indicando que esses genes possivelmente codificam subunidades dessa enzima, o que não ocorreu para o gene *glcG* (PELLICER et al., 1996). Os genes *glcD*, *glcE* e *glcF* foram reprimidos quando a estirpe SmR1 cresceu na presença de nitrato (*vs.* Amônio) (BONATO, 2013). A bactéria *Sinorhizobium* sp. NGR234 é capaz de formar nódulos de forma diferenciada dependendo da espécie de leguminosa. Os transcriptomas de nódulos de *Vigna unguiculata* (Nódulos determinados) aos 21 dias após a inoculação da estirpe NGR234 e de *Leucaena Leucocephala* (Nódulos indeterminados) aos 35 dias após a inoculação com esta mesma bactéria revelaram que genes que codificam para glicolato oxidase foram induzidos tanto nos bacteroides obtidos de *V. unguiculata* como de *L. leucocephala*, assim como quando a bactéria foi cultivada *in vitro* (LI et al., 2013). A indução desses genes (*glcD* e *glcE*) quando HCC103 foi cultivada na presença do líquido do apoplasto, sugere que esse composto vegetal foi capaz de ativar a expressão da glicolato oxidase, o que pode ser importante na interação da bactéria com a planta, como por exemplo, durante o estabelecimento da bactéria no interior da hospedeira.

O gene que codifica para a nitrato redutase subunidade beta (ORF\_0002.0124) foi induzido na presença do líquido do apoplasto em relação ao MA (Fold change 76.62) e em relação ao MM (Fold change 390.6). De forma semelhante o gene que codifica para a nitrato redutase subunidade alfa (ORF\_0002.0125) também foi induzido na presença do líquido do apoplasto em relação ao MA (Fold change 161.55) e em relação ao MM (Fold change 163.4). Análises realizadas por Tejera et al. (2006) indicaram valores de 894.9 até 909.8 µg de nitrato por ml de apoplasto que variaram de acordo com a variedade de cana-de-açúcar (Nco303, RD 75-11, PR 60-170). A presença

do nitrato no líquido do apoplasto pode ter influenciado positivamente nos altos valores de expressão dos genes que codificam para nitrato redutase subunidades alfa e beta.

O trabalho de PEDROSA et al. (2011) revelou que a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* contém genes codificando para os sistemas: Nitrato Redutase Assimilatório (NAS) (*nasAHsero\_2899*), Nitrito Redutase (*nirBD*) e Nitrato Redutase Respiratório (NAR) (*narGHJI*). O sistema NAR é um complexo de três subunidades ancorado à face citoplasmática da membrana com seu sítio ativo localizado na região citoplasmática (RICHARDSON et al., 2001). A redução de nitrato através da enzima nitrato redutase respiratória associada à membrana plasmática, está acoplada com a geração de um gradiente de prótons através da membrana, o que dirige a formação de ATP através da ATPase. A enzima NarGHI, possui o sítio ativo voltado para o citoplasma, conhecida em *Escherichia coli*, uma bactéria não desnitrificante, mas pode ser abordada para suas homólogas desnitrificantes (GONZÁLEZ et al., 2006). Em razão do sítio ativo de NarGHI estar localizado no citoplasma, o nitrato deve ser transportado para dentro da célula para ser reduzido, papel este desempenhado por NarK. Proteínas NarK podem ser divididas em dois grupos, o primeiro inclui proteínas que realizam o mecanismo de antiporte nitrato/nitrito e simporte nitrato/próton e o segundo grupo está envolvido no efluxo de nitrito (JIA e COLE, 2005; JIA et al., 2009; YAN et al., 2013). O transportador NarU, identificado em *E. coli*, possui alta similaridade com NarK e sua função está relacionada à captação de nitrato e nitrito para o interior da célula e à exportação de nitrito para o meio extracelular (CLEGG et al., 2002; CLEGG, 2006; JIA e COLE, 2005; YAN et al., 2013).

Estudos bioquímicos e genéticos sobre a redução de nitrato em micobactérias indicaram as funções de diferentes proteínas envolvidas nessa via. A diferença na redução de nitrato entre espécies patogênicas e não patogênicas de micobactérias e a regulação durante a limitação de oxigênio e nutrientes sugere uma ligação entre as vias de redução e a latência de nitrato (KHAN e SARKAR, 2012). Segundo os autores, as reduções respiratórias e assimilatórias de nitrato em micobactérias podem estar relacionadas para facilitar a adaptação da bactéria às modificações nos níveis de oxigênio e/ou nitrogênio, aumentando a flexibilidade metabólica para a sobrevivência no ambiente hostil do hospedeiro (KHAN e SARKAR, 2012). A bactéria *H. seropedicae* possui genes com alta similaridade a nitrato redutase respiratória, entretanto não é capaz de crescer em anaerobiose em nitrato como única fonte de nitrogênio (BALDANI et al., 1986).



Estudo de RNA-Seq mostrou a repressão de genes do sistema NAR quando a estirpe SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae* colonizando em plântulas de trigo (vs. Planctônica) em sistema hidropônico contendo solução de Hoagland sem nitrogênio (PANKIEVICZ et al., 2016). Estudos adicionais foram realizados em plantas de trigo inoculadas com a estirpe selvagem ou com a mutante (*narG*) num sistema hidropônico, plantas inoculadas com a estirpe mutante apresentaram diminuição da parte aérea e peso seco de raízes, mostrando que a ausência do sistema NAR funcional afeta o desenvolvimento da planta (BONATO et al., 2016). O perfil de crescimento tanto da estirpe selvagem quanto na mutante foram semelhantes na presença de amônia ou nitrato em aerobiose. Já na presença de nitrato e em microaerobiose ambas as estirpes cresceram da mesma forma até as 6 h, quando a estirpe selvagem parou o crescimento. Os autores sugerem que o nitrito produzido pela estirpe selvagem possa inibir o crescimento da bactéria (BONATO et al., 2016). Os autores supõem ainda o papel do sistema NAR na dissipação de energia, formação de nitrito e óxido nítrico, acredita-se que esteja envolvido na interação com a planta. Os autores também observaram que *narK1* foi expresso sob condições de nitrato e baixos níveis de oxigênio (BONATO et al., 2016). Nossos resultados supõem que a indução de genes do sistema NAR esteja relacionada à presença do nitrato no líquido do apoplasto, como observado por TEJERA et al. (2006) que encontraram valores de 894.9 até 909.8 µg de nitrato por ml de apoplasto. Outros fatores provavelmente influenciam a expressão de genes que codificam para nitrato redutase in situ, como os níveis de oxigênio, além de outros, como observado por BONATO et al. (2016) em que a ausência de NAR influencia o desenvolvimento de plantas de trigo. Maiores investigações são necessárias para a confirmação dessa hipótese.

#### **4.1.9. Outras classes**

Outras classes também apresentaram genes diferencialmente expressos na estirpe HCC103 cultivada na presença do líquido do apoplasto em comparação aos tratamentos MA e MM conforme apresentado na tabela 6.

**Tabela 6.** Quantidade de genes reprimidos ou induzidos de HCC103 na presença do líquido do apoplasto em comparação ao Meio+Meio, ou ao Meio+Água, distribuídos de acordo com outras classes funcionais além das citadas anteriormente.

Classes	MLA vs. MA		MLA vs. MM	
	Reprimidos	Induzidos	Reprimidos	Induzidos
Modificações Pós-traducionais, “turnover” de proteínas e chaperonas	1	6	9	8
Transcrição	13	19	17	27
Replicação, recombinação e reparo	6	1	6	1
Controle do ciclo celular, divisão celular, partição do cromossomo	1	3	1	1

O gene *mreB* é um dos representantes dos genes reprimidos no tratamento MLA (vs. MM). O operon *mreBCD* é necessário para o formato de haste das células e segregação cromossômica em *E. coli*, sendo que *mreB* é essencial para a produção de uma proteína homologa à actina, o que o torna importante não só para a manutenção do formato da célula, mas também, para a viabilidade celular (JONES et al., 2001; WACHI et al., 2006). O nocaute de *mreB* na bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* resultou na modificação da morfologia e da superfície celular (BIONDI et al., 2004). A inibição de *mreB* em *Myxococcus xanthus* diminuiu a motilidade bacteriana (MAURIELLO et al., 2010). A proteína MreB desenvolve também a função de localização do pili tipo IV e motilidade celular pilus-dirigida em *Pseudomonas aeruginosa* (COWLES et al., 2010). Sabe-se que o pili tipo IV está envolvido na interação com o hospedeiro e motilidade celular dirigida, e essa ligação com *mreB* pode fundamentar ainda mais esses indícios. Resultados diferentes foram encontrados no proteoma de SmR1, em que *mreB* foi expresso exclusivamente quando a bactéria cresceu na presença do caldo de cana-de-açúcar (CORDEIRO et al., 2013), os autores a sugeriram o envolvimento de *mreB* com a localização de pili tipo IV. Talvez essa diferença de comportamento esteja relacionada às diferenças de concentrações dos materiais vegetais utilizados, 5% do caldo de cana de açúcar no estudo de proteoma realizado por CORDEIRO et al. (2013) e 50% do líquido do apoplasto no presente transcriptoma da estirpe HCC103. Os resultados sugerem que a repressão de gene *mreB* durante o cultivo da bactéria no líquido do apoplasto (vs. MM) resulte na manutenção do estilo *free-swimming* e na modificação do formato celular. As demais classes e a lista completa dos genes diferencialmente expressos estão no anexo.

## 5. CONCLUSÃO

- ✓ Foi identificada uma variedade de genes e informações inéditas quando a estirpe HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi cultivada na presença do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar da variedade RB867515;
- ✓ Grupos de genes, possivelmente envolvidos na interação planta-bactéria, como os que codificam para proteínas do SST6, flagelo e mecanismos de transdução de sinais, foram induzidos na presença do líquido do apoplasto;
- ✓ O líquido do apoplasto da variedade RB867515 e seus componentes modulam a expressão diferencial de alguns genes na estirpe HCC103.

#### IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas deste estudo permitiram obter uma visão global da expressão gênica diferencial da estirpe HCC103 quando a mesma foi cultivada na presença do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar em comparação ao meio completo e meio diluído. As diferentes classes funcionais com genes induzidos ou reprimidos na presença do líquido do apoplasto estão esquematizadas na figura 24. A partir dos nossos resultados e da literatura, levantamos algumas hipóteses para explicar os fenômenos biológicos que eventualmente estariam ocorrendo quando a bactéria está presente nos tecidos de cana-de-açúcar. Obviamente, a função de um gene/proteína da estirpe HCC103 deve ser confirmada em pesquisas futuras através do silenciamento do gene(s) e avaliação da expressão fenotípica e genotípica na bactéria conforme já realizada para os estudos com *Herbaspirillum* (BALSANELLI et al., 2010; SCHMIDT et al., 2012; TULESKI, 2013; TOMAZINI, 2016), *Azoarcus* (HAUBERG et al., 2010), .

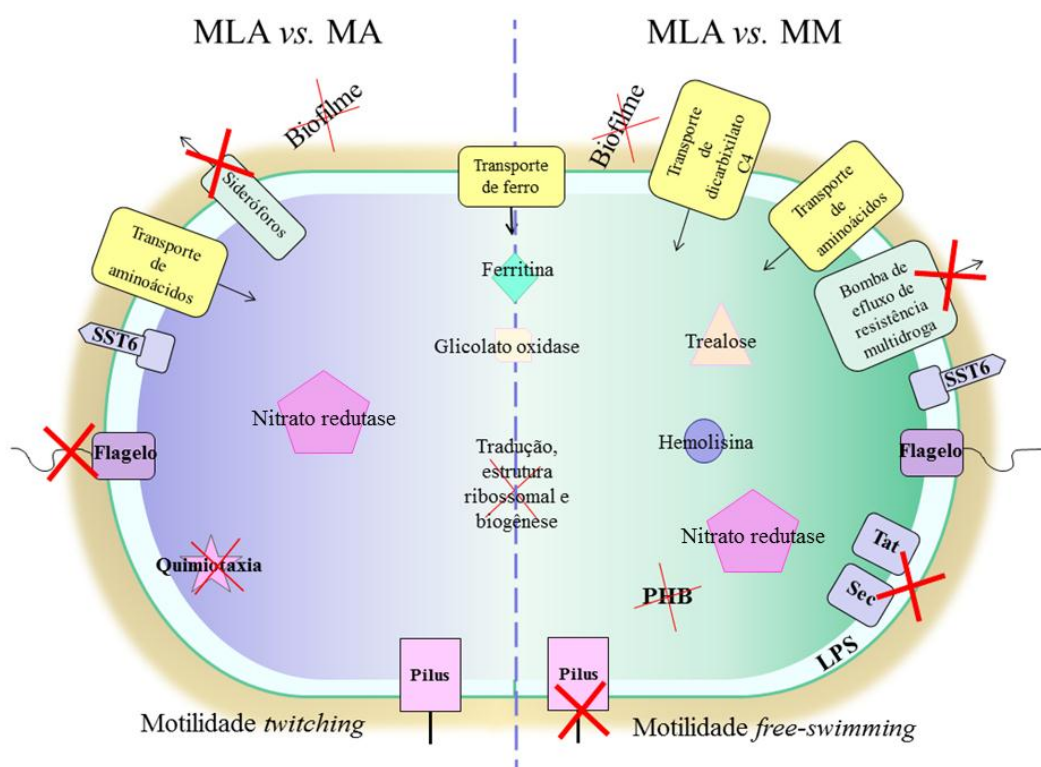


Figura 24. Visão geral das principais classes dos genes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 diferencialmente expressos quando cultivada na presença do líquido do apoplasto (MLA) em relação aos tratamentos com a suplementação de meio JNFb novo (MM) ou com água destilada (MA). A letra x (em vermelho) indica a repressão na presença do líquido do apoplasto enquanto que a ausência da letra x indica indução do gene na presença do líquido do apoplasto. Os genes ou classes localizados

sob a linha tracejada azul são comuns para as duas comparações (vs. Meio + Meio, vs. Meio + Água).

Dentre as classes de genes ilustrada na figura 24, pode-se pensar na exploração da função do sistema de secreção do tipo 6 na estirpe HCC103, uma vez que esse sistema está diretamente envolvido nas interações da célula procarionte com seus hospedeiros eucariontes, seja ela patogênica ou simbiótica. Diferentemente dos outros sistemas, o SST6 é capaz de transportar proteínas de uma bactéria para outra por meio do contato entre elas (RUSSELL et al., 2014). Conforme mencionado na discussão, esse sistema tem sido encontrado nas espécies de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (BLEVES et al., 2010), *E. coli* (MA et al. 2014), *Burkholderia mallei* (BURTNICK et al., 2010), porém não em diazotróficas endofíticas.

É importante enfatizar que esse estudo foi realizado em condições controladas de crescimento envolvendo apenas um organismo (HCC103) e com um componente (líquido do apoplasto) desse complexo sistema que envolve a interação planta-bactéria em cana-de-açúcar. Em condições naturais no meio ambiente, existem as interações interespecíficas, aumentando ainda mais complexidade do sistema, por tratar-se de um ambiente altamente competitivo, provavelmente afetado por condições hídricas, de temperatura, estágio de crescimento da hospedeira, entre outros fatores que podem afetar tanto a bactéria quanto a hospedeira direta e indiretamente. Estudo recente sobre o microbioma de cana-de-açúcar variedade SP80-3280 (após quarto corte) mostrou uma diversidade enorme de microrganismos associados tanto às raízes quanto ao colmo da planta, com destaque para grupos de organismos poucos estudados em cana, tais como fungos e leveduras (colmo), apesar da presença das bactérias diazotróficas conhecidas em menor escala (DE SOUZA et al., 2016). Portanto, os resultados obtidos *in vitro* devem ser confirmados *in situ*, com estudos mais aprofundados, utilizando, por exemplo, a técnica de RT-qPCR e mutagênese. Dessa forma, o conhecimento detalhado do papel desses genes na interação da estirpe HCC103 e a variedade RB867515 (responsiva a inoculação) poderá indicar possíveis marcadores que auxiliem na maximização do potencial biotecnológico da bactéria como biofertilizante em associação com outras variedades de cana-de-açúcar.

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, G.C.; Videira, S.S.; Urquiaga, S.; Reis, V.M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. *Plant and Soil*, v. 387, p. 307-321, 2015.

