

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTEVAN RAFAEL TOMAZINI

DETERMINAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO DE *Herbaspirillum*
rubrisubalbicans COM *Sorghum bicolor*.

CURITIBA

2022

ESTEVAN RAFAEL TOMAZINI

DETERMINAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO DE *Herbaspirillum*
rubrisubalbicans COM *Sorghum bicolor*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Dr^o Rose Adele Monteiro

Co orientador: Dr^o Eduardo Balsanelli

CURITIBA

2022

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

Tomazini, Estevan Rafael.

Determinação de genes envolvidos na interação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* com *Sorghum bicolor*. / Estevan Rafael, Tomazini. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Rose Adele Monteiro.
Coorientador: Eduardo Balsanelli.

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

1. Herbaspirillum. 2. Secreção. 3. Interação animal - planta. 4. Sorgo. I. Título. II. Monteiro, Rose Adele. III. Balsanelli, Eduardo. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ESTEVAN RAFAEL TOMAZINI** intitulada: **DETERMINAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA INTERAÇÃO *Herbaspirillum rubrisubalbicans* COM *O Sorghum bicolor***, sob orientação da Profa. Dra. ROSE ADELE MONTEIRO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 08 de Abril de 2022.

Assinatura Eletrônica
06/08/2022 17:12:08.0
ROSE ADELE MONTEIRO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
19/04/2022 13:52:24.0
ANA CLAUDIA BONATTO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
27/04/2022 10:47:42.0
FABIO LOPES OLIVARES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE
FLUMINENSE DARCY RIBEIRO)

Assinatura Eletrônica
19/04/2022 21:18:45.0
RODRIGO VASSOLER SERRATO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 175785

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 175785

Dedico esse trabalho a Deus

“Coisas boas são lembradas, as más são sentidas”

Provérbio judaico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os envolvidos nesse trabalho. Àquela que permitiu o início das minhas atividades em janeiro de 2010, minha orientadora Rose Adele Monteiro. Também ao meu co-orientador Eduardo Balsanelli, pelos protocolos e auxílio e ao PI Emmanuel Maltempi de Souza pelas sugestões feitas durante as reuniões de grupo.

Ao professor Euan Kevin James, que permitiu uma breve experiência com microscopia eletrônica no grupo de estudos do professor Pete Landetta, no Instituto James Hutton no Reino Unido.

Aos técnicos pelo suporte, principalmente a senhora Roseli Prado pelos preparos dos diversos materiais utilizados durante esses 12 anos.

A banca interna, professores Rodrigo Vassoler Serrato e Luciano Fernandes Huergo, pelas correções, sugestões e reestruturação da tese durante a qualificação.

A banca de defesa de tese, novamente o professor Rodrigo Vassoler Serrato como participante da banca interna, e aos professores Fabio Lopes Olivares e Ana Claudia Bonatto como participantes da banca externa, pela revisão, análises e críticas feitas - que pela 1^o vez, me trouxeram motivação para querer continuar na ciência.

Essa tese fecha um longo capítulo na minha vida, infelizmente de forma subta e estressante, mas um capítulo muito importante que levou à autocríticas e crescimento pessoal.

RESUMO

Herbaspirillum rubrisubalbicans M1 é um fitopatógeno leve diazotrófico capaz de se associar e promover o crescimento vegetal em diversas gramíneas de interesse econômico. A interação planta-bactéria é um processo complexo e envolve diversas estruturas macromoleculares, como: flagelos, pilus, biofilme e sistemas de secreção. Uma das estruturas menos compreendidas desse processo é o sistema de secreção tipo VI (T6SS). O T6SS está diretamente relacionado com a comunicação entre a célula e o ambiente, pode exercer efeitos patogênicos ou mesmo facilitar a colonização e a simbiose, mediando a especificidade na interação com a bactéria. Para compreender melhor as estruturas e genes envolvidos na interação planta-bactéria de *H. rubrisubalbicans* M1, genes relacionados com a interação de *H. rubrisubalbicans* M1 com *Sorghum bicolor* foram selecionados a partir de estudos prévios e foram selecionados genes com expressão gênica diferencial positiva para a adesão (dia 0) e colonização epifítica nos dias 1 e 3. A partir dessa análise foram construídas 30 mutantes através da interrupção do gene selvagem com cassete de resistência a Canamicina e foram avaliados quanto aos fenótipos relacionados com a interação planta-bactéria: Perfis de colonização, Perfis de geração de sinais da estria vermelha em cultivares susceptíveis de *Sorghum bicolor*, ensaios de motilidade, perfil de formação de biofilme e ensaios de competição durante a colonização das raízes do sorgo. Os resultados mostram envolvimento claro de um transportador tipo ABC de açúcares (gene Hrubri_0835) e das proteínas efetoras Hcp e VgrG dos sistemas de secreção tipo VI, com maior envolvimento do cluster-II na interação planta-bactéria. Os resultados ainda sugerem que o cluster-II do T6SS está relacionado com a interação planta-bactéria e que o Hcp do *H. rubrisubalbicans* está diretamente relacionado com a estria vermelha do sorgo, seja mediando diretamente a doença ou carregando a proteína efetora relacionada com o processo-doença.

Palavras-chave: *Herbaspirillum*, T6SS, interação planta-bactéria.

ABSTRACT

Herbaspirillum rubrisubalbicans M1 is a diazotrophic mild pathogen capable to associate and to promote plant growth to several types of grasses of economic interest. Plant-bacterium interactions are a complex process involving several macromolecular structures such as flagella, pili, biofilm, and secretion systems. One of the least understood structures of this process is the type VI secretion system (T6SS). The T6SS is directly related to the communication between the cell and the environment, it can exert pathogenic effects or even facilitate colonization and symbiosis, mediating specificity in the interaction with the bacteria. To better understand the structures and genes involved in the plant-bacterium interaction of *H. rubrisubalbicans* M1, genes related to the interaction of *H. rubrisubalbicans* M1 with *Sorghum bicolor* were selected from previous studies, and the genes with positive differential gene expression were selected for the adhesion (day 0) and epiphytic colonization on days 1 and 3. From this analysis we built 30 mutants by interrupting the wildtype gene with kanamycin resistance cassette and evaluated them for phenotypes related to plant-bacteria interaction: colonization profiles, generations of red stripe disease signals in a susceptible cultivar of *Sorghum bicolor*, motility tests, biofilm formation profile and competition tests during the colonization of sorghum roots. Our results show a clear involvement of an ABC transporter of sugars (Hrubri_0835 gene) and of the Hcp and VgrG effector proteins of type VI secretion systems, with greater involvement of cluster-II in the plant-bacterium interaction. The results suggest that T6SS cluster-II is related to the plant-bacteria interaction and that the hcp of *H. rubrisubalbicans* M1 is directly related to the red stripe disease in sorghum, either directly mediating the disease or carrying the effector protein related to the disease process.