ANDA/Planner. Análise de Investimentos: Relatório Setorial – Fertilizantes. p. 1-4, 2016.

ANDA - Associação Nacional para a Difusão de Adubos. 2012. Disponível em: <[www.anda.org.br](http://www.anda.org.br)>. Acesso em: 15 de Julho de 2013.

Andersen, C.; Jensen, J.; Orntoft, T. Normalization of realtime quantitative reverse transcription-PCR data: a modelbased variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied. *Cancer Research*, v. 64, p. 5245-5250, 2004.

Annino, T.; Chen, Z-Q.; Shulenin, S.; Costantino, J.; Thomas, L.; Lou, H.; Stefanov, S.; Dean, M. Evolution of the vertebrate ABC gene family: Analysis of gene birth and death. *Genomics*, v. 88 (1), p. 1-11, 2006.

ARP, D.J. The nitrogen cycle. In *Prokaryotic Nitrogen Fixation*. Triplett, E.W. (ed). Wymondham, Great Britain: Horizon Scientific Press, pp. 1-14, 2000.

Asis 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.

Asis Júnior, A.; Shimizu, T.; Khan, M.K.; Akao, S. Organic acid and sugar contents in sugarcane stem apoplast solution and their role as carbon source for endophytic diazotrophs. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 49(6), p. 915-920, 2003.

Augimeri, R.V.; Varley, A.J.; Strap, J.L; Establishing a Role for Bacterial Cellulose in Environmental Interactions: Lessons Learned from Diverse Biofilm-Producing Proteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 1282, 2015.

Awaya, J.D.; Fox, P.M.; Borthakur, D. Genes encoding a fructose-1,6-bisphosphate aldolase and a fructose-1,6-bisphosphatase are present within the gene cluster for mimosine degradation in *Rhizobium* sp. strain TAL1145. *Plant and Soil*, v. 257, p. 11-18, 2003.

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, J.I.; Baldani, V.L.D.; Seldin, L.; Döbereiner, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 36, p. 86-93, 1986.

Baldani, J.I.; Caruso, L.; Baldani, V.L.D.; Goi, S.R.; Döbereiner, J. Recent advances in BFN with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, p. 911-922, 1997.

Baldani, J.I.; Pot, B.; Kirchoff, G.; Falsen, E.; Baldani, V.L.D.; Olivares, F.L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Hartmann, A.; Gillis, M.; Döbereiner, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen,

as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov, and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 46, p. 802-810, 1996.

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.

Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I.; Olivares, F.L.; Döbereiner, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Symbiosis, v. 13, p. 65-73, 1992.

Balsanelli, E. Caracterização de fatores moleculares envolvidos na interação de *Herbaspirillum seropedicae* com gramíneas. Curitiba: UFPR, 2013, 160 p. (Tese de doutorado).

Balsanelli, E.; Tuleski, T.R.; de Baura, V.A.; Yates, M.G.; Chubatsu, L.S.; Pedrosa, F.O.; de Souza, E.M.; Monteiro, R.A. Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-Acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. Plos One, v. 8, p. e77001, 2013.

Bastián, F.; Cohen, A.; Piccoli, P.; Luna, V.; Baraldi, R. & Bottini, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Regulation, v. 24, p. 7-11, 1998.

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.

Berne, C.; Ducret, A.; Hardy, G.G.; Brun, Y.V. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. Microbiology Spectrum, v. 3, ed. 4, 2015.

Biemans-Oldehinkel, E.; Doeven, M.K.; Poolman, B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. FEBS letters, v. 580, p. 1023-1035, 2006.

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.

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.

Bonato, P.; Batista, M.B.; Camilios-Neto, D.; Pankievicz, V.C.S.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Monteiro, R.A.; Pedrosa, F.O.; Souza, E.M.; Chubatsu, L.S.; Wassem, R.; Rigo, L.U. RNA-seq analyses reveal insights into the function of respiratory nitrate reductase of the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. Environmental Microbiology, 18(8), p. 2677-2688, 2016.

Bonato, P. Genes do metabolismo de Nitrato em *Herbaspirillum seropedicae*: regulação transcricional e análise funcional. Curitiba: UFPR, 2013, 102 p. (Dissertação de Mestrado).

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

Brudal, E.; Winther-Larsen, H.C.; Colquhoun, D.J.; Duodu, S. Evaluation of reference genes for reverse transcription quantitative PCR analyses of fish-pathogenic *Francisella* strains exposed to different growth conditions. *BMC Research Notes*, v. 6(76), p. 1-8, 2013.

Brusamarello-Santos, L.C.C.; Pacheco, F.; Aljanabi, S.M.M.; Monteiro, R.A.; Cruz, L.M.; Baura, V.A.; Pedrosa, F.O.; de Souza, E.M.; Wassem, R. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, v. 356, p. 113-125, 2012.

Burd, G.I.; Dixon, D.G.; Glick, B. R.; Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 46(3), p. 237-45, 2000.

Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, p. 25, p. 169-193, 2000.

Bustin, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR RT-PCR: trends and problems, *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, p. 23-29, 2002.

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.; Wittwe, K.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, p. 611-622, 2009.

Cai, H.; Clarke, S. A novel methyltransferase catalyzes the esterification of trans-aconitate in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 13470-13479, 1999.

Canuto, E.L. Seleção de bactérias diazotróficas endofíticas para uso com insumo biológico em plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes. *Seropédica: UFRRJ*, 2003, 72 p (Dissertação de Mestrado).

Carpinelli, J.; Krämer, R.; Agosin, E. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for trehalose overproduction: role of the TreYZ trehalose biosynthetic pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 1949-1955, 2006.

Carvalho, A.L.; Cardoso, F.S.; Bohn, A.; Neves, A.R.; Santos, H. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, p.77, p. 4189-4199, 2011.

Carvalho, D.M.; de Sá, P.H.; Castro, T.L.; Carvalho, R.D.; Pinto, A.; Rocha, D.J.P.G.; Bagano, P.; Bastos, B.; Costa, L.F.; Meyer, R.; Silva, A.; Azevedo, V.; Ramos, R.T.; Pacheco, L.G. Reference genes for RT-qPCR studies in *Corynebacterium pseudotuberculosis* identified through analysis of RNA-seq data. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 106(4), p. 605-614, 2014.

Chen, P.T.; Chiang, C.J.; Chen, Y.T.; Lin, H.C.; Liu, C.H.; Chao, Y.P.; Shaw, J.F. Strategy for stable and highlevel expression of recombinant trehalose synthase in



- Escherichia coli*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, p. 6063-6068, 2012.
- Chen, W-M.; Prell, J.; James, E.K.; Sheu, D.S.; Sheu, S.Y. Effect of phosphoglycerate mutase and fructose 1,6-bisphosphatase deficiency on symbiotic *Burkholderia phymatum*. Microbiology, v. 158, p. 1127-1136, 2012.
- Clegg, S.J. (2006). Role of the *Escherichia coli* nitrate transport protein, NarU, in survival during severe nutrient starvation and slow growth. Microbiology 152, 2091–2100.
- Cline, K.; McCaffery, M. Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery. The EMBO Journal, v. 26 (13), p. 3039-3049, 2007.
- Coil, D.A.; Anné, J. The role of fimV and the importance of its tandem repeat copy number in twitching motility, pigment production, and morphology in *Legionella pneumophila*. Archives of Microbiology, v. 192: 625, 2010.
- Colombo, R.; Lanças, F.M.; Yariwake, J.H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. Journal of Chromatography, v. 1103, p. 118-124, 2006.
- CONAB: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2012/13: Quarto levantamento, 2013.
- Conesa, A.; Götz, S.; García-Gómez, J. M.; Terol, J.; Talón, M.; Robles, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics, v. 21, n. 18, p. 3674-3676, 2005.
- Cordeiro, F.A.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Huergo, L.F.; Pedrosa, F.O.; Monteiro, R.A.; Souza E.M. Proteomic Analysis of *Herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. Journal Proteome Research, v. 12, p. 1142-1150, 2013.
- Costerton, J.W.; Lawandowski, Z.; Caldwell, D.E.; Korber, D.R.; Lappin-Scott, H.M. Microbial Biofilms. Annual Review of Microbiology, v. 49, p. 711- 745, 1995.
- Coutard, F.; Lozach, S.; Pommepuy, M.; Hervio-Heath, D. Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability. Applied and Environmental Microbiology, v. 73(16), p. 5183-9. 2007.
- Coutinho, I.D.; Baker, J.M.; Ward, J.L.; Beale, M.H.; Creste, S.; Cavalheiro, A.J. Metabolite profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (Just Accepted Manuscript), p. 1-46, 2016.
- Cowles, K.N.; Gitai, Z. Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Microbiology, v. 76, p. 1411-1426, 2010.
- Crane, J.K.; Broome, J.E. e Lis, A. Biological Activities of Uric Acid in Infection Due to Enteropathogenic and Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. Infect. Immun., v. 84, no. 4, p. 976-988, 2016.

Croes, C.L., Moens, S., Van Bastelaere, E., Vanderleyden, J.; Michiels, K. W. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *Journal of General Microbiology*, 139, 2261-2269, 1993.

Cunningham, L.; Gruer, M.J.; Guest, J.R. Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology*, v. 143, p. 3795-3805, 1997.

Da Silva, J.F. Papel dos genes de biossíntese (*otsA*) e degradação (*treA*) de trealose na resistência da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* a estresses ambientais e na sua interação com plantas de *Arabidopsis thaliana*. Campos dos Goytacazes: UENF, 2014, 79 p. (Tese de Doutorado).

Davidson, A.L.; Chen, J. ATP-Binding Cassette Transporters in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, v. 73, p. 241-68, 2004.

De Souza, R.S.C.; Okura, V.K.; Armanhi, J.S.L.; Jorrín, B.; Lozano, N.; da Silva, M.J.; González-Guerrero, M.; de Araújo, L.M.; Verza, N.C.; Bagheri, H.C.; Imperial, J.; Arruda, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*, v 6:28774, p. 1-15, 2016.

Dheda, K.; Huggett, J.; Bustin, S. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in realtime PCR. *Biotechniques*, v. 37, p. 112-119, 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.

Ding, L.; Yokota, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial isolates isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p. 2223-2230, 2004.

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.

Dobritsa, A.P.; Reddy, M.C.S.; Samadpour, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p. 1418-1426, 2010.

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.

- Drobak, B.K. The plant phosphoinositide system. *Biochemical Journal*, v. 288, p. 697-712, 1992.
- Drogue, B.; Sanguin, H.; Borland, S.; Prigent-Combaret, C.; Wisniewski-Dye, F. Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 87, p. 543-555, 2014.
- Duarte-Almeida, J.M.; Negri, G.; Salatino, A. Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1165-71, 2007.
- Elbein, A.D.; Pan, Y.; Pastuszak, I.; Carroll, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, v. 13 (4), p. 17R-27R, 2003.
- Erhardt, H.; Steimle, S.; Muders, V.; Pohl, T.; Walter, J.; Friedrich, T. Disruption of individual nuo-genes leads to the formation of partially assembled NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1817, p. 863-871, 2012.
- Essex-Lopresti, A.E.; Boddey, J.A.; Thomas, R.; Smith, M.P.; Hartley, M.G.; Atkins, T.; Brown, N.F.; Tsang, C.H.; Peak, I.R.A.; Hill, J.; Beacham, I.R.; Titball, R.W. A Type IV Pilin, PilA, Contributes to Adherence of *Burkholderia pseudomallei* and Virulence In Vivo. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 2p, p. 1260-1264, 2005.
- Fan, B.; Carvalhais, L.C.; Becker, A.; Fedoseyenko, D.; Von Wirén, N. e Borriss, R. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*, 12: 116, 2012.
- Faria, R.S. de C.A. Análise in vitro da expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo e osmótico da bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, 2016, 57 p. (Dissertação de Mestrado).
- Ferrari, C.S.; Amaral, F.P.; Bueno, J.C.; Scariot, M.C.; Valentim-Neto, P.A.; Arisi, A.C. Expressed proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in maize (DKB240) roots-bacteria interaction revealed using proteomics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 74(6), p. 2267-77, 2014.
- Ferreira, J.S.; Baldani, J.I.; Baldani, V.L.D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.
- Ferreira, J.S.; Guimarães, S.L.; Baldani, V.L.D. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v. 7, n. 13, 2011.
- Filloux, A. The type VI secretion system: a tubular story. *The EMBO Journal*, v. 28, p. 309-310, 2009. Filloux, A.; Hachani, A.; Bleves, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, v. 154, p. 1570-1583, 2008.
- Finan, T.M.; Wood, J.M.; Jordan, D.C. Symbiotic Properties of C4-Dicarboxylic Acid Transport Mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Bacteriology*, v. 154, 1403-1413, 1983.

- Florindo, C.; Ferreira, R.; Borges, V.; Spellerberg, B.; Gomes, J.P.; Borrego, M.J. Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 90(3), p. 220-7, 2012.
- Freeman, B.C.; Chen, C.; Beattie, G.A. Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. *Environmental Microbiology*, v. 12, p. 1486-1497, 2010.
- Fronzes, R.; Remaut, H.; Waksman, G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *The EMBO Journal*, v. 27, p. 2271-2280, 2008.
- Führer, F.; Langklotz, S.; Narberhaus, F. The C-terminal end of LpxC is required for degradation by the FtsH protease. *Molecular Microbiology*, v. 59, p. 1025-1036, 2006.
- Gachon, C.; Mingam, A.; Charrier, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, v. 55, p. 1445-1454, 2004.
- 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.
- Galli, F.; Carvalho, P.C.T.; Tokeshi, H.; Balmer, F.; Kimati, H.; Cardoso, C.O.; Salgado, C.L.; Krugner, T.L.; Cardoso, E.J.B.N.; Bergamin, F.A. (1980) Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. Agronômica Ceres, São Paulo.
- Galperin, M. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology*, v. 6, p. 552-567, 2005.
- Gomes, D.F.; Batista, J.S.S.; Schiavon, A.L.; Andrade, D.S.; Hungria, M. Proteomic profiling of *Rhizobium tropici* PRF 81: identification of conserved and specific responses to heat stress. *BMC Microbiology*, v. 12:84, p. 1-12, 2012.
- González, P.J.; Correia, C.; Moura, I.; Brondino, C.D.; Moura, J.J.G. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *J. Inorg. Biochem.* 100, p. 1015-1023, 2006.
- Gottig, N.; Garavaglia, B.S.; Garofalo, C.G.; Orellano, E.G.; Ottado J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PloS ONE*, v. 4 (2), p. e4358, 2009.
- Greene, R.C. Biosynthesis of Methionine. In: Neidhart, F.C. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, p. 542-560, 1997.
- 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.

Guimarães, S.L.; Baldani, V.L.D.; Jacob-Neto, J. Influência da adubação nitrogenada e do pH da rizosfera sobre a população de bactérias diazotróficas em plantas de arroz. *Enciclopédia Biosfera*, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

Guimarães, S.L.; Baldani, J.I.; Baldani, V.L.D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. *Agronomia*, v.37, p.25-30, 2003.

Harper, J.E. Nitrogen metabolism. In: Boote, K.J., Bennett, J.M., Sinclair, T.R. *Physiology and determination of crop yield*. Madison: ASA/CSSA/SSSA, Chapt.11A. p. 285-302, 1994.

Haslam, R.P.; Downie, A.L.; Raveton, M.; Gallardo, K.; Job, D.; Pallett, K.E.; 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.

Hauberg, L.; Schmidt, F.; Scharf, C.; Dörr, J.; Völker, U.; Reinhold-Hurek, B. Proteomic characterization of a *pilR* regulatory mutant of *Azoarcus* sp. strain BH72 with the aid of gel-based and gel-free approaches. *Proteomics*, v. 10, p. 458-469, 2010.

Hecht-Buchholz, C. The apoplast-habitat of endophytic dinitrogen-fixing bacteria and their significance for the nitrogen nutrition of nonleguminous plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 161: 509–520, 1998.

Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of realtime quantitative PCR data. *Genome Biology*, v. 8, edição 2, artigo R19, p. 1-14, 2007.

Hellweg, C.; Pühler, A.; Weidner, S. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiology*, v. 9:37, 2009.

Herridge, D.F.; Peoples, M.B. Boddey, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, v. 311, p. 1-18. 2008.

Hood, R.D.; Singh, P.; Hsu, F.; Guvener, T.; Carl, M.A.; Trinidad, R.R.S.; Silverman, J.M.; Ohlson, B.B.; Hicks, K.G.; Plemel, R.L.; Li, M.; Schwarz, S.; Wang, W.Y.; Merz, A.J.; Goodlett, D.R.; Mougous, J.D. "A Type VI Secretion System of *Pseudomonas Aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria." *Cell Host & Microbe*, v. 7 (1), p. 25-37, 2010.

Hu, Y.; Ribbe, M.W. Biosynthesis of the Metalloclusters of Nitrogenases. *Annual Review of Biochemistry*, v. 85, p. 455-83, 2016.

Huang, X.; Holden, H. M.; Raushel, F.M. Channelling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry*, v. 70, p. 149-180, 2001.

Hueck, C. J.; Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v, 62 (2), p. 379-433, 1998.

Hungria, M.; Campo, R.J.; Mendes, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja. Documentos - 283, 80 p. 2007.

- Iguchi, H.; Yurimoto, H.; Sakai, Y. Stimulation of methanotrophic growth in co-cultures by cobalamin excreted by rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 8509-8515, 2011.
- Im, W.; Bae, H.; Yokota, A.; LEE, S.T. *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p. 851-855, 2004.
- Iniguez, A. L.; Dong, Y.; Carter, H. D.; Ahmer, B. M. M.; Stone, J. M.; Triplett, E. W. Regulation of interic endophytic bacterial by plant defences. *The American Phytopathological Society*, v. 18, p. 169-178, 2005.
- Jacob, T.R.; Laia, M.L.; Ferro, J.A.; Ferro, M.I. 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.
- Jain, V.; Gupta, K. The flavonoid naringenin enhances intercellular colonization of rice roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Biology and Fertility of Soils*, v. 38 (2), p. 119-123, 2003.
- James, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, v. 65, p. 197-209, 2000.
- James, E.K., Olivares, F.L., Baldani, J.I. Dobereiner, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, v. 48, n. 308, p. 785-797, 1997.
- Janausch, I.G.; Zientz, E.; Tran, Q.H.; Kroger, A.; Unden, G. C4- dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1553, p. 39-56, 2002.
- Jani, A.J.; Cotter, P.A. Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe*, v. 8, p. 2-6, 2010.
- Jia, W.; Cole, J.A. Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, p. 159-161, 2005.
- Jia, W.; Tovell, N.; Clegg, S.; Trimmer, M.; Cole, J. A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. *Biochem. J.* 417, 297, 2009.
- Johnson, E., Cascio, D.; Sawaya, M.R.; Gingery, M.; Schröder, I. Crystal structures of a tetrahedral open pore ferritin from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Structure*, v. 13(4), p. 637-48, 2005.
- Johnson, M.D.; Garrett, C.K.; Bond, J.E.; Coggan, K.A.; Wolfgang, M.C.; Redinbo, M.R. *Pseudomonas aeruginosa* PilY1 binds integrin in an RGD- and calcium-dependent manner. *PloS one*, v. 6, p. e29629, 2011.
- Jones, C.A.; Carballido-López, R.; Errington, J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, v. 104, p. 913-922, 2001.

- Joshi, M.V.; Mann, S.G.; Antelmann, H.; Widdick, D.A.; Fyans, J.K.; Chandra, G.; Hutchings, M.I.; Toth, I.; Hecker, M.; Loria, R.; Palmer, T. The twin arginine protein transport pathway exports multiple virulence proteins in the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Molecular Microbiology*, v. 77, p. 252-271, 2010.
- Jung, S.Y.; Lee, M.H.; Oh, T.K.; Yoon, J.H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 2284-2288, 2007.
- Kadouri, D.; Burdman, S.; Jurkevitch, E.; Okon, Y. Identification and isolation of genes involved in poly-( $\beta$ -hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2943-2949, 2002.
- Kadouri, D.; Jurkevitch, E.; Okon, Y. Involvement of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3244-3250, 2003b.
- Kadowak, M.A.S.; Müller-Santos, M.; Rego, F.G.M.; Souza, E.M.; Yates, M.G.; Monteiro, R.A.; Pedrosa, F.O.; Chubatsu, L.S.; Steffens, M.B.R. Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. *BMC Microbiology*, v. 11, p. 230, 2011.
- Kang, Y.; Liu, H.; Genin, S.; Schell, M. A.; Denny, T. P. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology*, v. 46, p. 427-437, 2002.
- Karge, W.H.; Schaefer, E.J.; Ordovas, J.M. Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a non radioactive detection method. *Methods in Molecular Biology*, v. 110, p. 43-61, 1998.
- Kemner, J.M.; Xiaoyou, L.; Nester, E.W. The *Agrobacterium tumefaciens* Virulence Gene *chvE* Is Part of a Putative ABC-Type Sugar Transport Operon. *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 7, p. 2452-2458, 1997.
- Kennedy, I.R.; Choudhury, A.T.M.A.; Kecskés, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology & Biochemistry*, v. 36, p. 1229-1244, 2004.
- Khan, A.; Sarkar, D. Nitrate reduction pathways in mycobacteria and their implications during latency. *Microbiology* 158, p. 301-307, 2012.
- Kirchberg, J.; Buttner, D.; Thiemer, B.; Sawers, R.G. Aconitase B Is Required for Optimal Growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Pepper Plants. *PLoS ONE*, v. 7(4), p. e34941, 2012.
- Kirchhof, G.; Eckert, B.; Stoffel, M.; Baldani, J.I.; REIS, V.M.; Hartman, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 157-168, 2001.

Kirk, D.G.; Palonen, E.; Korkeala, H.; Lindstrom, M. Evaluation of normalization reference genes for RT-qPCR analysis of *spo0A* and four sporulation sigma factor genes in *Clostridium botulinum* Group I strain ATCC 3502. *Anaerobe*, v. 26, p. 14-19, 2014.

Kloepper, J.W. e Schroth, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, vol 2. Station de Pathologie Vegetale et de Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, pp 879-882, 1978.

Kornberg, H.; Lourenco, C. A route for fructose utilization by *Escherichia coli* involving the fucose regulon. *PNAS*, v. 103, n. 51, p. 19496-19499, 2006.

Kozera, B.; Rapacz, M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, v. 54 (4), p. 391-406, 2013.

Krehenbrink, M. e Downie, J.A. Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *BMC Genomics*, v. 9 (55), p. 1-19, 2008.

Kuss, A. V.; Kuss, V. V.; Lovato, T.; Flôres, M. L.; Fixação de Nitrogênio e Produção de Ácido Indolacético in vitro por Bactérias Diazotróficas Endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

Lehninger, N.D.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

Lee, A.; Mao, W.; Warren, M.S.; Mistry, A.; Hoshino, K.; Okumura, R.; Ishida, H.; Lomovskaya, O. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J Bacteriol.*, v. 182, p. 3142-3150, 2000.

Li, C-T.; Liao, C-T.; Du, S-C.; Hsiao, Y-P.; Lo, H-H.; Hsiao, Y-M. Functional characterization and transcriptional analysis of *galE* gene encoding a UDP-galactose 4-epimerase in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Microbiological Research*, v. 169, p. 441-452, 2014.

Li, K.; Xu, C.; Jin, Y.; Sun, Z.; Liu, C.; Shi, J.; Chen, G.; Chen, R.; Jin, S.; Wu, W. SuhB Is a Regulator of Multiple Virulence Genes and Essential for Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, v. 4, n. 6, p. e00419-13, 2013.

Li, Y.; Tian, C.F.; Chen, W.F.; Wang, L.; Sui, X.H.; Chen, W.X. High-Resolution Transcriptomic Analyses of *Sinorhizobium* sp. NGR234 Bacteroids in Determinate Nodules of *Vigna unguiculata* and Indeterminate Nodules of *Leucaena leucocephala*. *PLoS ONE*, v. 8(8), p. e70531, 2013.

Lima, U.A.; Basso, L.C.; Amorim, H.V. Produção de etanol. In: Aquarone E, Lima UA, Borzani W, Schmidell W. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, cap. 1, 2001. (Série Biotecnologia Industrial).

Lioliou, E.E.; Kyriakidis, D.A. Polyamine biosynthesis regulation and metabolic control of a two-component signal transduction system. PhD Thesis Aristotle University of Thessaloniki, Chemistry Department; 2003.

Liu, C-W.; Murray, J.D. The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. *Mathesius U*, ed. *Plants*, v. 5(3):33, 2016.



- Liu, J.; Tan, Y.; Yang, X.; Chen, X.; Li, F. Evaluation of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 reference genes in gene expression studies by qRT-PCR. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116(4), p. 460-464, 2013.
- Lloyd, S.J.; Lauble, H.; Prasad, G.S.; Stout, C.D. The mechanism of aconitase: 1.8 Å resolution crystal structure of the S642a: citrate complex. *Protein Science*, v. 8(12), p. 2655-2662, 1999.
- Lu, Y.; Yuan, M.; Gao, X.; Kang, T.; Zhan, S.; Wan, H.; Li, J. Identification and Validation of Reference Genes for Gene Expression Analysis Using Quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS One*, v. 8(7), p. e68059, 2013.
- 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(12), p. e0144362, 2015.
- Malavolta, E.; Moraes, M.F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas. In: Yamada, Tsuioshi et al. Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira. Piracicaba: IPNI Brasil, 2007.
- Manson, M.D.; Armitage, J.P.; Hoch, J.A.; Macnab, R.M. Bacterial Locomotion and Signal Transduction. *Journal of Bacteriology*, v. 180, n. 5, p. 1009-1022, 1998.
- Mathioni, S.M.; Beló, A.; Rizzo, C.J.; Dean, R.A.; Donofrio, N.M. Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and in vitro stresses. *BMC Genomics*, v. 12, p. 1-20, 2011.
- 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.
- 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.
- McNally, D.J.; Wurms, K.V.; Labbé, C.; Belanger, R.R. Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 63, p. 293-303, 2003.
- Meade, G.P.; Chen, C.P. *Cane Sugar Handbook*. John Wiley and Sons. p. 23-24, 1977.
- Metcalf, D.; Sharif, S.; Weese, J.S. Evaluation of candidate reference genes in *Clostridium difficile* for gene expression normalization. *Anaerobe*, v. 16(4), p. 439-443, 2010.
- Metzger, M.; Bellemann, P.; Bugert, P.; Geider, K. Genetics of galactose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on polysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen. *Journal of Bacteriology*, v. 176, p. 450-9, 1994.
- Mierziak, J.; Kostyn, K.; Kulma, A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, v. 19, p. 16240-16265, 2014.
- Monteiro, R. A.; Cruz, L. M.; Wassem, R.; Muller, M.; Cardoso, R.; Pedrosa, F.O.; Chubatsu, L.S.; James, E.K.; Souza, E.M. Comparative Genomics of *Herbaspirillum*

Species. In: Plasticity in Plant-Growth and Phytopathogenic Bacteria. Springer, p. 171-198, 2014.

Monteiro, R.A.; Balsanelli, E.; Tuleski, T.; Faoro, H.; Cruz, L.M.; Wassem, R.; de Baura, V.A.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Weiss, V.; da Rocha, W.D.; Muller-Santos, M.; Chubatsu, L.S.; Huergo, L.F.; Pedrosa, F.O.; de Souza, E.M. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. FEMS Microbiol Ecology, v. 80, p. 441-451, 2012.

Moreira, F.M.S. e Siqueira, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA, 2006. 279 p.

Moreira, F.M.S.; Silva, K.; Nóbrega, R.S.A.; Carvalho, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. Comunicata Scientiae, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

Mougous, J.D.; Cuff, M.E.; Raunser, S.; Shen, A.; Zhou, M.; Gifford, C.A.; Goodman, A.L.; Joachimiak, G.; Ordoñez, C.L.; Lory, S.; Walz, T.; Joachimiak, A.; Mekalanos, J.J. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. Science, v. 312, p 1526-1530, 2006.

Neilands, J.B. Microbial iron compounds. Ann. Rev. Biochem, v. 50, p. 715-751, 1981.

Nieto, P.A.; Covarrubias, P.C.; Jedlicki, E.; Holmes, D.S.; Quatrini, R. Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. BMC Molecular Biology, v. 25(10):63, 2009.

Nogueira, E.M.; Vinagre, F.; Masuda, H.P.; Vargas, C.; de Pádua, V.L.M.; da Silva, F.R.; dos Santos R.V.; Baldani J.I.; Ferreira, P.C.G.; Hemerly, A.S. Expression of sugar cane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubridubalbicans*. Genetic and Molecular Biology, v. 24, p. 199-206, 2001.

Ogura, T.; Inoue, K.; Tatsuta, T.; Suzaki, T.; Karata, K.; Young, K.; Su, L.H.; Fierke, C.A.; Jackman, J.E.; Raetz, C.R.; Coleman, J.; Tomoyasu, T.; Matsuzawa, H. Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology, v. 31, p. 833-844, 1999.

Olivares, F.L.; Baldani, V.L.D.; Reis, V.M.; Baldani, J.I.; Döbereiner, J. Occurrence of endophytic diazotrophic *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. Biology and Fertility of Soils, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

Olivares, F.L.; James, E.K.; Baldani, J.I.; Döbereiner, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. New Phytologist, v. 135, p. 723-737, 1997.

Oliveira, A.L.M.; Canuto, E.L.; Reis, V.M.; Baldani, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, v. 34, p. 59-61, 2003.

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. 230-32, 2006.

Oliveira, A.L.M.; Urquiaga, S.; Döbereiner, J.; Baldani, J.I. 2002. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, v. 242, p. 205-215, 2002.

Oshima, T.; Aiba, H.; Masuda, Y.; Kanaya, S.; Sugiura, M.; Wanner, B.L.; Mori, H.; Mizuno, T. Transcriptome analysis of all two component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, v. 46, p. 281-291, 2002.

Palit, S.; Sharma, A.; Talukder, G. Effects of cobalt on plants. *Botanical Review*, v. 60(2), p. 149-181, 1994.

Palma, M.; DeLuca D, Worgall S, Quadri LE. Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*, v. 186, p. 248-252, 2004.

Pankiewicz, V.C.S.; Camilios-Neto, D.; Bonato, P.; Balsanelli, E.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Faoro, H.; Chubatsu, L.S.; Donatti, L.; Wajnberg, G.; Passetti, F.; Monteiro, R.A.; Pedrosa, F.O.; Souza, E.M. RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant Molecular Biology*, v. 90, p. 589-603, 2016.

Pedrosa, F.O.; Monteiro, R.A., Wassem, R.; Cruz, L.M.; Ayub, R.A.; Colauto, N.B.; Fernandez, M.A.; Fungaro, M.H.P.; Grisard, E.C.; Hungria, M.; Madeira, H.M.F.; Nodari, R.O.; Osaku, C.A.; Petzlerler, M.L.; Terenzio, H.; Vieira, L.G.E.; Steffens, M.B.R.; Weiss, V.A.; Pereira, L.F.P.; Almeida, M.I.M.; Alves, L.A.; Marin, A.M.; Araujo, L.M.; Balsanelli, E.; Baura, V.A.; Chubatsu, L.; Faoro, H.; Favetti, A.; Friedermann, G.; Glienke, C.; Karp, S.; Kava-Cordeiro, V.; Raittz, R.T.; Ramos, H.J.A.; Ribeiro, E.M.S.F.; Rigo, L.U.; Rocha, S.N., Schwab, S.; Silva, S.G.; Souza, E.M.; Tadra-Sfeir, M.Z.; Torres, R. A.; Dabul, A.N.G.; Soares, M.A.M.; Gasques, L. S.; Gimenes, C.C.T.; Valle, J.; Ciferri, R.R.; Correa, L.C.; Murace, N.K.; Pamphile, J.A.; Patussi, E.V.; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.; Rocha, C.L.M.S.C.; Arantes, O.M.N.; Furlaneto, M.C.; Godoy, L.P.; Oliveira, C.E.C.; Satori, D.; Vilas-Boas, L.A.; Watanabe, M.A.E.; Dambros, B.P.; Guerra, M.P.; Mathioni, S.M.; Santos, K.L.; Steindel, M.; Vernal, J.; Barcellos, F.G.; Campo, R.J.; Chueir, L.M.O.; Nicolás, M.F.; Pereira-Ferrari, L.; Silva, J.L.C.; Gioppo, N.M.R.; Margarido, V.P.; Menck-Soares, M.A.; Pinto, F.G.S.; Simão, R.C.G.; Takahashi, E.K.; Yates, M.G.; Souza, E.M. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet*, v. 7, p.e 1002064, 2011.