Keywords: *Herbaspirillum*, T6SS, plant-bacteria interactions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|-----|
| FIGURA 1: Esquema de plantio hidropônico e inóculo em tubo de ensaio. | 77 |
| FIGURA 2: Esquema dos ensaios de adesão, colonizações epifítica e endofítica.... | 78 |
| FIGURA 3: Configuração do operon <i>HRubri_0065HRubri_0066HRubri_0067</i> | 84 |
| FIGURA 4: Representação do operon <i>adhAglpR</i> | 89 |
| FIGURA 5: Configuração do operon <i>xyID</i> | 98 |
| FIGURA 6: Configuração do operon <i>HRubri_0934HRubri_0935</i> | 100 |
| FIGURA 7: Configuração do operon <i>nifB</i> | 105 |
| FIGURA 8: Configuração do operon <i>HRubri_2937HRubri_2938</i> | 112 |
| FIGURA 9: Configuração do operon <i>HRubri_3947HRubri_3948</i> | 116 |
| FIGURA 10: Clusters dos T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1. | 121 |
| FIGURA 11: Estrutura do operon TSS6-II. | 126 |
| FIGURA 12: Configuração do operon 3 do T6SS-I <i>HRubri_3992 HRubri_3993 HRubri_3994 HRubri_3995</i> | 136 |
| FIGURA 13: Configuração do operon único do cluster-II do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1. | 143 |
| FIGURA 14: Configurações dos possíveis operons 1 e 2 do T6SS-I de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 | 143 |
| FIGURA 15: Configurações dos possíveis operons 3 e 4 do T6SS-I de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 | 144 |
| FIGURA 16: Configurações dos possíveis operons 5 e 6 do T6SS-I de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 | 145 |
| FIGURA 17: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS em 3 horas de crescimento. | 147 |
| FIGURA 18: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS em 6 horas de crescimento. | 148 |
| FIGURA 19: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS em 12 horas de crescimento. | 149 |
| FIGURA 20: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de EDTA..... | 150 |
| FIGURA 21: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS em meio mínimo. | 151 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 22: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de raiz integra..... | 152 |
| FIGURA 23: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de 100 mg de extrato de raízes de <i>Sorghum bicolor</i> | 153 |
| FIGURA 24: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de 1000 mg de extrato de raízes de <i>Sorghum bicolor</i> | 154 |
| FIGURA 25: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de extrato de cana-de-açúcar susceptível a estria mosqueada. | 155 |
| FIGURA 26: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de estresse oxidativo..... | 156 |
| FIGURA 27: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de forte estresse oxidativo | 157 |
| FIGURA 28: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de competição com bactéria não relacionada com o gênero <i>Herbaspirillum</i> | 158 |
| FIGURA 29: Competição direta entre as estirpes selvagens de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>H. seropedicae</i> SmR1. | 161 |
| FIGURA 30: Competição direta entre as estirpes selvagens de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> Sp7. | 161 |
| FIGURA 31: Competição entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e a estirpe Hrubri_2309 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 162 |
| FIGURA 32: Competição entre <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e a estirpe Hrubri_2309 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 162 |
| FIGURA 33: Competição entre <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e a estirpe Hrubri_2312 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 163 |
| FIGURA 34: Competição entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e a estirpe Hrubri_2312 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 163 |
| FIGURA 35: Competição entre <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e a estirpe Hrubri_2313 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 164 |
| FIGURA 36: Competição entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e a estirpe Hrubri_2313 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 164 |
| FIGURA 37: Competição entre <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e a estirpe Hrubri_2319 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 165 |
| FIGURA 38: Competição entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e a estirpe Hrubri_2319 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 165 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 39: Competição entre <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e a estirpe Hrubri_2320 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 166 |
| FIGURA 40: Competição entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e a estirpe Hrubri_2320 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 166 |
| FIGURA 41: Competição entre <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e a estirpe Hrubri_3993 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 167 |
| FIGURA 42: Competição entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e a estirpe Hrubri_3993 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 167 |
| FIGURA 43: Competição entre <i>A. brasilense</i> Fp2 e a estirpe Hrubri_3993 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 168 |
| FIGURA 44: Competição entre <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e a estirpe Hrubri_3994 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 168 |
| FIGURA 45: Competição entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e a estirpe Hrubri_3994 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 169 |
| FIGURA 46: Competição entre <i>A. brasilense</i> FP2 e a estirpe Hrubri_3994 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 169 |
| FIGURA 47: Competição entre <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e a estirpe Hrubri_3995 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 170 |
| FIGURA 48: Competição entre <i>H. seropedicae</i> SmR1 e a estirpe Hrubri_3995 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 170 |
| FIGURA 49: Competição entre <i>A. brasilense</i> FP2 e a estirpe Hrubri_3995 do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 171 |
| FIGURA 50: Alinhamento de sequências de <i>Azoarcus indigens</i> TT-132 | 172 |
| FIGURA 51: Micrografia feita via TEM de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> 322. | 174 |
| FIGURA 52: Micrografia feita via TEM de <i>Herbaspirillum frisingense</i> 970. | 175 |
| FIGURA 53: Micrografia feita via TEM de <i>Herbaspirillum frisingense</i> 970. | 176 |
| FIGURA 54: Micrografia feita via TEM de <i>Azoarcus indigens</i> VB32T. | 177 |
| FIGURA 55: Micrografia feita via TEM de <i>Azoarcus indigens</i> TT-142..... | 178 |
| FIGURA 56: Motilidade tipo “Swimming” em ágar semissólido 0,15% das estirpes do instituto James Hutton. | 179 |
| FIGURA 57: Motilidade tipo “Swarming” em ágar semissólido 0,3% das estirpes do instituto James Hutton. | 180 |
| FIGURA 58: Motilidade tipo “Twitching” em ágar semissólido 0,75% das estirpes do instituto James Hutton. | 181 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 59: Ensaio de colonização. Adesão, colonização epifítica e colonização endofítica de raízes de <i>Sorghum bicolor</i> por <i>H. rubrisubalbicans</i> e seus mutantes. | 187 |
| FIGURA 60: Ensaio de colonização. Adesão, colonização epifítica e colonização endofítica de raízes de <i>Sorghum bicolor</i> por <i>H. rubrisubalbicans</i> e seus mutantes. | 188 |
| FIGURA 61: Ensaio de colonização. Adesão, colonização epifítica e colonização endofítica de raízes de <i>Sorghum bicolor</i> por <i>H. rubrisubalbicans</i> e seus mutantes. | 189 |
| FIGURA 62: Perfil de colonização do T6SS cluster-I. | 191 |
| FIGURA 63: Perfil de colonização do T6SS cluster-II. | 192 |
| FIGURA 64: Perfil de competição durante a adesão às raízes de sorgo contra estirpe selvagem de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1. | 194 |
| FIGURA 65: Perfil de competição durante a colonização endofítica contra estirpe selvagem de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 dia 1 após inoculação. | 195 |
| FIGURA 66: Perfil de competição durante a colonização endofítica contra estirpe selvagem de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 dia 3 após inoculação. | 196 |
| FIGURA 67: Perfil de competição durante a colonização endofítica contra estirpe selvagem de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 dia 7 após inoculação. | 197 |
| FIGURA 68: Perfil de competição durante a colonização endofítica contra estirpe selvagem de <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 dia 10 após inoculação. | 198 |
| FIGURA 69: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. | 200 |
| FIGURA 70: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. | 201 |
| FIGURA 71: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. | 202 |
| FIGURA 72: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. | 203 |
| FIGURA 73: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. | 204 |
| FIGURA 74: Formação de biofilme em função do tempo. | 206 |
| FIGURA 75: Formação de biofilme em função do tempo para estirpes mutantes do T6SS. | 208 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 76: Teste de secreção de polissacarídeos utilizando vermelho congo. | 210 |
| FIGURA 77: Motilidade tipo 'swarming'..... | 212 |
| FIGURA 78: Motilidade tipo 'swarming' das estirpes mutantes do grupo 2-T6SS...213 | |
| FIGURA 79: Estirpes que não geraram sinais necróticos em <i>Sorghum bicolor</i> | 216 |
| FIGURA 80: Estirpes causadoras de doença da estria vermelha no sorgo suscetível. | 216 |
| FIGURA 81: Formação de sinais necróticos por mutantes do T6SS em <i>Sorghum bicolor</i> | 218 |
| FIGURA 82: mutante Hrubri_2312 causa estria vermelha em plântulas. | 218 |
| FIGURA 83: Inoculação com mutante Hrubri_2313 compromete o crescimento de <i>Sorghum bicolor</i> | 219 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1: Chave taxonômica do gênero <i>Herbaspirillum spp.</i> | 28 |
| TABELA 2: Espécies do gênero <i>Herbaspirillum spp.</i> | 29 |
| TABELA 3: Estirpes e mutantes utilizados neste trabalho..... | 54 |
| TABELA 4: Plasmídios utilizados e construídos neste trabalho. | 59 |
| TABELA 5: Preparo de estoques e concentrações usuais dos antibióticos utilizados neste trabalho..... | 63 |
| TABELA 6: Lista de primers utilizados nesse trabalho..... | 64 |
| TABELA 7: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0065..... | 86 |
| TABELA 8: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0505..... | 88 |
| TABELA 9: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0762..... | 90 |
| TABELA 10: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0842..... | 93 |
| TABELA 11: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_1953..... | 95 |
| TABELA 12: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0835..... | 97 |
| TABELA 13: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0839..... | 100 |
| TABELA 14: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0935..... | 102 |
| TABELA 15: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_1197..... | 104 |
| TABELA 16: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2391..... | 107 |
| TABELA 17: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2483..... | 109 |
| TABELA 18: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2585..... | 111 |
| TABELA 19: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2937..... | 114 |
| TABELA 20: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3783..... | 116 |
| TABELA 21: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3948..... | 118 |
| TABELA 22: Genes do T6SS em <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 123 |
| TABELA 23: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2309..... | 128 |
| TABELA 24: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2312..... | 130 |
| TABELA 25: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2313..... | 132 |
| TABELA 26: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2319..... | 134 |
| TABELA 27: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2320..... | 135 |
| TABELA 28: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3993..... | 138 |
| TABELA 29: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3994..... | 140 |
| TABELA 30: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3995..... | 142 |