Pereira, W.; Leite, J.M.; Hipólito, G.S.; Santos, C.L.R.; Reis, V.M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Revista Ciência Agronômica*, v. 44, p. 363-370, 2013.

Pérez-Montaño, F.; Cerro, P.D.; Jiménez-Guerrero, I.; López-Baena, F.J.; Cubo, M.T.; Hungria, M.; Megías, M.; Ollero, F.J. RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics*, v. 17:198, p. 1-11, 2016.

- Pessoa, D.V.; Vidal, M.S.; Baldani, J.I.; Simões-Araujo, J.L. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 127, p. 193-196, 2016.
- Petruzzello, S. Caracterização in silico, clonagem, superexpressão e purificação da proteína trealose-6-fosfato fosfatase de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba: UFPR, 2009, 79 p. (Monografia).
- Piazza, A.; Zimaro, T.; Garavaglia, B.S.; Ficarra, F.A.; Thomas, L.; Maronedze, C.; Feil, R.; Lunn, J.E.; Gehring, C.; Ottado, J.; Gottig, N. The dual nature of trehalose in citrus canker disease: a virulence factor for *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and a trigger for plant defence responses. *Journal of experimental botany*, v. 66(9), p. 2795-811, 2015.
- Pimentel, J.P.; Olivares, F.; Pitard, R.M.; Urquiaga, S., Akiba, F. e Dobereiner, J. Dinitrogen fixation and infection of Grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, v. 137, p. 61-65, 1991.
- Polidoro, J.C.; Resende, A.S.; Quesada, D.M.; Xavier, R.P.; Coelho, C.H.M.; Alves, B.J.R.; Boddey, R. M.; Urquiaga, S. Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, p. 8, 2001. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 144).
- Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*, v. 56, p. 20-51, 2005.
- Porto, L. A. C. Protocolo das aulas práticas. Universidade Católica de Goiás, departamento de Biologia, 2010.
- Poueymiro, M.; Cazalé, A.C.; François, J.M.; Parrou, J.L.; Peeters, N.; Genin, S.A. *Ralstonia solanacearum* type III effector directs the production of the plant signal metabolite trehalose-6-phosphate. *MBio*, v. 5, ed. 6, e02065-14, p. 1-9, 2014.
- Pukatzki, S.; Ma, A.T.; Sturtevant, D.; Krastins, B.; Sarracino, D.; Nelson, W.C.; Heidelberg, J.F.; Mekalanos, J.J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *PNAS*, v. 103, p. 1528-1533, 2006.
- Pukatzki, S.; McAuley, S.B.; Miyata, S.T. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, p. 11-17, 2009.
- Raboni, S.; Betani, S.; Mozzarelli, A. Tryptophan synthase: a mini for enzymologists. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, p. 2391-2403, 2009.
- Radwan, T.S.D.; Mohamed, Z.K.; Reis, V.M. Production of indole-3-Acetic by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis*, v. 32, p. 39-54, 2002.
- Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14(4), p. 435-43, 2011.
- 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.; Oliveira, A.L.M.; Baldani, V.L.D.; Olivares, F.L.; Baldani, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Fernandes, M. Silvestre. Nutrição Mineral de Plantas. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

Reis, V.M.; Pereira, W.; Hipólito, G.S. Métodos de inoculação de bactérias diazotróficas em cana planta para fins de determinação de eficiência agrônômica. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 4p. 2009. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado técnico, 118).

Remaut, H.; Waksman, G. Structural biology of bacterial pathogenesis. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 14, p. 161-170, 2004.

Ren, G.; Wang, Z.; Li, Y.; Hu, X.; Wang, X. Effects of lipopolysaccharide core sugar deficiency on colanic acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 198, p. 1576-1584, 2016.

Rhie, H.G.; Dennis, D. Role of fadR and atoC (Con) mutations in poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant pha+ *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 2487-2492, 1995.

Richardson, D.J.; Berks, B.C.; Russell, D.A.; Spiro, S.; Taylor, C.J. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58, 165-178, 2001.

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.

Rodrigues Neto, J.; Malavolta Júnior, V.A.; Victor, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* TIPO B. *Suma Phytopathologica*, v. 12, p. 16, 1986.

Roine, E.; Raineri, D. M.; Romantschuk, M.; Wilson, M.; Nunn, D. N. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, v. 11, p. 1048-1056, 1998.

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

Romeiro, R. S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Roteiro das aulas práticas. 2001.

Roncato-Maccari, L.D.B.; Ramos, H.J.O.; Pedrosa, F.O.; Alquini, Y.; Chubatsu, L.S.; Yates, M.G.; Rigo, L.U.; Steffens, M.B.; Souza, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology ecology*, v. 45, p. 37-47, 2003.

Rosales-Reyes, R.; Saldías, M.S.; Aubert, D.F.; El-Halfawy, O.M.; Valvano, M.A. The *suhB* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for protein secretion, biofilm formation, motility and polymyxin B resistance. *Microbiology*, v. 158, p. 2315-2324, 2012.

Rose, I.A. Isotopic strategies for the study of enzymes. *Protein Science*, v. 4, p. 1430-1433, 1995.

- Rosenblueth, M.; Martínez-Romero, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, p. 827-837, 2006.
- Rothballer, M.; Eckert, B.; Schmid, M.; Fekete, A.; Schloter, M.; Lehner, A.; Pollmann, S.; Hartmann, A. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 66, p. 85-95, 2008.
- Rothballer, M.; Schmid, M.; Klein, I.; Gattinger, A.; Grundmann, S. e Hartmann, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, p. 1341-1348, 2006.
- Russell, A.B.; Peterson, S.B.; Mougous, J.D. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, p. 137-148, 2014.
- Rutherford, K.; Parkhill, J.; Crook, J.; Horsnell, T.; Rice, P. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, v.16, n.10, p. 944-945, 2000.
- 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.
- Rychlik, W. OLIGO 7 Primer Analysis Software, in *Methods in Molecular Biology Vol. 402: PCR Primer Design*; Ed. A. Yuryev; Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 35-59, 2007.
- Salvato, F.; Carvalho, M.C.C.G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Ciência Rural*, v. 40, p. 727-734, 2010.
- Schmidt, M.A.; Balsanelli, E.; Faoro, H.; Cruz, L.M.; Wasseem, R.; Baura, V.A.; Weiss, V.; Yates, M.G.; Madeira, H.M.F.; Ferrari, L.P.; Fungaro, M.H.P.; Paula, F.M.; Pereira, L.F.P.; Vieira, L.G.E.; Olivares, F.L.; Pedrosa, F.O.; Souza, E.M.; Monteiro, R.A. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. *BMC Microbiology*, v. 12:98, p. 1-13, 2012.
- Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3, p. 1101-1108, 2008.
- Schultz, N.; Morais, R.F.; Silva, J.A.; Baptista, R.B.; Oliveira, R.P.; Leite, J.M.; Pereira, W.; Carneiro Jr, J.B.; Alves, B.J.R.; Baldani, J.I.; Boddey, R.M.; Urquiaga, S.; Reis, V.M. Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 2, p. 261-268, 2012.
- Schultz, N.; Pereira, W.; Reis, V.M.; Urquiaga, S.U. Produtividade e diluição isotópica de <sup>15</sup>N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 51, n. 9, p.1594-1601, 2016.
- Semmler, A.B.; Whitchurch, C.B.; Leech, A.J.; Mattick, J.S. Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, v. 146, p. 1321-1332, 2000.

Sharma, A.; Johri, B.N. Growth promoting influence of siderophore producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological Research*, v. 158, p. 243-248, 2003.

SigmaPlot. For windows, version 11.0. Systat Software, 2008.

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.

Silva, P.R.A. O líquido apoplástico de cana-de-açúcar modula o perfil transcriptômico global da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica* in vitro. *Seropédica: UFRRJ*, 2016, 165 p. (Tese de doutorado).

Silva, P.R.A.; Vidal, M.V.; Soares, C.P.; Polese, V.; Simões-Araujo, J.L.; Baldani, J.I. Selection and evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies on *Burkholderia tropica* strain Ppe8, a sugarcane-associated diazotrophic bacterium grown with different carbon sources or sugarcane juice. *Antonie van Leeuwenhoek*, p. 1-12, 2016.

Simm, R.; Fetherston, J.; Kader, A.; Romling, U.; Perry R. Phenotypic Convergence Mediated by GGDEF-Domain-Containing Proteins. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 6816-6823, 2005.

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.

Smith, J.L. The Physiological Role of Ferritin-Like Compounds in Bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 30, p. 173-185, 2004.

Sobral, J.K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e o estudo da interação endofitos-planta. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, 2003. 174 p. (Tese de doutorado).

Soemphol, W.; Deeraksa, A.; Matsutani, M.; Yakushi, T.; Toyama, H.; Adachi, O.; Yamada, M.; Matsushita, K. Global analysis of the genes involved in the thermotolerance mechanism of thermotolerant *Acetobacter tropicalis* SKU1100. *Biosci Biotechnol Biochem.*, v. 75, p. 1921-1928, 2011.

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

Sourjik, V. Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. *Trends Microbiology*, v. 12, p. 569-576, 2004.

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

Spaepen, S.; Vanderleyden, J. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 3, p. a001438, 2011.

Stenico, V.; Baffoni, L.; Gaggia, F.; Biavati, B. Validation of candidate reference genes in *Bifidobacterium adolescentes* for gene expression normalization. *Anaerobe*, v. 27, p. 4-39, 2014.

Sumby, K.M.; Grbin, P.R.; Jiranek, V. Validation of the use of multiple internal control genes, and the application of realtime quantitative PCR, to study esterase gene expression in *Oenococcus oeni*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 96(4), p. 1039-1047, 2012.

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.

Tadra-Sfeir, M.Z. Caracterização funcional de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina. Curitiba: UFPR, 2011, 127 p. (Tese de Doutorado).

Tadra-Sfeir, M.Z., Souza, E.M., Faoro, H., Müller-Santos, M., Baura, V.A., Wassem, R.; Cruz, L.M.; Pedrosa, F.O.; Souza, E.M.; Monteiro, R.A. Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 2180-2183, 2011.

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.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, n. 491, p. 1-8, 2015.

Taga, M.E.; Walker, G.C. *Sinorhizobium meliloti* requires a cobalamin dependent ribonucleotide reductase for symbiosis with its plant host. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, v. 23, p. 1643-1654, 2010.

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

Takeshima, K.; Hidaka, T.; Wei, M.; Yokoyama, T.; Minamisawa, K.; Mitsui, H.; Itakura, M.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Saeki, K.; Oomori, H.; Tajima, S.; Uchiumi, T.; Abe, M.; Tokuji, Y.; Ohwada, T. Involvement of a novel genistein-inducible multidrug efflux pump of *Bradyrhizobium japonicum* early in the interaction with *Glycine max* (L.) Merr. *Microbes Environ.*, v. 28, p. 414-421, 2013.

Taylor, S.C.; Mrkusich, E.M. The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 46-52, 2014.

Tejera, N.; Ortega, E.; Robes, R.; Llunch, 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.



Tseng, T-T.; Tyler, B.M.; Setubal, J.C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*, 9 (Suppl 1):S2, 2009.

Tuleski, T.R. Envolvimento dos genes de biossíntese de celulose na formação de biofilme pela bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. Curitiba: UFPR, 2013, 100 p. (Dissertação de mestrado).

Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R. & Leunissen, J. A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, v. 35, p. 71-74, 2007.

Urquiaga, S.; Cruz, K.H.S.; 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.; Xavier, R.P.; Morais, R.F.; Batista, R.B.; Schultz, N.; Leite, J.M.; Sá, J. M.; Barbosa, K.P.; Resende, A. S.; Alves, B.J.R.; Boddey, R.M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant and Soil*, v. 356, n. 1, p. 5-21, 2011.

Valverde, A.; Velazquez, E.; Gutierrez, C.; Cervantes, E.; Ventosa, A.; Igual, J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen- fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

Van Puyvelde, S.; Cloots, L.; Engelen, Kristof.; Das, F.; Marchal, K.; Vanderleyden, J.; Spaepen, S. Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. *Microbial Ecology*, v. 61, p. 723-728, 2011.

Van Schaik, E.J.; Giltner, C.L.; Audette, G.F.; Keizer, D.W.; Bautista, D.L.; Slupsky, C.M.; Sykes, B.D.; Irvin, R.T. DNA Binding: a Novel Function of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pili. *Journal Bacteriology*, v. 187(4), p. 1455-1464, 2005.

Vandesompele, J.; Preter, K.D.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Roy, N.V.; Paepe, A.D.; Speleman, F. Accurate normalization of realtime quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, v. 3, p. 1-12, 2002.

Vila, F.C. Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante de cana-de-açúcar. São Paulo: USP, 2006. 68p. (Dissertação de mestrado).

Vilas Boas, S. W.; Dias, E. C. Contribuição para a discussão sobre as políticas no setor sucroalcooleiro e as repercussões sobre a saúde dos trabalhadores. In: PLATAFORMA BNDES. Impactos da indústria canavieira no Brasil. Rio de Janeiro: IBASE, p. 23-35, 2009.

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.

Vu, H.T.; Itoh, H.; Ishii, S.; Senoo, K.; Otsuka, S. Identification and Phylogenetic Characterization of Cobalamin Biosynthetic Genes of *Ensifer adhaerens*. *Microbes and Environments*, v. 28(1), p. 153-155, 2013.

- Wachi, M.; Osaka, K.; Kohama, T.; Sasaki, K.; Ohtsu, I.; Iwai, N.; Takada, A.; Nagai, K. Transcriptional Analysis of the *Escherichia coli mreBCD* Genes Responsible for Morphogenesis and Chromosome Segregation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70 (11), p. 2712-2719, 2006.
- Wai, S.N., Nakayama, K., Umene, K., Moriya, T., and Amako, K. Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: Contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Molecular Microbiology*, v. 20, p. 1127-1134, 1996.
- Walford, S.N. Composition of cane juice. *Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association* v. 70, p. 265-266, 1996.
- Wang, CH., Zhao, TX., Li, M.; Zhang, C.; Xing, X-H. Characterization of a novel *Acinetobacter baumannii* xanthine dehydrogenase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, v. 38, p. 337-344, 2016.
- Wang, X.; Quinn, P.J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*, v. 49, p. 97-107, 2010.
- Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, p. 57-63, 2009.
- Watnick, P.; Kolter, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology*, v. 34(3), p. 586-95, 1999.
- Weber, O.B.; Baldani, J.I.; Dobereiner, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, p. 2277-2285, 2000.
- Weidner, U.; Geier, S.; Ptock, A.; Friedrich, T.; Leif, H.; Weiss, H. The gene locus of the proton translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*: organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of the mitochondrial complex I. *Journal of Molecular Biology*, v. 233, p. 109-122, 1993.
- Williams, C.H.; Stillman, T.J.; Barynin, V.V.; Sedelnikova, S.E.; Tang, Y.; Green, J.; Guest, J.R.; Artymiuk, P.J. *E. coli* aconitase B structure reveals a HEAT-like domain with implication for protein-protein recognition. *Nature Structure Biology*, v. 9, p. 447-452, 2002.
- Yan, H.; Huang, W.; Yan, C.; Gong, X.; Jiang, S.; Zhao, Y.; Wang, J.; Shi, Y. (2013). Structure and Mechanism of a Nitrate Transporter. *Cell Rep.* 3, p. 716-723.
- Yoneyama, T.; Muraoka, T. Kim, T.H.; Dacanay, E.V. & Nakanishi, Y. The natural <sup>15</sup>N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 189, p. 239-244, 1997.
- Zakharova, E.A.; Shcherbakov, A.A.; Brudnik, V.V.; Skripko, N.G.; Bulkhin, N.S.; Ignatov, V.V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. *European Journal of Biochemistry*, v. 259, p. 572-576, 1999.
- Zhao, S.; Fernaldm, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology*, v. 12, p. 1047-1064, 2005.

Zhao, W.; Li, Y.; Gao, P.; Sun, Z.; Sun, T.; Zhang, H. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR studies in gene expression levels of *Lactobacillus casei* Zhang. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38(9), p. 1279-1286, 2011.

Zhu, B.; Ye, S.; Chang, S.; Chen, M.; Sun, L.; An, Q. Genome Sequence of the Pathogenic *Herbaspirillum seropedicae* Strain Os45, Isolated from Rice Roots. *Journal of Bacteriology*, v. 194 (24): p. 6995-6996, 2012.

## VI. Anexos

**Quadro 3.** Composição meio JNFb líquido (DOBEREINER, 1995):

Reagentes	Quantidade em 1 L
Ácido Málico	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> )
KOH	4,5 (g.L <sup>-1</sup> )
FeEDTA (16,4 g.L <sup>-1</sup> )	4 mL
Solução de micronutrientes (Vide quadro 5)	2 mL
Solução de vitaminas (Vide quadro 4)	1 mL
Ágar meio sólido/semi-sólido	25g/1,3g

**Quadro 4.** Composição solução de vitaminas:

Reagentes	Quantidade em 1 L
Biotina	10 mg
Piridoxal-HCl	20 mg

**Quadro 5.** 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> )

**Quadro 6.** Genes diferencialmente expressos no genoma de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 na presença do líquido do apoplasto. Genes induzidos na presença do líquido do apoplasto em comparação aos tratamentos: meio + água (MA) e meio + meio (MM). Os asteriscos indicam que não foram encontrados produtos gênicos no COG, e que a descrição foi realizada de acordo com o Blast2Go.

ORF	Gene	Descrição	Classe	MA (Fold change)	MM (Fold change)
_0002.0008		Nitroredutase	C	9.362667370	4.819130799
_0002.0036		Hemeritrina	P		5.481357682
_0002.0059		Proteína de membrana	*	2.908928657	
_0002.0061		Histidina amônio-liase	E		3.300506352
_0002.0063		Glicosiltransferase envolvida na biogênese da parede celular	M	5.220424211	
_0002.0087		ADP-heptose sintase, quinase de açúcar bifuncional/adenililtransferase	M	2.521468904	3.695401185
_0002.0124		Nitrato redutase subunidade beta	C	76.629231432	390.682431600
_0002.0125		Nitrato redutase subunidade alfa	C	161.550875119	163.445750900
_0002.0127		Transportador de Nitrato/nitrito	P	42.712333233	
_0002.0128		Transportador de Nitrato/nitrito	P	28.082540662	54.964813660
_0002.0134		Regulador transcricional predito	K		2.306563656
_0002.0181		Acil-CoA hidrolase	I		2.387326016
_0002.0184	<i>gdhA</i>	Glutamato desidrogenase/ Leucina desidrogenase	E	4.710101990	
_0002.0187		Regulador Transcricional	K	2.246975759	2.644520927
_0002.0189		Flavodoxina multimérica WrbA	R		2.941435326
_0002.0218		Permease do transportador de droga/metabolitos (DMT)	GER		2.508568152
_0002.0226	<i>glcD</i>	Desidrogenases contendo FAD/FMN	C	4.891030748	3.649376316
_0002.0227	<i>glcE</i>	Desidrogenases contendo FAD/FMN	C	5.219281211	3.503922033
_0002.0233		Sistema de transporte de C4-dicarboxilato de tipo TRAP, componente periplásmico	G		2.562087314
_0002.0246		adp-ribosil- (dinitrogênio redutase) hidrolase	*		6.096037744
_0002.0253	<i>ugpC</i>	Sistema transporte açúcar tipo-ABC, componente ATPase	G	3.282445016	2.123631188
_0002.0260		Regulador transcricional	K	16.458614128	9.491334316
_0002.0262		Coenzima N5 Dependente-F420, N10-metileno tetraidrometanopterina redutase e oxidoreductase flavina-dependente	C	5.989435769	12.004581190
_0004.0009		Regulador transcricional	K	2.851991204	2.015662432
_0004.0010		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	2.916822443	4.585547369
_0004.0013		Sistema de transporte de aminoácidos polares tipo ABC, componente ATPase	E		4.056161274
_0004.0014		Transporte de aminoácidos tipo ABC/Sistema de transdução de sinal, Componente/domínio periplásmico	ET	32.887236113	4.778343105
_0004.0015	<i>uxaA</i>	Altronato desidratase	G	21.438791399	4.686198506
_0006.0001	<i>glgB</i>	1,4-alfa-glucano	G	#DIV/0!	4.003580077
_0006.0010		Permease efluxo arabinose	G	3.018051725	
_0013.0040	<i>sixA</i>	Fosfohistidina fosfatase SixA	T		3.609874334
_0013.0050	<i>fabG</i>	Desidrogenases com diferentes especificidades (Relacionados com álcool desidrogenases de cadeia curta)	IQR		2.279127637

_0024.0001	<i>pbpC</i>	Carboxipeptidase de membrana/ Proteína de ligação à penicilina PbpC	M	10.209851446	7.518956660
_0024.0002		Proteína grande alfa-helicoidal extracelular	R	5.172567066	
_0026.0007		Proteína de divisão celular	D	3.446575385	
_0026.0008		Ditiol-dissulfito isomerase predita envolvida na biossíntese de policétido	Q	2.262717122	
_0026.0039		Transporte de aminoácidos tipo ABC/Sistema de transdução de sinal, Componente/domínio periplasmático	ET	3.020978129	
_0026.0064		Proteína peptídica de sinal	*		6.409844341
_0026.0084	<i>set</i>	Mureína lítica solúvel transglicosilase e proteínas reguladoras relacionadas (algumas contêm LysM / domínio invasivo)	M		2.132586398
_0026.0085		Epimerases nucleosídico-difosfato-açúcar	MG		2.200854757
_0026.0086	<i>gst</i>	Glutaciona S-transferase	O		2.729273168
_0030.0083		Regulador transcricional	K		4.980169717
_0035.0006		Proteína da família phasin	*		3.922870018
_0035.0032	<i>copZ</i>	Chaperona Copper	P	3.942230168	6.696461848
_0037.0051		Regulador transcricional	K		4.174630741
_0037.0066	<i>exuT2</i>	Permease fosfato de açúcar	G	21.885184170	10.333284160
_0037.0068		Proteína da membrana externa (porina)	M	14.697496848	33.743485220
_0037.0072		Hidrolase metal-dependente, membrana-associada predita	R	115.148961516	16.201871320
_0037.0084	<i>wcaG</i>	Epimerases nucleosídico-difosfato-açúcar	MG	42.315426472	25.904241530
_0037.0087		Bomba de efluxo de cations/multidrogas	V	5.633381130	16.209152840
37.0206	<i>ftsW</i>	Proteína de membrana de divisão celular bacteriana	D		3.383882240
_0037.0098		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*		#DIV/0!
_0037.0099		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*	12.827224173	4.604224155
_0037.0111		Regulador de resposta contendo receptores de tipo CheY, ATPase do tipo AAA e domínios de ligação a ADN	T		7.125929718
_0037.0141		Aminotransferase adenosilmetionina-8-amino-7-oxononoato	H	2.981766130	
_0037.0195	<i>adhP</i>	Alcool desidrogenase Zn-dependente	R	8.897506701	5.554117086
_0037.0200		Subunidade A amidotransferase Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAGln e amidases relacionadas	J	2.567708824	
_0037.0206		Proteína de membrana de divisão celular bacteriana	D	3.383882240	
_0037.0213	<i>gmhA</i>	Isomerase fosfoheptose	G		7.062405576
_0037.0214		Lipoproteína secretada ou predita periplasmática	R	5.003147726	2.312483995
_0037.0220		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		2.351688375
_0037.0243		Hidrolase predita da TIM-barril metal-dependente	R	#DIV/0!	9.523867086
_0037.0246	<i>serA</i>	Fosfoglicerato desidrogenase e desidrogenases relacionadas	HE		75.861753600
_0037.0247	<i>menG</i>	Demetilmenaquinona metiltransferase	H	238.970620458	63.983393420
_0037.0248		Gluconolactonase	G	48.454032910	59.274726530
_0037.0250		Permease fosfato de açúcar	G	#DIV/0!	11.268973400
_0037.0276	<i>potA</i>	Espermidina tipo ABC/Sistema de transporte de Putrescina, Componentes ATPase	E		22.782960940

_0037.0278	<i>afuA</i>	Sistema de transporte Fe <sup>3+</sup> tipo ABC, Componente periplasmático	P	12.230296229	9.748117866
_0037.0279	<i>tctC</i>	Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		23.995123090
_0037.0285		Desacetilase de acetilornitina/succinil-diaminopimelato desuccinilase e deacilases relacionadas	E	7.391417408	
_0037.0287	<i>dctA</i>	Simporte dicarboxilato Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	C		3.719306545
_0037.0288		Regulador transcricional	K		8.583233559
_0044.0007		Desacetilase	BQ		2.516168709
_0047.0005		Sistema de transporte de dipeptídeo do tipo ABC, Componente periplasmático	E	#DIV/0!	#DIV/0!
_0047.0012	<i>mscL</i>	Canal mecanossensível de grande condutividade	M		3.076879810
_0047.0013		Proteína conservada não caracterizada	S	4.794980300	
_0047.0020		Pirofosfo hidrolase fosforibosil-ATP	E		2.317248138
_0047.0036		Sistema de transporte do tipo ABC envolvido na resistência a solventes orgânicos, componente auxiliar	Q	2.649997643	
_0047.0046		Regulador transcricional	K		2.092918277
_0047.0080		Peptidases Zn-dependente predita	R		3.210460002
_0049.0040		Histidina quinase de transdução de sinal reguladora do sistema de transporte de C4-dicarboxilato	T	3.348905816	
_0049.0051		Aldeído desidrogenase NAD-dependente	C	6.271490934	14.214681670
_0049.0052	<i>tsaC</i>	Desidrogenase com diferentes especificidades (relacionadas com álcool desidrogenase de cadeia curta)	IQR	19.761002039	6.885683062
_0049.0090		Pirofosforilase Nicotinato-nucleótido	H	2.470003189	
_0049.0143		UDP-glicose pirofosforilase	M	2.931170932	
_0049.0144		DNA ligase NAD-dependent (contém o domínio BRCT tipo II)	L	6.544611058	
_0049.0184		Proteína de transdução de sinal predita contendo um domínio de membrana, um domínio EAL e um GGDEF	T		2.420722223
_0049.0197	<i>greA</i>	Fator de alongação da transcrição	K	2.835578177	
_0049.0212	<i>clpB</i>	ATPases com atividade chaperona, subunidade de ligação do ATP	O		2.161159080
_0049.0242	<i>phoH</i>	ATPase predita relacionada com a proteína PhoH starvation fosfate - induzível	T		2.348500821
_0049.0274	<i>flgL</i>	Flagelina e proteínas relacionadas ao gancho	N		2.236279435
_0049.0401		Glicosiltransferases, provavelmente envolvida na biogênese da parede celular	M	#DIV/0!	12.531212150
_0049.0458	<i>uvrC</i>	Subunidade nuclease do complexo excinuclease	L		5.200087442
_0049.0468	<i>degQ</i>	Serina-proteases semelhantes a tripsina, tipicamente periplasmática, contendo domínio PDZ C-terminal	O	3.381284452	
_0049.0470	<i>rseA</i>	Regulador negativo da atividade sigma E	T	2.472341856	
_0049.0497	<i>lolA</i>	Lipoproteína de membrana externa - classificação de proteína	M	5.831629359	2.571353520
_0049.0503		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	4.047236759	5.903832320
_0049.0527	<i>moaA</i>	Enzima de biossíntese de molibdênio cofator	H	3.692122375	
_0049.0529	<i>moeA</i>	Enzima de biossíntese de molibdopterina	H		10.483246950
_0049.0534		proteína hipotética	*		5.511973767
_0049.0552	<i>livG</i>	Sistema de transporte de aminoácido de cadeia ramificada do tipo ABC, componente ATPase	E	25.637755603	
_0050.0002	<i>wcaA</i>	Glicosiltransferase	M		2.045261320
_0050.0019		Glutamina amidotransferase predita	R		2.451875311

_0050.0023		Proteína da membrana externa e (lipo) proteínas relacionadas com peptidoglicano	M	14.595368367	14.994325670
_0053.0017		Sistema de transporte do tipo ABC não caracterizado, componente permease	R	2.859840988	2.062710783
_0054.0023		Regulador transcricional	K	5.885445213	3.939485951
_0054.0039		Proteína de transdução sinal predita	T	3.060804652	2.363255281
_0054.0101		Regulador transcricional	K		3.180160389
_0055.0002	<i>eutB</i>	Etanolamina amônia-liase, subunidade grande	E	14.450683694	4.587400180
_0055.0022	<i>ygiX</i>	Regulador de resposta contendo um domínio receptor tipo-CheY, e um domínio de ligação ao DNA de <i>winged-helix</i>	TK	5.554547173	3.729957801
_0055.0025	<i>hemK</i>	Metilase de fatores de liberação da cadeia polipeptídico	J	6.721914264	
_0055.0034	<i>fnr</i>	Proteínas de ligação a cAMP - ativador do gene de catabolito e subunidade reguladora de quinases de proteína dependentes de cAMP	T		2.011801246
_0055.0056	<i>lpqC</i>	Poli (3-hidroxibutirato) depolimerase	Q	8.255635823	
_0055.0058		Proteína peptídeo sinal	*	64.811799674	6.190101687
_0055.0062		Sistema de transporte do tipo ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, Componente periplasmático	E	14.941117793	
_0058.0022		Proteína de quimiotaxia metil-receptora	NT		3.028176069
_0058.0028		Arabinose efflux permease	G	7.053014977	5.048288449
_0058.0035		Regulador transcricional	K		#DIV/0!
_0058.0037		Canal de baixa condutibilidade mecanossensível	M	#DIV/0!	#DIV/0!
_0058.0039		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*	55.392284226	41.969815520
_0058.0064		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*	2.659972117	3.857407101
_0058.0065		Regulador transcricional contendo PAS, ATPase tipo-AAA, e domínio de ligação ao DNA	KT		3.857407101
_0058.0065	<i>ntrX</i>	Regulador de resposta contendo CheY-como receptor, ATPase tipo-AAA, e domínio de ligação ao DNA	T		2.867008777
_0058.0069		Proteína conservada não caracterizada	*		3.315104806
_0058.0075		Lisofosfolipase	I	3.000623556	3.315104806
_0058.0076		Fosfatidilglicerofosfato sintase	I	2.757472318	
_0058.0088		Metilase envolvida na biossíntese de ubiquinona/menaquinona	H		2.780395115
_0060.0003	<i>pqiB</i>	Proteína B induzida por Paraquat	R		#DIV/0!
_0064.0006		Proteína hipotética	*	48.132727869	25.774676880
_0064.0030		Regulador de resposta contendo CheY-como domínio receptor e domínio GGDEF	T		4.281033880
_0064.0031		Ferritina	U	50.973947719	13.964664890
_0065.0006		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		7.234097477
_0065.0021		Arginil-tRNA putativa: proteína arginiltransferase	O		2.848513056
_0065.0040		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*	4.444942315	5.838007817
_0065.0061		Regulador transcricional	K	4.430874186	
_0065.0076	<i>htpX</i>	Proteína de choque térmico	*	2.524702238	
_0065.0079		Esterase predita da superfamília alfa-beta hidrolase	R	2.200523072	2.567657713
_0065.0106		Proteína de membrana predita	S	2.341785621	4.979000869
_0068.0003	<i>livF</i>	Sistema de transporte do tipo ABC de aminoácido de cadeia ramificada, componente ATPase	E		3.891287955
_0068.0004	<i>livG</i>	Sistema de transporte do tipo ABC de aminoácido de cadeia ramificada, componente ATPase	E	6.092404836	5.948085756