| | |
|---|-----|
| TABELA 31: Taxas de crescimento das estirpes desenvolvidas a partir do transcriptoma de interação <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1 – <i>Sorghum bicolor</i> | 185 |
| TABELA 32: Taxas de crescimento das estirpes mutantes do T6SS de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1. | 185 |
| TABELA 33: Competência na competição durante a colonização da estirpe selvagem em relação a estirpe mutante. | 190 |
| TABELA 34: Competência na competição durante a colonização da estirpe selvagem em relação a estirpe mutante. | 191 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

Amp - ampicilina

ATP – adenosina trifosfatada

Cm – cloranfenicol

D.O – densidade ótica

EPS - exopolissacarídeos

Genes *Imp* – do inglês “*impaired colonization genes*”

Genes *Tss* – do inglês “*type six secretion genes*”

Hcp – do inglês “*homolisin co-regulated protein*”

Kb – mil pares de bases

Km - Canamicina

LPS – lipopolissacarídeos

ONPG – O-nitrofenol- β -galatopiranosose

PAAR – motivo “prolina-alanina-alanina-arginina”

Pb – pares de base

PCR – do inglês “*polymerase chain reaction*”

PHB - polihidroxiacetato

Primer – oligo ribonucleotídeo iniciador

RPM – revoluções por minuto

T3SS – sistema de secreção tipo III

T6SS – sistema de secreção tipo VI

TAE – Tampão tris-acetato EDTA

Tc - tetraciclina

VgrG – do inglês “*valine-glycine rich repeat protein G*”

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1. <i>Sorghum bicolor</i> : PRODUÇÃO, DEMANDA E POTENCIAL NO BRASIL | 24 |
| 1.2. FERTILIZANTES..... | 25 |
| 1.3. GENEROS BACTERIANOS UTILIZADOS NESSE TRABALHO | 26 |
| 1.3.1. Gênero <i>Herbaspirillum spp.</i> | 27 |
| 1.4. <i>Azoarcus indigenes</i> | 32 |
| 1.5. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA | 33 |
| 1.5.1. Formação de biofilme | 36 |
| 1.5.2. Motilidade | 38 |
| 1.5.3. Competição bacteriana..... | 42 |
| 1.6. SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO VI (T6SS) | 45 |
| 2. OBJETIVOS | 51 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 53 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 54 |
| 4.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS | 54 |
| 4.2. PLASMÍDEOS..... | 59 |
| 4.3. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO | 62 |
| 4.4. ANTIBIÓTICOS..... | 63 |
| 4.5. PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO..... | 64 |
| 4.6. MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS | 68 |
| 4.7. TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR..... | 69 |
| 4.7.1. Extração de DNA genômico | 69 |
| 4.7.2. Extração e purificação de DNA plasmidial..... | 69 |
| 4.7.3. Eletroforese em gel de ágarose..... | 70 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.7.4. | Restrição do DNA | 71 |
| 4.7.5. | Ligação de fragmentos de DNA..... | 71 |
| 4.7.6. | Amplificação do DNA via PCR..... | 71 |
| 4.7.7. | Sequenciamento de DNA | 72 |
| 4.8. | TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA..... | 73 |
| 4.8.1. | Transformação bacteriana utilizando células quimiocompetêntes..... | 73 |
| 4.8.2. | Transformação bacteriana utilizando células eletrocompetêntes | 74 |
| 4.9. | MÉTODOS DE COMPETIÇÃO DIRETA | 74 |
| 4.9.1. | Competição em placa de 96 poços..... | 74 |
| 4.10. | ENSAIOS “ <i>in planta</i> ” | 75 |
| 4.10.1. | Desinfecção das sementes de milho e sorgo | 75 |
| 4.10.2. | Plantio de milho e sorgo | 76 |
| 4.10.3. | Inoculação das plântulas de milho e sorgo..... | 76 |
| 4.10.4. | Ensaio de adesão, colonização epifítica e endofítica de plântulas de milho..... | 77 |
| 4.10.5. | Ensaio de competição epifítica | 78 |
| 4.11. | DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 EM CAUSAR A DOENÇA DA ESTRIA VERMELHA EM CULTIVAR SUSCEPTÍVEL DE <i>Sorghum bicolor</i> | 79 |
| 4.12. | ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE BIOFILME ATRAVÉS DA FIBRA DE VIDRO | 79 |
| 4.13. | ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA β -GALACTOSIDASE | 80 |
| 4.14. | ENSAIOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO | 81 |
| 5. | RESULTADOS | 83 |
| 5.1. | CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 CONSTRUIDAS DEVIDO A MUTAÇÕES EM GENES QUE SÃO REGULADOS POSITIVAMENTE DURANTE A INTERAÇÃO ENTRE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 COM AS RAÍZES DE <i>Sorghum bicolor</i> | 83 |
| 5.1.1. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0065..... | 84 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 5.1.2. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0505..... | 86 |
| 5.1.3. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0762..... | 88 |
| 5.1.4. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_842..... | 91 |
| 5.1.5. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_1953..... | 93 |
| 5.1.6. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0835..... | 95 |
| 5.1.7. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0839..... | 97 |
| 5.1.8. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0935..... | 100 |
| 5.1.9. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_1197..... | 102 |
| 5.1.10. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2391..... | 104 |
| 5.1.11. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2483..... | 107 |
| 5.1.12. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2585..... | 109 |
| 5.1.13. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2937..... | 111 |
| 5.1.14. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3783..... | 114 |
| 5.1.15. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3948..... | 116 |
| 5.2. | RESULTADOS DOS MUTANTES REFERENTES AO TRANSCRIPTOMA DE INTERAÇÃO ENTRE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 COM AS RAÍZES DE <i>Sorghum bicolor</i> | 118 |
| 5.2.1. | ANÁLISE “IN SILICO” DO T6SS EM <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 119 |
| 5.2.2. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2309..... | 126 |
| 5.2.3. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2312..... | 128 |
| 5.2.4. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2313..... | 130 |
| 5.2.5. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2319..... | 132 |
| 5.2.6. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2320..... | 134 |
| 5.2.7. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3993..... | 135 |
| 5.2.8. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3994..... | 138 |
| 5.2.9. | Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3995..... | 140 |
| 5.3. | EXPRESSÃO GÊNICA DO T6SS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1..... | 142 |