_0068.0005	<i>livH</i>	Sistema de transporte do tipo ABC de aminoácido de cadeia ramificada, componente ATPase	E		5.598670095
_0068.0006	<i>livK</i>	Sistema de transporte do tipo ABC de aminoácido de cadeia ramificada, componente ATPase	E	2.844282896	2.454729383
_0068.0033	<i>por</i>	NADPH:quinone redutase e oxidoreductase Zn-dependente relacionada	CR		4.921618793
_0068.0052		Regulador transcricional contendo um domínio HTH de ligação ao DNA e um domínio aminotransferase (família MocR) e os seus ortólogos eucarióticos	KE	5.300854405	3.083083375
_0068.0057				2.524135975	5.199727147
_0068.0062		Proteína periplasmática secretada	*	#DIV/0!	
_0068.0075		Chaperona de ligação dissulfureto da família HSP33	O		2.158872015
_0068.0088	<i>opuA</i>	Sistema de transporte tipo ABC de prolina/glicina betaína, componentes ATPase	E	6.604397930	
_0068.0091	<i>opuBB1</i>	Sistema de transporte tipo ABC de prolina/glicina betaína, componentes ATPase	E	2.566935218	
_0068.0108	<i>dadA</i>	Glicina/D-aminoácido oxidases (desaminação)	E	2.089840098	
_0071.0020		Nuclease	*	5.452764073	
_0071.0072	<i>mopI</i>	Sulfito oxidase e enzimas relacionadas	R	#DIV/0!	
_0079.0008	<i>msrA</i>	Peptídeo metionina sulfóxido redutase	O	3.178438728	2.590090802
_0079.0017	<i>pgK</i>	3-fosfoglicerato quinase	G	2.716546252	2.898981457
_0079.0025	<i>pilA</i>	Proteína de montagem do Tfp pilus, pilina principal PilA	NU	2.824522161	
_0079.0035		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		2.030096695
_0079.0040		Simporte predito	R	3.245106668	
_0079.0066	<i>panB</i>	Cetopantoato hidroximetiltransferase	H	2.623225267	
_0079.0072	<i>hemH</i>	Protoheme ferro-liase (ferroquelatase)	H		2.309129188
_0079.0082		Barstar, Inibidor da RNase (barnase)	K		4.951672577
_0079.0101	<i>amtH</i>	Amônia permease	P	2.963144773	
_0079.0109	<i>adhC</i>	Treonina desidrogenase e desidrogenases Zn-dependente relacionadas	ER	3.561355270	
_0084.0003		Proteína da cauda	*	#DIV/0!	
_0084.0004		Peptidase m15b e endolisina carboxipeptidase	*	19.971272380	6.565266972
_0084.0006		Proteína hipotética	*	#DIV/0!	4.814121887
_0084.0007		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	5.681139410	6.865537189
_0084.0008		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	14.011137415	
_0084.0009		Proteína da membrana externa e (lipo) proteínas peptidoglicano-associada relacionadas	M	22.292782336	7.409189171
_0084.0010		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	15.059129644	10.119527460
_0084.0012		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	5.406502658	
_0084.0014		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		3.317278970
_0084.0015		Proteína (Não caracterizada) corregulada-hemolisina	S	4.933543768	5.020746668
_0084.0016		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	8.530433218	5.084379596
_0084.0017		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	15.961453286	6.189279020
_0084.0019		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	#DIV/0!	11.476120380
_0084.0020		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	10.327639540	7.315396345
_0084.0021		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	6.944335239	4.403883726
_0084.0031	<i>rpoN</i>	RNA polimerase DNA-dirigida especializada na subunidade sigma, homóloga sigma54	K		2.040628987
_0084.0032	<i>yhbH</i>	Proteína Y (PSrp-1) associada ao ribossomo	J		2.041355210
_0084.0065	<i>livM</i>	Sistema de transporte do tipo ABC de aminoácido de cadeia ramificada, componente ATPase	E		8.138888688

_0084.0070	<i>pcaR</i>	Regulador transcricional	K		27.154801520
_0084.0077		Tioesterase predita	R	6.092465424	#DIV/0!
_0093.0014		Protease putativa Zn-dependente, contém repetições TPR	R	2.731893815	
_0093.0050	<i>tauA</i>	Sistema de transporte tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente periplasmático	P	8.824428284	21.810904850
_0093.0051	<i>tauB</i>	Sistema de transporte tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente ATPase	P	#DIV/0!	
_0093.0052	<i>tauC</i>	Sistema de transporte tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente permease	P	17.681508501	7.564951483
_0093.0059		Histidina quinase transdução de sinal	T	3.528050328	
_0093.0062	<i>COG2205</i>	Histidina quinase de canal K <sup>+</sup> osmose sensível	T	2.047824012	3.752424673
_0093.0062	<i>COG0784</i>	FOG: receptor tipo CheY	T	2.047824012	3.752424673
_0093.0072	<i>cinA1</i>	Proteína não caracterizada (Competência e mitomicina induzida)	R		2.160581175
_0095.0006	<i>ptxS</i>	Regulador transcricional	K	2.492071397	fold
_0095.0007		Transporte de aminoácidos tipo ABC/Sistema de transdução de sinal, Componente/domínio periplasmático	ET	2.594753437	4.038526359
_0095.0008		Sistema de transporte tipo ABC de aminoácido de cadeia ramificada, componente ATPase	E		4.441737073
_0095.0093	<i>dppC2</i>	Sistema de transporte tipo ABC de dipeptídeo/oligopeptídeo/níquel, componente permease	EP	4.509494061	
_0095.0113		Proteína integral de membrana, CcmA, envolvida na determinação da forma celular	M		14.810536230
_0095.0119	<i>ttuC</i>	Isocitrato/isopropilalato desidrogenase	CE		2.595289636
_0095.0127	<i>fdhF</i>	Desidrogenase anaeróbica não caracterizada	R		2.432354374
_0099.0007		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente permease	G		3.021984772
_0099.0008		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente periplasmático	G	3.029960026	2.594859167
_0099.0020		Sistema de transporte tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente periplasmático	P	2.091957313	3.602498064
_0103.0020		Dioxigenase relacionada à 2-nitropropano dioxigenase	R	10.891997830	5.197394023
_0104.0008		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*	#DIV/0!	6.674780867
_0105.0002	<i>dadA</i>	Glicina/D-aminoácido oxidase (desaminação)	E	29.864268084	10.167347830
_0105.0005		Proteínas contendo o domínio de ligação ao DNA do tipo AraC	K	2.327387746	4.880657672
_0105.0013		Proteína periplasmática predita	S		2.332751123
_0105.0023		Regulador transcricional	*	2.460897637	
_0105.0035		Regulador de resposta contendo um domínio receptor CheY e um domínio GGDEF	T	13.800618210	9.639772525
_0105.0046		Proteína de membrana extena	MU		2.825115073
_0105.0050		Poli-beta-hidroxialcanoate depolimerase	I		3.061465251
_0107.0013		Proteína exportada	*	5.992508659	
_0107.0036		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		2.120188707
_0107.0046	<i>lpxC</i>	UDP-3-O-acil-N-acetilglucosamina desacetilase	M	2.524592075	
_0107.0047		Peroxiirredoxina	O	3.881285370	2.167055436
_0110.0010	<i>glpK</i>	Glicerol quinase	C	2.727766336	3.386793261

_0110.0011	<i>dctP</i>	Sistema de transporte tipo TRAP de C4-dicarboxilato, componente periplasmático	G	11.037139593	3.759841132
_0110.0022	<i>miaA</i>	tRNA delta(2)-isopentenilpirofosfato transferase	J		2.48404133
_0110.0040		Hidrolase metal-dependente predita	R	7.898116198	
_0110.0050		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente periplasmático	G	4.200204553	7.221311712
_0110.0052		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente permease	G		12.646972
_0110.0053		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente permease	G	8.621370131	8.372469395
_0110.0054		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componentes ATPase	G	13.317624025	12.494825650
_0110.0055		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componentes ATPase	G	5.610849492	8.849922791
_0110.0056	<i>glpD2</i>	Glicérol-3-fosfato desidrogenase	C	7.957731106	12.346219730
_0110.0080		Proteínas contendo o domínio de ligação ao DNA do tipo AraC	K	3.266992706	2.577798485
_0110.0092		Proteína conservada não caracterizada	S		2.463986431
_0110.0093		Sistema de transporte tipo Kef de K+, componente de membrane	P	7.501735808	
_0110.0108	<i>dctM</i>	Sistema de transporte tipo TRAP de C4-dicarboxilato, componente de permease grande	G	3.379958165	4.687904702
_0110.0109	<i>dctQ</i>	Sistema de transporte tipo TRAP de C4-dicarboxilato, componente de permease pequeno	G		4.451542587
_0110.0110	<i>dctP</i>	Sistema de transporte tipo TRAP de C4-dicarboxilato, Componente periplasmático	G	5.879294669	3.680562577
_0111.0008	<i>iscS1</i>	Cisteína sulfinato desulfina-se/ cisteína desulfurase e enzimas relacionadas	E	2.827910153	
_0111.0015	<i>garD</i>	Altronato desidratase	G	5.538337889	3.490253605
_0111.0026		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética		2.346813175	
_0111.0039	<i>abgB</i>	Amidase/aminoacilase/carboxipeptidase metal-dependente	R	2.922321546	#DIV/0!
_0111.0053		Regulador transcricional	K	5.635000702	5.522011124
_0118.0011				6.809826362	
_0118.0036				4.980758638	
_0118.0070	<i>dctP</i>	Sistema de transporte tipo TRAP de C4-dicarboxilato, componente periplasmático	G	3.755528315	9.849814224
_0118.0080				8.237849961	7.004173761
_0118.0087	<i>galU</i>	UDP-glicose pirofosforilase	M	14.694642329	11.389909510
_0118.0168		Regulador de resposta constituído por um domínio receptor tipo CheY e por um domínio Fis-tipo HTH	TK		3.112651727
_0118.0172	<i>lldD</i>	L-lactato desidrogenase (FMN-dependente) e desidrogenases relacionadas ao ácido alfa-hidroxi	C		6.834063449
_0118.0175		Proteína de transdução de sinal predita	T		2.201109068
_0118.0190		Sistema de transporte tipo ABC envolvido na resistência a solventes orgânicos, componente permease	Q	2.366041872	2.323493170
_0118.0222		sintetase da Acil-coenzima A/ ácido (graxo) ligase AMP	I	11.051295917	
_0119.0008		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componentes ATPase	G	14.055942871	12.851818376

_0119.0032		Dihidroorotase e amido-hidrolases cíclicas relacionadas	F	2.320816504	
_0127.0007		Canal mecanosensitivo de baixa condutibilidade	M	3.325891084	3.882420242
_0127.0009		tRNA e rRNA citosina-C5-metilase	J	2.057563419	
_0127.0013		Esterase predita da superfamília da alfa-beta hidrolase	R		2.419068523
_0127.0021	<i>talB</i>	Transaldolase	G	2.041300788	2.325746914
_0127.0032		Treonina desidrogenase e desidrogenases Zn-dependente relacionadas	ER	4.151927961	5.926565664
_0127.0035		Simporte H <sup>+</sup> /gluconato e permeases relacionadas	GE		21.664384010
_0127.0053	<i>goaG</i>	4-aminobutirato aminotransferase e aminotransferases relacionadas	E	10.953393077	26.367654590
_0127.0056	<i>potH</i>	Sistema de transporte tipo ABC de espermidina/putrescina, permease componente I	E	17.780428754	25.453152560
_0127.0057	<i>potC</i>	Sistema de transporte tipo ABC de espermidina/putrescina, permease component II	E	#DIV/0!	25.0699553
_0127.0058	<i>gabD1</i>	Aldeído desidrogenase NAD-dependente	C	12.102432033	13.4732297
_0127.0068			*	46.230621631	#DIV/0!
_0127.0085		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente periplasmático	G		5.824422555
_0127.0086		Sistema de transporte tipo ABC de Ribose/ xilose /arabinose/galactosido, componente permease	G		2.798122035
_0127.0087		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente ATPase	G		2.736388988
_0127.0090		L-alanina-DL-glutamato epimerase e enzimas relacionadas da superfamília enolase	MR	13.064298237	
_0127.0095		Regulador transcricional	K		2.572421854
_0127.0097		Dihidroxiácido desidratase/fosfogluconato desidratase	EG		10.087421430
_0127.0098		Sistema de transporte tipo ABC de xylose, componente permease	G		15.356419940
_0127.0099		Sistema de transporte tipo ABC açúcar, componente ATPase	G	6.625096608	71.994092352
_0127.0101		Sistema de transporte tipo ABC de xylose, componente periplasmático	G	14.771925497	21.170648340
_0127.0113		Regulador transcricional	K		5.027616488
_0127.0117	<i>deoC</i>	Desoxirribose-fosfato aldolase	F	4.491312408	
_0127.0118		Aldeído desidrogenase NAD-dependente	C	3.492097194	3.083714087
_0127.0123		Sistema de transporte tipo ABC açúcar, componente ATPase	G	10.260411069	#DIV/0!
_0127.0199		Proteína flagelar <i>capping</i>	N		2.564944078
_0127.0200		Acil desidratase	I	2.789349914	12.017847037
_0127.0210		Citocromo c551/c552	C	2.223534851	2.643741591
_0127.0214	<i>eda</i>	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato-aldolase	G	3.063520195	
_0129.0001		Hidrogenase/proteína acessório urease	O	2.658731443	
_0131.0024		Glicina/D-aminoácido oxidases (desaminação)	E	2.606420082	
_0131.0066		Arabinose efflux permease	G	13.611417919	2.783397903
_0131.0067		Sistema de transporte tipo ABC de molibdato, Componente periplasmático	P	10.315349868	
_0134.0004		4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase e hemolisinas relacionadas	ER	4.882903857	2.057521181
_0134.0015				54.479897251	3.720018969
_0135.0001		Peroxiredoxina	O	4.551989085	

_0141.0008	<i>dgt</i>	dGTP trifosfohidrolase	F	3.061429439	3.454692030
_0147.0001		Proteína de membrana externa	MU		2.643890159
_0147.0006	<i>acrR</i>	Regulador transcricional	K	6.945394228	4.626686953
_0155.0002	<i>uspA</i>	Proteína universal de estresse UspA e proteínas de ligação com nucleotídeo relacionadas	T	2.590174323	
_0155.0012	<i>trpC</i>	Indole-3-glicerol fosfato sintase	E		3.271333072
_0155.0027		Peptídeo resistência antimicrobiana e lípido uma proteína de acilação		5.334559526	5.716220659
_0155.0038		Protease predita com domínio PDZ C-terminal	R	2.257204040	
_0155.0039	<i>gltD</i>	Cadeia beta da glutamato sintase dependente de NADPH e oxidoreductase relacionada	ER		2.902748072
_0155.0043	<i>ygjT</i>	Proteína de membrana TerC, possivelmente envolvida na resistência telúrio	P	5.022211657	42.014929993
_0155.0044		Proteína não caracterizada conservada em bactéria	S	19.285083030	18.283069414
_0158.0003	<i>livK</i>	Sistema de transporte tipo ABC de aminoácido de cadeia ramificada, componente periplasmático	E		2.447162196
_0159.0012	<i>yibP</i>	Metalopeptidase ligada à membrana	D	2.127247816	2.442945583
_0159.0013	<i>gpmA</i>	Fosfoglicerato mutase 1	G	3.700503162	2.010580293
_0159.0032	<i>gbd</i>	Alcool desidrogenase, classe IV	C	4.124041094	6.102655112
_0162.0002	<i>putA</i>	Delta 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	C		11.174560066
_0162.0008		FOG: repetição TPR, subfamília SEL1	R	#DIV/0!	6.667249787
_0162.0016	<i>otsB</i>	Trealose-6-fosfatase	G	5.941776081	31.517430176
_0162.0018	<i>otsA</i>	Trealose-6-fosfato sintase	G	18.715252719	7.973666318
_0163.0009		Proteína SCO1/SenC/PrrC não caracterizada, envolvida na biogênese dos sistemas respiratório e fotossintético	R	3.527284891	2.569501224
_0163.0020	<i>comFC</i>	Amidofosforibosiltransferase predita	R		3.201210268
_0164.0020		Proteína de quimiotaxia Metil-receptora	NT		3.016696992
_0166.0002	<i>yhhJ</i>	ABC-tipo multidrogas Sistema de transporte, permease componente	V		2.426443405
_0166.0006		Proteína de membrana externa	MU		3.220077254
_0166.0008	<i>ibpA</i>	Chaperona molecular (Proteína pequena de choque térmico)	O	8.268693770	5.003089258
_0167.0004	<i>dctD1</i>	Regulador de resposta contendo receptor semelhante a CheY, AAA-tipo ATPase, e domínio de ligação ao DNA	T	4.296438708	6.224906610
_0167.0005		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*	12.688272988	8.861140625
_0167.0049		Aminotransferase de aminoácido de cadeia ramificada / 4-amino-4-desoxicorismato liase	EH	52.988907130	
_0167.0055	<i>bglX</i>	Glicosidase relacionadas com beta-glucosidase	G		2.144175201
_0167.0074	<i>asmA</i>	Proteína não caracterizada envolvida na biogênese da membrana externa	M	18.039911376	45.608657167
_0167.0076		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*	2.501278822	
_0173.0014	<i>upp</i>	Uracil fosforibosiltransferase	F	3.678044766	
_0181.0001		Proteína não caracterizada conservada em bactéria	S	7.622350165	4.707472658
_0183.0007		Proteína de membrana predita	S		2.094076375
_0203.0009	<i>ntrC</i>	Regulador de resposta contendo receptor semelhante a CheY, AAA-tipo ATPase, e domínio de ligação ao DNA	T	2.613872899	
_0203.0024		FOG: domínio GGDEF	T		3.616157027
_0203.0026		Aspartato/tirosina/aromática aminotransferase	E	3.522575940	

_0203.0038	<i>phbB</i>	Desidrogenase com diferentes especificidades (relacionada com alcool desidrogenase de cadeia curta)	IQR		2.290592939
_0203.0092	<i>prpR</i>	Regulador transcricional contendo PAS, AAA-tipo ATPase, e domínio de ligação ao DNA	KT	3.935939544	2.972367633
_0203.0097	<i>prpE</i>	Acil-coenzima A sintetase/AMP-(graxo) ácido ligase	I	6.140516915	4.497006734
_0203.0103		NADH: flavina oxidoreductase, enzima da familia <i>Old Yellow</i>	C	3.239971148	2.138596369
_0203.0107		Permease predita	R		2.272075589
_0203.0114	<i>cysI</i>	Sulfito redutase, subunidade beta (hemoproteína)	P		2.031908620
_0203.0146		Regulador transcricional	K	3.023945507	3.295071542
_0206.0026		Açúcar phosphate permease	G	2.656072197	2.751229048
_0210.0002		Exportadores tipo ABC de bacteriocina/lantibioticos, contém um domínio N-terminal de glicina-peptidase dupla	V		2.005502240
_0210.0007	<i>htpG</i>	Chaperona molecular, HSP90	O		2.207119673
_0210.0009		Lipoproteína de membrana externa	M	2.780958603	
_0212.0021	<i>vsrA</i>	Permease do transportador da superfamilia de transportadores de drogas/metabolitos (TDM)	GER	3.682839724	6.468454499
_0212.0021	<i>vsrA</i>	Histidine quinase de transdução de sinal	T	3.682839724	6.468454499
_0212.0021	<i>vsrA</i>	FOG: domínio PAS/PAC	T	3.682839724	6.468454499
_0212.0023	<i>vsrD</i>	Regulador de resposta contendo um domínio recetor tipo CheY e um domínio HTH de ligação ao DNA	TK	4.695989953	
_0212.0024		Lipoproteína periplásmica ou secretada predita	R	#DIV/0!	7.448301600
_0212.0025		Lipoproteína periplásmica ou secretada predita	R	23.998673596	22.418851728
_0212.0026		Proteína não caracterizada conservada em bactéria	S	7.053840815	14.170339943
_0219.0018		Proteína conservada não caracterizada	S	2.117546205	2.798620622
_0219.0024	<i>icd</i>	Isocitrato desidrogenase	C	2.454739905	
_0219.0053		Proteína de membrana predita	S		2.907579874
_0225.0004		Proteína não caracterizada homóloga a proteína Iojap vegetal	S	2.481138772	
_0225.0015		Lipoproteína			5.010483707

**Quadro 7.** Genes diferencialmente expressos no genoma de *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 na presença do líquido do apoplasto. Genes induzidos na presença do líquido do apoplasto em comparação aos tratamentos: meio + água (MA) e meio + meio (MM). Os asteriscos indicam que não foram encontrados produtos gênicos no COG, e que a descrição foi realizada de acordo com o Blast2Go.

ORF	Gene	Descrição	Descrição da classe	MA (Fold change)	MM (Fold change)
_0002.0002		Sistema de transporte tipo ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, componente permease	P		#DIV/0!
_0002.0018		Regulador de resposta contendo receptor semelhante a CheY, AAA-tipo ATPase, e domínio de ligação ao DNA	T	-48.01212845	-13.57569101
_0002.0019		Regulador transcricional	TK	-2.847801032	
_0002.0021		Arabinose efflux permease	G		-5.946142961
_0002.0025		Regulador de resposta contendo receptor semelhante a CheY, AAA-tipo ATPase, e domínio de ligação ao DNA	T		-10.6931002
_0002.0081		Citidilato quinase	F		-2.727401085
_0002.0083		Fator de integração com o hospedeiro subunidade beta	L	-2.303349233	
_0002.0159		Regulador transcricional predito contendo domínio HTH	K	-3.04864597	-2.57686902
_0002.0161		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		-3.258729917
_0002.0162		Fator de elongação da transcrição	K		-2.940310584
_0002.0165		Pseudouridina sintase	J		-3.385717289
_0002.0166		GTPase membrana predita envolvida na resposta ao estresse	T		-3.103715196
_0002.0173		Mureina lítica solúvel transglicosilase e proteínas reguladoras relacionadas (algumas contêm LysM / domínio invasin)	M		-3.144449489
_0002.0178		Superfamília II DNA e RNA helicase	LKJ	-2.495017869	-2.747517056
_0002.0205	<i>rplM</i>	Proteína ribossomal L13	J		-3.324522629
_0002.0206	<i>rpsI</i>	Proteína ribossomal S9	J	-2.756022591	-4.588265381
_0002.0207	<i>argC</i>	Acetilglutamato semialdeído desidrogenase	E		-2.077745259
_0002.0230	<i>gltP</i>	Transportador tipo ABC de c4-dicarboxilato	C		-4.309536249
_0002.0251	<i>ugpA</i>	Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente permease	G		-8.678850457
_0002.0256		Proteína hipotética	*		-2.010103904
_0002.0273		Proteína de transmembrana	*	#DIV/0!	
_0004.0008		Proteína conservada não caracterizada	*		-11.96150683
_0005.0001	<i>tufB</i>	GTPases - fator de elongação da tradução	J		-2.323356807
_0013.0009	<i>glyA</i>	Glicina/serina hidroximetiltransferase	E		-5.047690155
_0026.0005	<i>priA</i>	Proteína primosomal n	L	-6.260908557	
_0026.0027	<i>ycfQ</i>	Família de regulador transcricional	K	-2.74136731	
_0026.0029	<i>rdgC</i>	factor C de crescimento dependente-DNA recombinação	L		-2.256649292
_0026.0061		Proteína integral de membrana predita	S		-4.849819971
_0026.0080	<i>ahcY</i>	S-adenosilhomocisteína hidrolase	H	-3.375339207	-2.062158171
_0030.0075	<i>trs</i>	Proteína de quimiotaxia Metil-receptora	NT		#DIV/0!
_0030.0116		COG5001: Proteína de transdução de sinal predita contendo um domínio de membrana, um domínio EAL e um domínio GGDEF	T	#DIV/0!	
_0030.0116		Transporte de aminoácidos tipo ABC/Sistema de transdução de sinal, componente/domínio periplasmático	ET	#DIV/0!	

_0033.0003	<i>rpsG</i>	Proteína ribossomal S7	J		-2.150896003
_0033.0004	<i>rpsL</i>	Proteína ribossomal S12	J		-3.130430177
_0033.0010	<i>rplJ</i>	50s Proteína ribossomal I11	J	-1.511183248	
_0033.0011	<i>rplA</i>	Proteína ribossomal L1	J		-2.006100965
_0033.0012	<i>rplK</i>	Proteína ribossomal L11	J	-2.52862144	-2.800033704
_0033.0014	<i>secE</i>	Preproteína translocase subunidade SecE	U	-2.41514181	-2.620979166
_0035.0020	<i>trxB</i>	Tioredoxina redutase	O		-2.550852939
_0035.0022	<i>fdx</i>	Predita NADH: ubiquinona oxidoreductase, subunidade RnfB	C		#DIV/0!
_0037.0039	<i>metE</i>	Metionina sintase II (cobalamina-independente)	E		-26.28749046
_0037.0041		Sortase e aciltransferases relacionadas	M		-5.321097972
_0037.0077		Arabinose efflux permease	G		#DIV/0!
_0037.0107	<i>emrE</i>	Transportador de membrana de cátions e drogas catiónicas	P		#DIV/0!
_0037.0114	<i>atoA</i>	Acil CoA: acetato/3-catoácido CoA transferase, subunidade beta	I		-3.298083487
_0037.0115	<i>atoD</i>	Acil CoA: acetato/3-catoácido CoA transferase, subunidade beta	I		-2.505678078
_0037.0116	<i>ato</i>	Acil CoA: acetato/3-catoácido CoA transferase, alfa subunidade	I		-2.166663447
_0037.0141		Adenosilmetionina-8-amino-7-oxonanoate aminotransferase	H		-3.262970369
_0037.0152		Fator de transcrição	*		-2.599034224
_0037.0192		Proteína quimitaxia Metil-receptora	NT		#DIV/0!
_0037.0202	<i>mreB</i>	Actina-tipo ATPase envolvidos na morfogênese celular	D		-3.562812466
_0037.0204	<i>mreD</i>	Proteína determinante da forma celular	M		-17.31080208
_0037.0209		Metiltransferase predita	R		-4.365288471
_0037.0242			*		-7.271779268
_0044.0006	<i>metB</i>	Murein lítica transglicosilase B ligada à membrana	M		-9.355120932
_0047.0006	<i>sspB</i>	Proteína B deficiência severa	R		-3.266082442
_0047.0008	<i>sspA</i>	Glutathione S-transferase	O		-2.013897837
_0047.0016	<i>tatC</i>	Componente TatC da proteína da via de secreção Sec-independente	U		-3.624526278
_0047.0017	<i>tatB</i>	Componente da proteína da via de secreção Sec-independente	U		-3.291270436
_0047.0044		GTPase predita, provavelmente fator de tradução	J		-2.143318232
_0047.0074		Metiltransferase SAM-dependente	*		-3.38132782
_0047.0081		cobirinic ácido - diamida sintase	D	#DIV/0!	
_0049.0015	<i>cheY</i>	Proteína de quimiotaxia	T	#DIV/0!	
_0049.0070	<i>dadA</i>	Aminoácido desidrogenase	E	-3.710378837	
_0049.0076	<i>ppiD</i>	Peptidil-prolil isomerase tipo-Parvulin	O		-2.480279785
_0049.0092	<i>uup</i>	Componentes ATPase do transportador ABC com duplo domínio ATPase	R	-2.177905248	-2.236447774
_0049.0097		Enzimas ativadoras de radicais orgânicos	O		-13.68881759
_0049.0133	<i>rpsB</i>	Proteína ribossomal S2	J		-2.884056559
_0049.0154	<i>dapE</i>	Acetilornitina deacetilase/Succinil-diaminopimelato desuccinilase e deacilases relacionadas	E		-4.897412498
_0049.0155	<i>hemK</i>	Metiltransferase SAM-dependente	J	-3.059349928	
_0049.0162		Proteína flagelar	*	#DIV/0!	
_0049.0204	<i>modAI</i>	Proteína de ligação ao substrato do transportador ABC de molibdato	P	#DIV/0!	
_0049.0207	<i>aceA</i>	Isocitrato liase	C		-4.246750365



_0049.0215		Proteína da membrana externa	MU		-3.285678988
_0049.0233		Proteína de membrana	S	-4.718347811	
_0049.0247	<i>rpsR</i>	Proteína ribossomal S18	J		-4.696719427
_0049.0249		Proteína ribossomal S6	J		-3.516378283
_0049.0281	<i>flgE</i>	Proteína de flagelo	N	-2.034669183	
_0049.0392	<i>kdsB</i>	COG1778: Fosfatase de baixa especificidade (Superfamília HAD)	R		#DIV/0!
_0049.0392	<i>kdsB</i>	COG1212: CMP-2-ceto-3-ácido deoxioctulosónico sintetase	M		#DIV/0!
_0049.0422	<i>rplT</i>	Proteína ribossomal L20	J		-2.251841963
_0049.0423	<i>rpmI</i>	Proteína ribossomal L35	J		-2.135316519
_0049.0424	<i>infC</i>	Factor 3 (IF-3) de iniciação da tradução	J		-2.059941698
_0049.0431	<i>thrS</i>	Treonil-trna sintetase	*		#DIV/0!
_0049.0475		Proteína portadora de acil	IQ		-2.019561297
_0049.0480	<i>rpmF</i>	Proteína ribossomal L32	J		-2.32483019
_0049.0481		Predita de ligação de metais, possivelmente proteína de ligação de ácido nucleico	R		-2.979585572
_0049.0487		Diguanilato ciclase	T	-14.06779617	
_0049.0524	<i>rluC</i>	Pseudouridilato sintases, 23S RNA-específico	J		-2.362112502
_0050.0010		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	#DIV/0!	#DIV/0!
_0050.0051	<i>atpB</i>	F0F1-tipo ATP sintase, subunidade a	C		-2.018894047
_0053.0002		Indolepiruvato ferredoxina oxidoreductase	*	#DIV/0!	
_0053.0005	<i>dsbS</i>	Proteína DsbB de formação de ligação disulfeto	O		-2.380320859
_0054.0009		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente ATPase	G		-5.325204711
_0054.0024		Regulador transcricional	K		-8.414564706
_0054.0074		Regulador transcricional	K	#DIV/0!	
_0054.0107		Proteína de membrana não caracterizada	S	-5.114795677	
_0055.0015	<i>eutB</i>	N-acetilglucosamina transferase tipo - O predita, família SPINDLY	O		#DIV/0!
_0055.0032	<i>hemK</i>	Regulador transcricional contendo um domínio amidase e um domínio HTH de ligação ao DNA do tipo AraC	K		#DIV/0!
_0055.0039		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*	-9.571193379	
_0058.0010		FOG: EAL domain	T		#DIV/0!
_0058.0010		FOG: GGDEF domain	T		#DIV/0!
_0058.0010		Signal transduction histidine quinase, nitrate/nitrite-specific	T		#DIV/0!
_0057.0011	<i>pilN</i>	Via de secreção do tipo II, componente PulD	NU		#DIV/0!
_0058.0018		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		#DIV/0!
_0058.0036		Proteína de membrana predita	S		-4.801824869
_0058.0070		Proteína de membrana	*		#DIV/0!
_0060.0006	<i>leuA</i>	Isopropilmalato/homocitrato/citramalato sintase	E	-3.505099328	-2.205684168
_0062.0002	<i>tig</i>	peptidil-prolil cis-trans isomerase (Fator trigger) tipo FKBP	O		-2.627616879
_0064.0011	<i>hisC</i>	Histidinol-fosfato/aromático aminotransferase e ácido cobiútrico descarboxilase	E		-4.269135445
_0065.0003		Complexo piruvato/2-oxoglutarato desidrogenase, dihidrolipoamida desidrogenase (E3), e enzimas relacionadas	C		-7.711929358
_0065.0041	<i>cirA</i>	Proteína do receptor de membrana externa principalmente transporte de Fe	P	#DIV/0!	
_0065.0043	<i>uraH</i>	Proteína tipo transtiretina	R		-4.72844005
_0065.0045	<i>fiu</i>	Receptor de membrana externa para catecóis	P	#DIV/0!	