| | |
|---|------------|
| 5.4. COMPETIÇÕES DIRETAS ENTRE AS ESTIRPES MUTANTES DO T6SS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 CONTRA OUTRAS ESTIRPES SELVAGENS. | 159 |
| 5.4.1. <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 versus <i>H. seropedicae</i> SmR1..... | 161 |
| 5.4.2. <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 versus <i>A. brasilense</i> SP7 | 161 |
| 5.4.3. Mutante Hrubri_2309 versus estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> Sp7 | 162 |
| 5.4.4. Mutante Hrubri_2312 versus estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> Sp7 | 163 |
| 5.4.5. Mutante Hrubri_2313 versus estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> Sp7 | 164 |
| 5.4.6. Mutante Hrubri_2319 versus estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> Sp7 | 165 |
| 5.4.7. Mutante Hrubri_2320 versus estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> Sp7 | 166 |
| 5.4.8. Mutante Hrubri_3993 versus estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> Sp7 | 167 |
| 4.20.9. Mutante Hrubri_3994 versus estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> SP7..... | 168 |
| 4.20.10. Mutante Hrubri_3995 versus estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i> SmR1, <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 e <i>A. brasilense</i> Sp7 | 169 |
| 5.5. ESTUDOS REALIZADOS NO INSTITUTO JAMES HUTTON DURANTE O DOUTORADO SANDUÍCHE..... | 171 |
| 5.5.1. Análise “ <i>in silico</i> ” de genes envolvidos na motilidade em <i>Azoarcus indigenes</i> VB32T e <i>Azoarcus indigenes</i> TTM91..... | 172 |
| 5.5.2. Micrografias das estirpes estudadas no instituto James Hutton | 173 |
| 5.5.3. ENSAIOS DE MOTILIDADE | 178 |
| 6. DISCUSSÃO | 183 |
| 6.1. CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 | 183 |

| | |
|--|------------|
| 6.2. DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE COLONIZAÇÃO EPIFÍTICA E ENDOFÍTICA DAS RAÍZES DE <i>Sorghum bicolor</i> PELAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. rubrisubalbicans</i> | 186 |
| 6.3. COMPETIÇÃO ENTRE A ESTIRPE SELVAGEM E AS ESTIRPES MUTANTES DE <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> M1 DURANTE A COLONIZAÇÃO DO <i>Sorghum bicolor</i> | 193 |
| 6.4. COMPARAÇÃO ENTRE O BIOFILME FORMADO PELA ESTIRPE SELVAGEM <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 E AS ESTIRPES MUTANTES. | 205 |
| 6.5. Ensaio de MOTILIDADE do tipo “ <i>Swarming</i> ” das estirpes selvagem e mutantes de <i>H. rubrisubalbicans</i> | 211 |
| 6.6. SINAIS DA ESTRIA VERMELHA DO SORGO | 214 |
| 6.6.1. Sinais da estria vermelha do sorgo: Transportador ABC de açúcares e porina de membrana externa (OmpW) afetam a capacidade de geração da doença em <i>H. rubrisubalbicans</i> M1. | 215 |
| 6.6.2. Sinais da estria vermelha do sorgo: Hcp do cluster-II do T6SS de <i>H. rubrisubalbicans</i> está relacionado com o processo-doença. | 217 |
| 6.7. EXPRESSÃO GÊNICA DOS CLUSTERS QUE CODIFICAM PARA O T6SS DE <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 | 219 |
| 6.8. COMPETIÇÕES DIRETAS | 222 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 225 |
| REFERÊNCIAS: | 228 |

1. INTRODUÇÃO

Segundo a organização das nações unidas, a população humana deve atingir cerca de 9,5 bilhões de pessoas até o ano de 2050. Além do crescimento populacional, teremos diversos fenômenos econômicos associados ao aumento do poder aquisitivo da população, como o aumento do consumo proteico na alimentação, que é diretamente ligado a produção pecuária. O aumento na demanda por proteínas faz com que seja necessária maior produtividade agrícola, levando a necessidade de contornar algumas grandes barreiras: a escassez das terras aráveis, produtividade agrícola máxima de grãos por metro quadrado e o efeito ambiental associado com esses eventos, devido à necessidade da utilização de fertilizantes e outros produtos químicos.

A utilização do sorgo (*Sorghum bicolor*) se apresenta como uma opção para tratar dos problemas relacionados com a escassez de terras e produção de grão, visto se tratar da principal monocultura plantada sob limitações hídricas, permitindo seu uso em regiões até então não consideradas para plantio. O sorgo também apresenta boas características nutricionais, próximas as do milho (*Zea mays*) com bom potencial de uso tanto para alimentação humana como para preparo de silagem e forragem utilizados na alimentação animal.

Quanto ao problema ambiental, uma alternativa interessante poderia ser empregar bactérias associativas. A interação planta-bactéria pode auxiliar, ou até mesmo suprir completamente, as necessidades nutricionais do vegetal. Pode diminuir a necessidade de fertilizantes nitrogenados através da fixação de nitrogênio e de fertilizantes KPS (potássio-fósforo-enxofre) através da solubilização de minerais, principalmente fosfatos e ferro, que levam a modulação da arquitetura radicular e dos receptores transmembranares. Além disso, a interação planta-bactéria também pode auxiliar na promoção do crescimento vegetal através da secreção de diversos metabólitos e do controle de pragas, através de pressão competitiva direta com a microbiota da rizosfera.

A interação planta-bactéria é um processo extremamente amplo, dependente de diversas vias bioquímicas. Pode ser dividida em etapas (competitividade na rizosfera, sensoriamento e quimiotaxia em direção a planta, adesão, colonização e

sintomas dessa interação). A competitividade na rizosfera se dá por diversas frentes, como na secreção de antibióticos, capacidades de motilidade e quimiotaxia em relação ao vegetal e capacidade de antagonismo direto (ou de contato) frente outros microrganismos. Uma das estruturas de antagonismo direto que também já foi mostrado como importante na colonização e simbiose na interação planta-bactéria é o sistema de secreção tipo VI. Uma vez que a bactéria associativa é competitiva, ela deve contar com a capacidade sensoriar e realizar a quimiotaxia em direção a planta, envolvendo sistemas de dois componentes e motores. Quando em contato com a planta, a primeira etapa da colonização é a adesão a superfícies radicular, comumente envolve diversas estruturas de superfícies como adesinas, canais iônicos, pilus do tipo IV e lipopolissacarídeos. A adesão precisa ser suficientemente forte, e por tempo suficiente para que a colonização epifítica se inicie. A colonização epifítica envolve formação de complexos macromoleculares como o biofilme. O biofilme, embora se trate de um ambiente estressante para a bactéria, é uma estrutura que funciona como um anteparo ambiental e de comunicação entre a microbiota local. A formação do biofilme é finamente regulada e específica, podendo envolver estruturas diferentes em espécies distintas de bactérias. Após a colonização epifítica, a bactéria pode adentrar o vegetal e iniciar a colonização endofítica, novamente, a colonização endofítica envolve diversas vias, visto que a disponibilidade de oxigênio e nutrientes é muito diferente dos observados fora do vegetal. Bactérias com estruturas de reservas como os polihidroxicanoatos (PHA) apresentam vantagem quanto a eventos estressantes (hídricos, térmicos e químicos) e podem representar uma estrutura chave na colonização eficiente.

Obviamente, nem sempre as interações planta-bactéria são apenas benéficas. No caso mostrado neste trabalho, o *H. rubrisubalbicans* M1 representa um patógeno leve para cultivares susceptíveis de cana-de-açúcar, gerando a doença da estria mosqueada, e de sorgo, gerando a doença da estria vermelha. Embora essas doenças não se apresentem como um problema econômico, pelo fato dos cultivares susceptíveis serem muito restritos, esses cultivares nos permitem compreender os genes e vias bioquímicas envolvidas no processo-doença. A compreensão das diversas vias bioquímicas e genes envolvidas na interação planta-bactéria nos gera informações valiosas, não apenas na interação entre *H. rubrisubalbicans* M1 e o *Sorghum bicolor*, na construção de bactérias (ou plantas) geneticamente modificadas para melhorar a produtividade agrícola em diversas frentes, como: através de

bactérias mais competitivas, que podem aumentar a probabilidade de interação bem como promover melhor biocontrole contra pragas. Inserção de genes que promovem seletividade em bactérias já consideradas superprodutivas, podendo estender a gama de vegetais que ela é capaz de interagir. Inativação de genes envolvidos com virulência, possibilitando a utilização de novas estirpes.

Concluindo essa breve introdução, nosso objetivo neste trabalho foi de buscar e analisar genes e vias bioquímicas envolvidas na interação planta-bactéria. Nos itens dispostos a seguir mostraremos informações relevantes, estratégias e a análise dos dados obtidos.

1.1. *Sorghum bicolor*: PRODUÇÃO, DEMANDA E POTENCIAL NO BRASIL

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma *Poaceae* propagada a partir do Norte da África e da Índia. O sorgo é geneticamente próximo do milho (*Zea mays*) e é 5º cereal mais produzido no mundo sendo utilizado na alimentação humana, silagem e matéria prima na produção de etanol (EMBRAPA, 2002). O sorgo conta com marcante resistência hídrica, sendo a principal monocultura cultivada no semiárido, principalmente na região Norte da África. Essa característica permite seu cultivo em regiões com distribuição irregular de chuvas ou ainda onde não fosse possível cultivar cereais que demandam melhores condições ambientais (SANTOS *et al.*, 1996).

Brasil tem observado marcante aumento na demanda por grãos, principalmente o milho, devido ao aumento dos setores pecuários. Essa demanda resulta no aumento da importação de grão, onerando o produtor e diminuindo suas Margens de lucro, principalmente pelo valor de transporte agregado ao preço (RIBAS *et al.*, 2002). O sorgo se apresenta como uma ótima alternativa ao milho não só pelo valor nutricional similar, como também pelo preço aproximadamente 25% menor. O sorgo forrageiro também representa a possibilidade de cultivo em regiões até então descartadas para essa função, como o semiárido do Centro-Oeste e Nordeste, permitindo novos nichos de produção e geração de empregos. Mostrando grande potencial econômico.

A produção brasileira de sorgo granífero vem crescendo. Em 1973 eram apenas 317 mil toneladas e em 2018 a produção ultrapassou 2,4 milhões de

toneladas, segundo dados oficiais do IBGE. Embora o crescimento tenha sido grande, o potencial para a utilização do sorgo no Brasil é muito grande. Parte da subutilização do sorgo no Brasil se dá por pouca informação e desconhecimento da planta pela população.

1.2. FERTILIZANTES

Nitrogênio e fósforo são os principais nutrientes que limitam o crescimento vegetal (SCHMID, 2006; PEÑUELAS *et al.*, 2012; ÅGREN *et al.*, 2012). Baixas concentrações de nitrogênio levam a um crescimento diminuído das partes superiores do vegetal, que deposita matéria seca na raiz para garantir sua sobrevivência, diminuindo a produtividade em vegetais de interesse econômico. A concentração de nitrogênio deve ser suficiente para que ele consiga ser transportado da raiz (alta concentração) até as porções sob crescimento primário (ERICSSON *et al.*, 1995). Esse problema é contornado com a suplementação do solo com adubos nitrogenados, principalmente ureia, porém a utilização dos mesmos pode ser deletéria para o meio ambiente (CAMARGO & ALONSO, 2006). Estima-se que entre 40 e 60% do total da produção se dá pelo efeito direto de fertilizantes (STEWART *et al.*, 2005).

A produção dos fertilizantes nitrogenados químicos modernos em larga escala e baixo preço só foi possível devido ao processo de Haber-Bosche (1912), que gera amônia a partir do nitrogênio atmosférico em condições de alta pressão e temperatura. Embora a intenção do uso desse processo fosse na produção de explosivos, um dos efeitos colaterais do processo de Haber-Bosche foi a produção de compostos nitrogenados muito mais baratos do que a priori. A produção de ureia barata permitiu o que se chamou de a revolução verde na década de 1960 nos Estados Unidos e Europa, levando ao aumento da produção agrícola sem precedentes, quebrando a expectativa Malthusiana de que a humanidade sofreria escassez de alimentos conforme se ampliasse (PINGALI, 2014). Estima-se que em torno de 40% de todo o alimento produzido se deve ao uso de fertilizantes.

O principal fertilizante nitrogenado é a ureia, pelo baixo custo (cerca de R\$ 2500,00 por tonelada ou 20% a menos do que o nitrato de amônia), representando

cerca de 85% da demanda global. A Ásia e Pacífico consomem cerca de 70% da demanda global seguida pela América do Norte, Europa, África e por último a América Latina. Em outubro de 2019 o mercado global de ureia estava estimado em 64,1 bilhões de dólares americanos, com previsões de 67,8 bilhões para 2022, valores já ajustados pela pandemia do SARS-Cov2 (BEROE, 2020).

O Brasil é o 4º maior consumidor de fertilizantes no mundo, com cerca de 6% da demanda mundial. Nosso país não tem capacidade para suprir a demanda interna crescente, tendo que importar mais do que 70% de todo o fertilizante que consome. Em 2018 importou cerca de 61% de sua demanda por ureia (5,5 milhões de toneladas, representando um mercado de 6,5 bilhões de reais). Esse mercado está em franca expansão há décadas, com estimativa de crescimento para 2020 em torno de 3% (SAAB, 2007; MINISTÉRIO DA ECONOMIA, 2019).

O desenvolvimento de biofertilizantes poderia atingir uma boa parcela desse mercado em crescimento, facilitando o acesso aos produtores, principalmente o pequeno produtor, e mitigando parte do impacto ambiental. Bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento como as pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* são capazes de se associar as principais monoculturas de um ponto de vista econômico. Somente as culturas de cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz utilizam cerca de 35% da demanda mundial por fertilizantes (em torno de 60 milhões de toneladas em 2019), com 53% desse total referente apenas a fertilizantes nitrogenados, representando 9,206 milhões de toneladas apenas no Brasil (MINISTÉRIO DA ECONOMIA, 2019), reforçando o potencial desse nicho econômico.

1.3. GENÉROS BACTERIANOS UTILIZADOS NESSE TRABALHO

A principal espécie estudada nesse trabalho é o *H. rubrisubalbicans* M1, foi utilizado *H. seropedicae* SmR1 como controle em alguns ensaios e *Azospirillum brasilense* FP2 como competidor direto versus *H. rubrisubalbicans* M1 e seus mutantes do T6SS. Também foram analisadas micrografias e fenótipos de motilidade para 4 estirpes bacterianas durante um breve intercâmbio realizado no Instituto James

Hutton, sob supervisão do professor Euan K. James. Foram iniciadas a caracterização de duas espécies do gênero *Herbaspirillum* (*H. seropedicae* 322 isolado de raízes de *Miscanthus spp.* e *H. frisingense* 970 isolado de *Hordeum vulgare* - cevada) e duas estirpes de *Azoarcus indigenus* (*A. indigenus* VB32-T isolado epifítico de grama sal e *A. indigenus* TT142 isolado de solo Escocês).

A seguir esses gêneros serão brevemente descritos.

1.3.1. Gênero *Herbaspirillum spp.*

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são bastonetes Gram-negativos estritamente aeróbios, capazes de sobreviver em atmosferas micro aeróbicas, como o aerênquima das plantas que comumente colonizam. Apresentam mobilidade, podendo apresentar até 3 flagelos polares, apresentando-os isoladamente ou concomitantemente. São capazes de utilizar diversas fontes de carbono com preferência para ácidos orgânicos como ácido málico e ácido lático. Seu crescimento otimizado ocorre em pH levemente ácido em temperaturas em torno de 30°C (BALDANI *et al.*, 1986; SCHIMIT *et al.*, 2006). Também podem estimular o desenvolvimento das plantas pela produção de fito hormônios (OLIVARES *et al.*, 1997).

O gênero *Herbaspirillum* era conhecido devido a fixação de nitrogênio atmosférico a formas assimiláveis pelo vegetal, porém tem sido observado que apenas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. lusitanum* (BALDANI *et al.*, 1986; SCHMID *et al.*, 2006; VALVERDE *et al.*, 2003) são fixadores. Mesmo com a presença do cluster *fix* teoricamente funcional, como observado em *H. frisingense* (STRAUB *et al.*, 2013), as demais espécies não fixam nitrogênio. Mesmo assim, diversos estudos vêm mostrando que mesmo quando não fixam nitrogênio, essas bactérias continuam sendo ótimas bactérias associativas promotoras do crescimento vegetal (JUNG *et al.*, 2007; STRAUB *et al.*, 2013; ANDREOZZI *et al.*, 2019)

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são capazes de se associar a grande diversidade de vegetais, principalmente gramíneas. Entre os principais temos: *Oryza spp.* - arroz (BODEY *et al.*, 1995), *Zea mays* - Milho (BALDANI *et al.*, 1986), *Triticum*

spp. - trigo (EL-KOMY *et al.*, 2003), *Sorghum spp.* - sorgo (JAMES *et al.*, 1997), *Phaseolus vulgaris* - soja (VALVERDE *et al.*, 2003) e *Saccharum spp.* - cana-de-açúcar (JAMES *et al.*, 1998). Também é encontrado em vegetais menos expressivos economicamente como: *Musa spp.* – bananeira, *Ananas spp.* - abacaxizeiro (WEBER *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2001), *Pennisetum purpureum* – capim-elefante para pastagem (KIRCHOFF *et al.*, 2001) e *Miscanthus spp.* – uma *Poaceae* nativa de Portugal (ELBELTAGY *et al.*, 2000).