		monoméricos			
_0065.0057	<i>xdhA</i>	Xantina desidrogenase, cluster ferro-enxofre e subunidade A de ligação FAD	F	-2.795125525	-2.634460756
_0065.0058	<i>xdhB</i>	Xantina desidrogenase, Subunidade de ligação a molibdopterina B	F	-2.811098273	-3.23505702
_0065.0085		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	-3.321577921	-3.06766893
_0065.0089		Cadeia beta da triptofano sintase	E		-2.149619712
_0065.0092	<i>fimV</i>	Proteína FimV de montagem do pilus Tfp	NU	-2.456105314	
_0068.0028	<i>nuoC</i>	NADH: ubiquinona oxidoreductase subunidade 27 kD	C		-2.917381305
_0068.0029	<i>nuoB</i>	NADH: ubiquinona oxidoreductase subunidade 20 kD e Fe-S oxidoreductase relacionadas	C		-2.276813643
_0068.0030	<i>nuoA</i>	NADH: ubiquinona oxidoreductase subunidade 3 (Cadeia A)	C		-2.530825955
_0068.0043	<i>rpsA</i>	Proteína ribossomal S15P/S13E	J		-3.677445609
_0068.0065	<i>ilvI</i>	Thiamina pirofosfato-requerendo enzimas [acetolactato sintase, piruvato Desidrogenase (citocromo), glioxilato carboligase, fosfonopiruvato descarboxilase]	EH	-2.081739267	
_0068.0081	<i>suhB</i>	Archaeal frutose-1,6-bisfosfatase e enzimas relacionadas da família inositol monofosfatase	G		-4.331004274
_0068.0084	<i>rhlE</i>	Superfamília II DNA e RNA helicase	LKJ	-2.024595371	-3.130187253
_0068.0085		Acetiltransferase	R		-3.656954405
_0068.0109		Proteína de quimiotaxia Metil-receptora	NT	-6.012183023	
_0071.0089	<i>catD</i>	Hidrolase predita ou aciltransferases (superfamília alfa/beta hidrolase)	R	#DIV/0!	
_0079.0050	<i>msrA</i>	Protease tipo-proteassoma predita	O	-2.877346892	-2.685961593
_0079.0070	<i>grpE</i>	---NA---	*	-4.349958105	-5.01292094
_0079.0079	<i>dapB</i>	Dihidrodipicolinato redutase	E		-2.086081901
_0079.0117		Proteína de transdução de sinal predita contendo um domínio de membrana, um domínio EAL e um domínio GGDEF	T	-4.510174	
_0084.0039		Regulador de resposta contendo um domínio receptor tipo-CheY e um domínio de ligação a DNA de winged-helix	TK	-133.0569746	-52.0632956
_0084.0075	<i>paaJ</i>	Acetil-CoA acetiltransferase	I	-2.665453139	
_0084.0078		Sistema de transporte tipo-ABC de aminoácidos de cadeia ramificada, componente periplasmático	E		-3.891841002
_0093.0001	<i>rhlE</i>	Superfamília II DNA e RNA helicase	LKJ	-7.224847384	-8.538540108
_0093.0020	<i>rhlE</i>	Superfamília II DNA e RNA helicase	LKJ	-7.525421462	-7.720650102
_0093.0054	<i>P</i>	Receptor de membrana externa para catecóis monoméricos		#DIV/0!	
_0095.0018	<i>rpsP</i>	Proteína ribossomal S16	J		-2.535082872
_0095.0019	<i>rimM</i>	Proteína RimM, necessária para processamento de rRNA 16S	J		-4.341815186
_0095.0020	<i>trmB</i>	Proteína RimM, necessária para processamento de rRNA 16S	J		-3.28841467
_0095.0024		Histona acetiltransferase tipo-hpa2 acetiltransferase	*		-16.49050825
_0095.0028	<i>trpS</i>	Triptofanil-tRNA sintetase	J	-4.458663666	
_0095.0114	<i>purU</i>	Formiltetrahidrofolato hidrolase	F		-3.282344454
_0095.0117		Proteína de membrana	*	-4.058344946	
_0095.0118		---NA---	*	-3.838958724	
_0095.0119	<i>ttuC</i>	Isocitrato/isopropilalato desidrogenase	CE	-2.875760664	
_0104.0006	<i>fhaC</i>	Proteína de secretion/ativação da hemolisina	U		#DIV/0!
_0105.0012		Sulfato permease e transportadores relacionados (superfamília MFS)	P	-3.754080164	-4.271294056

_0105.0015		cAMP fosfodiesterase de baixa afinidade	T		-5.669138517
_0105.0018		Proteína de secreção/ativação da hemolisina	U		-2.816103398
_0105.0068		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	#DIV/0!	
_0107.0018	<i>obgE</i>	GTPase predita	R		-3.889100291
_0107.0019	<i>obgE</i>	GTPase predita	R		-2.001474521
_0107.0020	<i>rpmA</i>	Proteína ribossomal L27	J		-2.807086589
_0107.0021	<i>rplU</i>	Proteína ribossomal L21	J		-2.718679013
_0107.0030	<i>infA</i>	Fator 1 (IF-1) de iniciação da tradução	J	-5.304772439	-5.324051716
_0110.0026		Sistema de transporte tipo ABC de açúcar, componente ATPase	G		-8.785655812
_0110.0032	<i>phoH</i>	Proteína PhoH induzida pela deficiência de fosfato, predita ATPase	T		-3.034259337
_0110.0076		Regulador transcricional	K		-5.3901071
_0110.0085	<i>rpoD</i>	RNA polimerase sigma 70	*	-3.757954399	
_0110.0097	<i>rho</i>	Fator de terminação da transcrição	K	-2.838777711	-3.184463018
_0111.0019		ATPase predita	R		-3.162347874
_0111.0027		Regulador transcricional	K		-7.464830376
_0111.0065		componente citocromo oxidase tipo-cbb3	*	-2.486141297	
_0118.0012	<i>lysS</i>	Lisil-tRNA sintetase (classe II)	J	-2.46528788	-4.475786115
_0118.0037		High-affinity Fe <sup>2+</sup> permease	P		-5.330713331
_0118.0045	<i>adhC</i>	Álcool desidrogenase Zn-dependente, classe III	C		-2.46316656
_0118.0046		Esterase predita	R	-2.609981956	
_0118.0051	<i>emrA</i>	Bomba de efluxo de resistência a multidrogas	V		-8.887552556
_0118.0056		Proteína hipotética	*		-3.121765953
_0118.0058		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		#DIV/0!
_0118.0094		Transportador de cobalto	*		#DIV/0!
_0118.0095		Proteína integral de membrana predita	S		#DIV/0!
_0118.0096	<i>cobN</i>	Ferredoxina	C		-10.70009367
_0118.0097	<i>cobN</i>	Cobalamina biossíntese proteína CobN e quelatase-Mg relacionadas	H		-3.184113718
_0118.0098	<i>chlI</i>	Quelatase de magnésio (Mg), subunidade ChII	H		-2.474189469
_0118.0098	<i>chlI</i>	Quelatase de magnésio (Mg), subunidade ChII	H	-2.144771953	
_0118.0098	<i>chlI</i>	Quelatase de magnésio (Mg), subunidade ChID	H	-1.144771953	
_0118.0099	<i>cobL</i>	Precorrin-6B metilase 1	H		-5.042707362
_0118.0100	<i>cobH</i>	Precorrin isomerase	H		-2.252210378
_0118.0100		Proteína conservada não caracterizada	S		
_0118.0101	<i>cbiD</i>	Cobalamina biossíntese proteína CbiD	H	-17.3356512	-11.61074691
_0118.0107	<i>cobA</i>	ATP: Corrinóide adenosiltransferase	H		-2.354679817
_0118.0112	<i>cobC</i>	Histidinol-fosfato/aromático aminotransferase e ácido <i>cobyric</i> decarboxilase	E		-5.569684813
_0118.0143		Regulador transcricional	K		-3.64517718
_0118.0163	<i>gcvT</i>	Aminometiltransferase predita relacionada com GcvT	R		-2.883983232
_0118.0208	<i>hlyD</i>	Bomba de efluxo de resistência a multidrogas	V		-2.413029906
_0118.0240	<i>caiA</i>	Acil-CoA desidrogenases	I		#DIV/0!
_0118.0243	<i>adhC2</i>	Álcool desidrogenase Zn-dependente, classe III	C	-6.763806989	
_0119.0012		Proteína de membrana	*		-2.954132301
_0127.0044		Proteína de ancoragem de superfície da parede celular	*	#DIV/0!	
_0127.0064	<i>fhuA</i>	Receptor de membrana externa para catecóis monoméricos	P	-6.019865316	
_0127.0147		Sistema de transporte tipo ABC de ion metal, ATPase component	P		-8.60163557
_0127.0151		CMP-2-ceto-3-deoxioctulosônico ácido	M		-2.927531301

		sintetase			
_0131.0025		Proteína hipotética	*		-7.020597308
_0134.0024	<i>ssuF</i>	Proteína de ligação Molibdopterina	H		-45.02173926
_0134.0025	<i>ssuB</i>	Sistema de transporte metal ion do tipo ABC, componente ATPase	P		-10.77533768
_0134.0026	<i>ssuC</i>	Sistema de transporte de nitrato/sulfonato/bicarbonato do tipo ABC, componente permease	P		#DIV/0!
_0135.0025	<i>tyrS</i>	Tirosil-tRNA sintetase	J		-2.587790879
_0135.0046	<i>thuC</i>	proteína ThiC de biossíntese de tiamina	H	-17.54562628	-19.88687368
_0135.0047		Proteína de transferência de enxofre envolvida na biossíntese tiamina	H	#DIV/0!	#DIV/0!
_0135.0048	<i>thiG</i>	Enzima não caracterizada de biossíntese de tiazole	H		#DIV/0!
_0135.0049	<i>thuD</i>	Hidroximetilpirimidina / fosforometilpirimidina quinase	H		-4.045953902
_0135.0054	<i>pheA</i>	Corismato mutase	E		#DIV/0!
_0141.0011	<i>pth</i>	Peptidil-tRNA hidrolase	J		-4.005374375
_0147.0025	<i>cspS</i>	Proteínas de choque de frio	K	-2.92533629	-3.789729442
_0147.0031	<i>aer</i>	Proteína quimiomotaxia metil-receptora	NT		
_0153.0004		MULTI ESPÉCIES: proteína hipotética	*		-5.995908546
_0153.0013	<i>pmbA</i>	Proteases Zn-dependente predita e seus homólogos inativados	R		-2.068073874
_0153.0019	<i>marR</i>	Regulador transcricional	K	-2.075330321	
_0155.0007	<i>rpe</i>	Pentose-5-fosfate-3-epimerase	G	-5.359645046	-8.391761325
_0155.0008	<i>gph</i>	Fosfatase predita	R		-5.479111415
_0155.0009	<i>trpE</i>	Antranilato/para-aminobenzoato sintases componente I	EH	-3.202729309	-2.214185438
_0155.0010	<i>trpG</i>	Antranilato/para-aminobenzoato sintases componente II	EH	-3.236860936	
_0159.0038	<i>rpoA</i>		K		-3.411608284
_0159.0026	<i>engB</i>	GTPase predita	R	-3.846360369	
_0159.0039	<i>rpsD</i>	Proteína ribossomal S4 e proteínas relacionadas	J	-2.948741905	-5.187232218
_0159.0041	<i>rpsM</i>	Proteína ribossomal S13	J	-2.220801881	
_0159.0042	<i>rpmJ</i>	Proteína ribossomal L36	J	-2.019389414	
_0159.0043	<i>infA</i>	Fator 1 (IF-1) de iniciação da tradução	J	-3.057422032	-4.475786115
_0159.0044	<i>secY</i>	Preproteína translocase subunidade SecY	U		-2.151861045
_0159.0046	<i>rmpD</i>	Proteína ribossomal L30/L7E	J		-3.119798598
_0159.0047	<i>rpsE</i>	Proteína ribossomal S5	J		-2.081891327
_0159.0048	<i>rplR</i>	Proteína ribossomal L18	J		-2.330253269
_0159.0049	<i>rplF</i>	Proteína ribossomal L6P/L9E	J		-2.622180497
_0159.0050	<i>rpsH</i>	Proteína ribossomal S8	J	-2.036334044	
_0159.0051	<i>rpsN</i>	Proteína ribossomal S14	J	-2.595367683	-7.030624794
_0159.0052	<i>rplE</i>	Proteína ribossomal L5	J	-2.056783155	-4.201035464
_0159.0053	<i>rplX</i>	Proteína ribossomal L24	J		-4.337829111
_0159.0054	<i>rplN</i>	Proteína ribossomal L14	J	-2.383436142	-5.372208019
_0159.0055	<i>rpsQ</i>	Proteína ribossomal S17	J	-2.233575444	
_0159.0059	<i>rplV</i>	Proteína ribossomal L22	J	-2.260199928	
_0159.0063	<i>rplD</i>	Proteína ribossomal L4	J	-2.573545598	-4.29973211
_0159.0064	<i>rplC</i>	Proteína ribossomal L3	J	-2.371108713	-3.129693383
_0162.0014		Proteína da cauda	*		-9.66679318
_0162.0015		Simporte soluto:sódio	ER		-3.347508868
_0162.0019		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S		-2.251680197
_0162.0020		Proteína conservada não caracterizada	S		-5.11158305

_0163.0028		ADP-heptose sintase, quinase de açúcar bifuncional/adenililtransferase	M		-6.093793311
_0164.0006	<i>argH</i>	Argininosuccinato liase	E		-2.472883208
_0164.0017	<i>prfC</i>	Fator RF-3 de libertação da cadeia de peptídeo	J		-2.13392942
_0166.0017	<i>ilvA</i>	Treonina Desidratase	E		-18.79282588
_0166.0019		Hemolisina parcial	*	-2.933636418	
_0167.0032		Desidrogenase FAD-dependente não caracterizada	R		-3.652421803
_0167.0080	<i>dnaA</i>	ATPase envolvida na iniciação da replicação do DNA	L		-2.661649722
_0182.0001	<i>rpsJ</i>	Proteína ribossomal S10	J	-3.03501572	
_0203.0001		Proteína não caracterizada conservada em bactérias	S	#DIV/0!	
_0203.0032		lacase	S		-2.19769563
_0203.0066		ATPase	R		-2.607232073
_0203.0077	<i>ndk</i>	Nucleosídeo difosfato quinase	F	-2.549367572	-2.302145984
_0203.0078		Enzima redox predita do Fe-S-cluster	R	-2.136852425	-2.096425055
_0203.0095	<i>prpC</i>	Citrato sintase	C		-3.243880516
_0203.0118	<i>cheZ</i>	Proteína ligada a quimiotaxia	NT		-2.292018982
_0203.0126		Proteína conservada não caracterizada	*		-2.965746585
_0203.0137	<i>gltX</i>	Glutamil- e glutaminil-tRNA sintetases	J		-3.389111884
_0203.0152	<i>efp</i>	Fator P (EF-P) de elongação da tradução /Fator 5A (eIF-5A) da iniciação da tradução	J	-2.411012257	-3.770560948
_0203.0154	<i>marR</i>	Reguladores transcricionais	K	-3.06850599	-4.112529055
_0203.0155	<i>osmC</i>	Proteína redox Predida, regulador da formação de ligação dissulfeto	O		-2.49319046
_0203.0158	<i>cydB</i>	Citocromo tipo-bd quinol oxidase, subunidade 2	C	-4.865275309	
_0203.0159	<i>cydA</i>	Citocromo tipo-bd quinol oxidase, subunidade 1	C	-3.512946032	-3.609237463
_0203.0166	<i>mrsA</i>	Peptídeo metionina sulfóxido redutase	O		
_0203.0196	<i>cspD</i>	Proteínas de choque frio	K		-2.784977147
_0206.0036		Desidrogenases de cadeia curta de várias especificidades de substrato	R		
_0219.0003	<i>carA</i>	Carbamoilfosfato sintase subunidade pequena	EF	-2.831250988	-4.303526027
_0219.0006		Proteína de ligação ao RNA predita contendo o domínio KH, possivelmente proteína ribossomal	J		-3.278087547
_0219.0017	<i>uup</i>	Componentes ATPase do transportador ABC com dois domínios ATPase	R		-3.63190277
_0219.0020	<i>rpsT</i>	Proteína ribossomal S20	J		-2.111566178
_0219.0024	<i>icd</i>	Isocitrato desidrogenases	C		-2.250773946
_0219.0033	<i>ileS</i>	Isoleucil-tRNA sintetase	J		-2.281920922
_0219.0034	<i>rifB</i>	Flavina adenina dinucleótido (FAD) sintase	H		-3.096567463
_0225.0003		Proteína conservada não caracterizada	S		-2.132984485