A chave taxonômica do gênero segue como mostrado na TABELA 1.

TABELA 1: CHAVE TAXONÔMICA DO GÊNERO *Herbaspirillum spp.*:

| Taxonomia do gênero <i>Herbaspirillum</i> | |
|--|----------------------------|
| Filo | Proteobacteria |
| Classe | Betaproteobacteria |
| Ordem | Burkholderiales |
| Família | Oxalobacteriaceae |
| Gênero | <i>Herbaspirillum</i> |
| Espécie | <i>Herbaspirillum spp.</i> |

Chave taxonômica do gênero *Herbaspirillum spp.* Retirados do “*the catalogue of life*” <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/4259842> .

Atualmente o gênero conta com 15 espécies (TABELA 2). Esse gênero é disseminado em diversos nichos ambientais. Alguns foram isolados associados a raízes de vegetais (*H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*) e estruturas aéreas (*H. rhizosphaerae* e *H. frisingense*). Também foram encontrados em água doce de poços (*H. huttiense huttiense*, *H. huttiense puttei* e *H. autotrophicum*) e especificamente no solo das ilhas Canárias (*H. aurantiacum*, *H. canariense* e *H. soli*). Recentemente algumas espécies do gênero *Herbaspirillum*, marcadamente aquelas menos associadas a interação planta-bactéria, tem sido reclassificação para o gênero

Noviherbaspirillum spp. (a saber: *Noviherbaslipillum massiliense*, *Noviherbaslipillum denitrificans*, *Noviherbaslipillum malthae*, *Noviherbaslipillum psychrotolerans* e as espécies isoladas nas ilhas canárias) (LIN, 2013; ISHII, 2017).

TABELA 2: ESPÉCIES CONTIDAS NO GÊNERO *Herbaspirillum*:

| Espécie | Referência |
|--|---------------------------------|
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | BALDANI <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> | BALDANI <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>Herbaspirillum lusitanum</i> | VALVERDE <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Herbaspirillum frisingense</i> | KIRCHOFF <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>Herbaspirillum huttiens huttiense</i> | DING & YOKOTA, 2004 |
| <i>Herbaspirillum huttiense Putei</i> | DING & YOKOTA, 2004 |
| <i>Herbaspirillum hiltneri</i> | ROTHBALLER <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Herbaspirillum chlorophonolicum</i> | IM <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Herbaspirillum rizhosphaerae</i> | JUNG <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Herbaspirillum autotrophicum</i> | DING & YOKOTA, 2004 |
| <i>Herbaspirillum aquaticum</i> | DOBRIKSA <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Herbaspirillum aurantiacum</i> | CARRO <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Herbaspirillum canariense</i> | CARRO <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Herbaspirillum soli</i> | CARRO <i>et al.</i> , 2012 |

Espécies contidas no gênero *Herbaspirillum* segundo o “catalogue of life” para o ano de 2020.

Retirado de:

<http://www.catalogueoflife.org/col/browse/classification/genus/Herbaspirillum/fossil/1/match/1>

A seguir foram enfatizadas as espécies do gênero *Herbaspirillum* que fazem parte desse trabalho.

1.3.1.1. *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Herbaspirillum frisingense*

A primeira espécie descrita a compor o gênero *Herbaspirillum* foi o *Herbaspirillum seropedicae* Z67 (estirpe parental da estirpe SmR1 utilizada nesse trabalho), descrito por Baldani e colaboradores em 1986 na cidade de Seropédica, no Rio de Janeiro, isolado epifítico de raízes de *Oryza sativa* - Arroz. *H. seropedicae* é a espécie mais bem estudada do gênero e por isso é utilizado como modelo nas análises feitas nas outras espécies de *Herbaspirillum*. Assim como os outros membros do gênero, é uma exímia colonizadora vegetal, capaz de colonizar o vegetal passivamente através de continuidades da superfície radicular (MONTEIRO *et al.*, 2000). Já foi mostrado como potencial bioinoculante, no caso do arroz (*Oryza sativa*), levou a aumento de aproximadamente 50% no peso seco da planta e conteúdo nitrogenado do grão (BALDANI *et al.*, 1996). Além do arroz, já foram observados canaviais sendo cultivados por séculos sem adubação, indicando que a fixação de nitrogênio realizada por bactérias do solo, entre elas bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Gluconobacter diazotrophicus*, foram capazes de suprir toda a necessidade dessa monocultura (DOBEREINER, 1992).

H. rubrisubalbicans foi observado pela primeira vez causando a doença da estria mosqueada na cana-de-açúcar (*Saccharum barberi* e *Saccharum officinarum*), no estado da Louisiana (Estados Unidos) em 1927. Os autores nomearam-na como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Christopher & Edgerton, 1932). Posteriormente também foi mostrado como o causador da doença da estria vermelha em cultivares susceptíveis de sorgo (*Sorghum bicolor*) por Hale & Wilkie (1972). Apenas em 1996 que essa bactéria foi transferida para do gênero *Pseudomonas* para o gênero *Herbaspirillum* (BALDANI *et al.*, 1996). Embora seja geneticamente a bactéria mais próxima ao *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* se apresenta como um patógeno vegetal leve, enquanto *H. seropedicae* não é capaz de gerar doença associado à planta.

H. frisingense foi a terceira espécie a ser descrita, e a última relevante nesse trabalho, foi isolada da superfície radicular de *Miscanthus sinensis* (VALVERDE *et al.*, 2001).

O núcleo de fixação biológica de nitrogênio (NFN - UFPR) tem estudado as divergências genômicas presentes entre *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1. *H. rubrisubalbicans* M1 conta com algumas características genômicas adicionais não observadas em *H. seropedicae* SmR1 que resulta em seu fenótipo mais competitivo. Uma das características mais marcantes diz respeito à presença do sistema de secreção tipo III (T3SS), importante na competição bacteriana e na simbiose com a planta - principalmente em vegetais formadores de nódulos. O T3SS secreta diversas proteínas efetoras que podem ser responsáveis no reconhecimento da bactéria pela planta e consequentemente não ativar a imunidade vegetal. Schmidt e colaboradores (2003) evidenciam que o sistema T3SS não é o modulador exclusivo da patogênese em *H. rubrisubalbicans* M1 em *Sorghum bicolor*.

Outro cluster gênico exclusivo do *H. rubrisubalbicans* M1 é o sistema “*sprinkler*” ou *ws*, que codifica para proteínas responsáveis pela biossíntese de celulose e hemiceluloses. Tuleski e colaboradores (2019) mostraram deleções nesse sistema afetaram a formação e estruturação do biofilme, além de afetar o perfil de colonização e diminuir os sinais de doença em *Sorghum bicolor*.

O perfil das moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) também diverge grandemente entre as duas espécies. *H. rubrisubalbicans* M1 apresenta grande perfil de polimerização do O-antígeno, podendo ser observada como maior número de bandas no perfil eletroforética (SERRATO *et al.*, 2010). A maior ramificação pode explicar parcialmente a adesão superior às superfícies radiculares observada em *H. rubrisubalbicans* M1. Alterações na composição do O-antígeno afetam o fenótipo de colonização de *H. seropedicae* SmR1 em ordem de 100 vezes, porém não afeta significativamente o perfil de colonização de *H. rubrisubalbicans* M1 (BALSANELLI, 2010 & TOMAZINI, 2013).

Por último, o sistema de secreção tipo VI (T6SS). Ambas as espécies contam com 2 clusters que codificam para esse sistema, porém *H. rubrisubalbicans* M1 conta com o cluster menor ou cluster-II diferenciado em relação a *H. seropedicae* SmR1. Ambos os clusters de *H. seropedicae* SmR1 e o cluster-I de *H. rubrisubalbicans* M1 apresentam homologia entre si, estando relacionados a um T6SS de função competitiva (ou T6SS-3), representando o tipo comum desse sistema. O cluster-II

apresenta homologia com um T6SS presente em *Burkholderia glumae* e *B. plantarii* pouco difundidos na natureza, que parece estar relacionado com a simbiose com o vegetal.

Diante dos dados disponíveis, podemos sugerir que vários fatores, ainda desconhecidos, podem também estar relacionados com os processos de patogenicidade. A elucidação destes fatores nos levará a entender como ocorre o desenvolvimento dos sintomas da doença e porque essa interação é espécie-específica.

1.4. *Azoarcus indigenes*

O trabalho de Reinhold-Hurek (1993) propôs a criação do gênero *Azoarcus*. *Azoarcus indigenes* VB32-T foi alocada como a estirpe padrão, foi isolado pela primeira vez da superfície radicular da grama sal (*Leptochloa fusca*) por Reinhold-Hurek e colegas em 1988 (publicado em 1993), uma espécie de planta capaz de crescer em ambientes alagados, salinos e alcalinos, essa em particular, de regiões alagadas no Paquistão. Após o isolamento inicial, essa bactéria também foi isolada do interior do vegetal, mostrando que é capaz de colonização epifítica e endofítica.

Azoarcus indigenes VB32-T é uma β -Proteobacteria fixadora de nitrogênio da família *Rhodocyclaceae*. Representa bastonetes Gram-negativos, sob microscopia eletrônica se apresenta como um bacilo delgado e levemente curvado com comprimento de até 3 μ m, porém visualmente mais curto do que as estirpes de *Herbaspirillum*. Apresenta flagelos delicados, grande formação de muco e em condições adequadas de cultivo apresenta pequenos grânulos de PHB.

As necessidades nutricionais são bastante semelhantes às observadas em *Herbaspirillum spp.*, sendo uma bactéria estritamente aeróbica com preferência por ácidos orgânicos como o ácido málico, porém, é necessário suplementar o meio de cultivo com vitaminas do complexo B e pantotenato de cálcio.

1.5. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

A interação planta-bactéria é um processo complexo e multifatorial envolvendo milhares de genes que são ativados e reprimidos conforme novos estímulos são dados e etapas são cumpridas. A microbiota ao redor das raízes, rizosfera, conta com enorme diversidade de microrganismos interagindo entre eles e com a planta de modo extremamente dinâmico, competitivo e interdependente. Tal interdependência é tão acentuada que podemos dizer que tanto a planta é capaz de moldar a microbiota da rizosfera quanto a rizosfera é capaz de moldar a flora local. Determinadas espécies, ou até mesmo variedades específicas de vegetais, podem suprir a microbiota local com um perfil determinado e específico de substratos, capaz de selecionar as espécies presentes na microbiota da rizosfera (através de perfil mineral, matéria orgânica da decomposição de raízes e exsudatos) (LAVELLE *et al.*, 1995). Por sua vez, a microbiota define os ciclos de nutrientes, disponibilidade de nutrientes no solo, proteção contra doenças, saúde e crescimento vegetal diretamente, tanto de forma positiva como negativa conforme a composição dessa microbiota (WESTOVER *et al.*, 2001). Segundo meta análise feita por Kulmantiski e colaboradores (2011), o processo de adaptação da microbiota acontece de forma negativa (ou competitiva) no início da introdução de um vegetal e com o passar das gerações, caso o invasor prospere, passa a acontecer de modo estabilizador (ou simbiótico).

Os microrganismos presentes na rizosfera podem ou não entrar em contato direto com a planta. As bactérias que entram em contato com a planta, associativas, podem colonizar apenas a superfície da planta, colonização epifíticas, ou adentrar o vegetal de forma passiva ou ativa a partir de enzimas hidrolíticas, realizando a colonização endofítica da planta (HALLMANN *et al.*, 1997 & KLOEPPER, 1992). Para que a colonização seja bem-sucedida, a bactéria presente na rizosfera deve apresentar diversos fenótipos importantes:

- 1- Quimiotaxia e motilidade - Capacidade de sensoriamento da presença da planta (além de diferenciar quimiorrepelentes dos quimioatratadores) e motilidade em direção aos exsudatos secretados e presentes na superfície radicular. Essa etapa envolve diversas estruturas na bactéria, como transportadores ABC,

- sistemas de 2 componentes e sistemas de motilidade, como o sistema flagelar e fimbrial. (AMES, 1981 & BAIS *et al.*, 2006)
- 2- Competitividade na rizosfera – a bactéria só poderá colonizar a planta caso se mantenha viável até a etapa de adesão as raízes. Envolve sistemas de secreção, como o T3SS e T6SS, e sistemas de comunicação celular como o “*quorum sensing*”. (LOH *et al.*, 2002; BUTTNER, 2009 & BERNAL *et al.*, 2018).
 - 3- Sobrevivência às intempéries - A bactéria deve conseguir sobreviver a variações de temperatura, pH e a secreção de metabólitos secundários de defesa da planta, como o ácido salicílico. Nesse caso, a bactéria emprega estruturas volumosas e anfipáticas como o LPS ou a barreiras como o biofilme (NIKAIDO, 2003 & RINAUDI, 2010).
 - 4- Capacidade de adesão à superfície radicular do vegetal - A adesão inicial necessita ser forte, entre as estruturas que já foram observadas mediando esse processo temos o LPS (BALSANELLI *et al.*, 2010), porinas de membrana externa (ACHOUAK *et al.*, 1998) e adesinas (MIL-HOMENS *et al.*, 2012). O processo de adesão pode ser simples, como observado nas porinas, onde seria necessário apenas uma superfície carregada negativamente, ou específicos como no LPS de *H. seropedicae* que se liga a uma lectina específica nas raízes de *Zea mays* (BALSANELLI *et al.*, 2012).
 - 5- Propagação e colonização epifítica - Envolve vários tipos de motilidade (descritos a diante nesse trabalho), moléculas envolvidas com tipos específicos de motilidade (ramnolipídios e polihidroxicanoatos nas motilidades tipo “*sliding*” e “*gliding*”) e a formação de biofilme (fortalecendo adesão ao vegetal e resistência ao ambiente) (HARSHEY *et al.*, 1994; KAISER *et al.*, 2000 & MATTICK *et al.*, 2002).
 - 6- Invasão e colonização endofítica – Após ter se estabelecido na superfície radicular, a bactéria pode adentrar o vegetal passivamente, através das descontinuações ou ativamente, invadindo através da secreção de hidrolases (HARDOIM *et al.*, 2008). A bactéria deve se adaptar às condições disponibilizadas pelo vegetal, como atmosfera micro aeróbica, condições limitantes de nutrientes e metabólitos secundários de imunidade vegetal (REINHOLD-HUREK, 1998).
 - 7- Nodulação – Em alguns casos, bactérias como *Rhizobium leguminosarum* podem estreitar o processo simbiótico com o vegetal. A partir de um processo

complexo envolvendo fatores NOD, a bactéria estimula a formação de nódulos nas raízes. Essa troca de sinais altera a morfologia bacteriana para bacteroide e essa passa a viver em simbiose total, fixando nitrogênio para a planta (OLDROYD & DOWNIE, 2008).

A interação planta-bactéria pode trazer diversos benefícios para a planta, os mais conhecidos e citados na literatura são: 1 - produção de sideróforos, levando a disponibilização de formas assimiláveis de ferro (NEILANDS *et al.*, 1995); 2- solubilização de minerais, aumentando a disponibilidade de minerais como fosfatos para a planta (KHAN *et al.*, 2002); 3 - biocontrole de pragas, bactérias promotoras de crescimento criam barreira competitiva para outros micro-organismos patogênicos (DANHORN, 2007); 4 - promoção da nodulação, representando um microambiente de simbiose (SHAHAROONA *et al.*, 2006); 5 - secreção de fito-hormônios, como auxinas, giberelinas e ácido abscísico (LEAVEAU *et al.*, 2005) e 6 - fixação biológica do nitrogênio (FBN) (ELKOCA *et al.*, 2008).

O processo de interação com a planta de *H. rubrisubalbicans* M1 parece ocorrer de forma similar ao observado em *H. seropedicae* SmR1. *H. seropedicae* coloniza de forma passiva, adentrando reentrâncias e descontinuidades da superfície radicular (MONTEIRO *et al.*, 2012). *Herbaspirillum spp.* tem preferência por iniciar a infecção a partir das raízes secundárias, se propagando na superfície radicular e adentrar o vegetal a partir das descontinuidades ou ferimentos. A bactéria penetra e se espalha através dos espaços intercelulares e feixes vasculares das porções aéreas, levando a colonização e estabelecimento nos vasos xilemáticos (OLIVARES *et al.*, 1996).

Algumas das diferenças no processo de interação planta-bactéria de *H. rubrisubalbicans* em relação ao *H. seropedicae* observados são: A presença do cluster *wss*, que codifica para uma via de biossíntese de celulose bacteriana, envolvido na formação de biofilme e no processo-doença da estria vermelha em *Sorghum bicolor* (TULESKI *et al.*, 2018); o sistema de secreção tipo III, envolvido tanto na colonização quanto no processo-doença (SCHIMIDT *et al.*, 2008); a estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS), que está envolvido na adesão de *H. seropedicae* SmR1 à raízes de *Zea mays* (BALSANELLI *et al.*, 2010) e a resistência às condições ambientais (BALSANELLI *et al.*, 2012) porém não afeta a colonização em *H. rubrisubalbicans* M1 (TOMAZINI *et al.*, 2013) e o sistema de secreção tipo VI (T6SS) homólogo a *Burkholderia spp.*

Os fenótipos avaliados nesse trabalho foram escolhidos levando em consideração a interação planta bactéria. São eles: formação de biofilme, motilidade, competitividade, formação de doença “*in planta*” e perfil de colonização conforme mostrado a seguir.

1.5.1. Formação de biofilme

Biofilmes são comunidades bacterianas envolvidas por complexos macromoleculares altamente estruturados secretados pelos microrganismos que os compõe. Sua produção varia conforme as espécies bacterianas envolvidas e as condições ambientais em dado momento. Esse processo envolve diversas vias bioquímicas que se adaptam de forma sinérgica, podendo agir de forma coordenada ou isoladamente, conforme o estímulo ambiental para formar os biofilmes. Os biofilmes são benéficos para a bactéria formando um anteparo que a protege das intempéries e de predadores e pode ser extrapolado como um aspecto multicelular das bactérias (SUTHERLAND, 2001). Por outro lado, a formação de biofilmes também tem lados negativos, representando uma barreira para a perfusão de nutrientes, diminuindo o metabolismo dessa comunidade e demandando gasto energético por normalmente envolver o “*quorum sensing*”. A formação de biofilme já foi observada acontecendo em forma de “*hedge*”, onde subpopulações pré-adaptadas a formação de biofilme chamadas de células perseverantes, estão metabolicamente semelhantes a bactérias na fase estacionária, com grande produção de metabólitos secundários envolvidas com aumento competitivo e expressando genes relacionados com aparecimento abrupto de agentes nocivos (BRENDA, 2005).

O início da formação dos biofilmes é dependente de contato, seja célula-célula ou seja célula-substrato sólido. Depois de agregadas, o biofilme começa a maturar através da produção de matriz extracelular, contribuindo grandemente para a conformação final da comunidade. Essa matriz extracelular conta com enorme diversidade na sua composição e em qual momento ela ocorre conforme o estímulo ambiental. A diversidade é facilmente visualizada num biofilme formado por espécies diferentes ou mesmo nas propriedades distintas mostradas pelo biofilme de espécies

distintas, inferindo numa composição diversa da matriz extracelular secretada por essas bactérias (BRENDA, 2005).

A composição da matriz extracelular envolve principalmente polissacarídeos extracelulares e proteínas (STEWART, 2001), porém existem outros componentes envolvidos como DNA extracelular (WHITCHURCH, 2002), células mortas e detritos celulares (WEBB, 2003), essas últimas podendo apresentar caráter regulatório.

Quanto aos polissacarídeos presentes nos biofilmes, são insolúveis e de difícil separação da estrutura, dificultando sua análise e caracterização. Já foi observado que diversas espécies bacterianas são capazes de produzir celulose, inclusive *H. rubrisubalbicans* M1, evidenciado pela presença do cluster gênico *ws* (TULESKI *et al.*, 2019). A celulose já foi mostrada como um importante componente do biofilme nas bactérias que o sintetizam (ROSS *et al.*, 1991). A biossíntese de celulose é conduzida pela celulose sintase e comumente regulada positivamente por diGMP-cíclico, produzido pela diguanilato sintase e degradado pela fosfodiesterase PdeA (TAL *et al.*, 1998). Mutações em qualquer uma dessas 3 enzimas já foram mostradas alterando a formação do biofilme, porém alterações da diguanilato sintase parece ser mais impactante, visto que sinaliza a produção de exopolissacarídeos globalmente na célula, inclusive aqueles não envolvidos com a formação de biofilmes (BRENDA, 2005 & TISCHLER, 2004). Outro polissacarídeo importante é o PIA (Adesina intracelular polissacarídica - poli N-acetilglucosamina), descoberto em Gram-positivas e posteriormente encontrado nas Gram-negativas. Essa molécula é produzida pelas enzimas codificadas pelo cluster gênico *pga* (ou *ica*) e confere resistência a condições externas, como sucos gástricos, sendo um dos elementos essenciais na transmissão da *Yersinia pestis* (WANG, 2004; DARBY, 2002). Inicialmente observados em *Pseudomonas aeruginosa*, temos o alginato (*algD*), polissacarídeo rico em ácido glucurônico (cluster *pel*) e polissacarídeo rico em ácido manurônico (cluster *psl*), a presença desses clusters gênicos comumente precede a presença desses carboidratos na composição do biofilme (DERETIC, 1990 & WOZNIAK, 2003). Os polissacarídeos do “*quorum sensing*” também parecem estar diretamente envolvidos na formação do biofilme em espécies que o expressam, visto que já foi mostrado que a produção de polissacarídeos extracelulares parece estar relacionada com a densidade celular (DAVIS, 1998). Em *Pseudomonas aeruginosa*, mutantes incapazes de produzir o sinal homoserino-lactona, apresentaram grandes alterações na espessura e estrutura do biofilme e embora os autores tenham dificuldade em provar

o envolvimento do “*quorum sensing*”, essa hipótese é reforçada pelo fato dos ramnolipídios serem importantes na maturação do biofilme, possibilitando a manutenção de canais de água durante o processo (DAVEY, 2003).

Quanto as proteínas envolvidas na formação dos biofilmes, temos diversas vias bioquímicas de sistemas relacionados com a adesão como flagelos, pilus do tipo IV, proteínas curli e adesinas. Essas proteínas permitem caráter regulatório e maior adaptação a formação de biofilmes uma vez que os genes desses diversos sistemas são ativados ou reprimidos em condições ambientais distintas, podendo inclusive influenciar a formação de biofilme de forma sinérgica, e conforme vários desses sistemas estejam sendo recrutados. Em *E. coli* a expressão de pilus tipo IV acelera muito a adesão desenvolvimento do biofilme, mediando contato celular (GHIGO, 2001), porém em condições onde o pilus tipo IV não é expresso, pilus tipo I, flagelos, proteína curli e Adesina ag43 passam a suprir a carência (O'TOOLE, 1998).

A formação de biofilmes pode ser dirigida, como ocorre na colonização ou invasão de outros tecidos vivos. Sua formação depende da adesão inicial, que pode ser sítio-dirigida, classicamente através de pilus tipo IV (SAUER, 2000). Um exemplo presente em nosso grupo de pesquisa, Balsanelli (2010) mostrou que a ancoragem do O-antígeno do LPS de *H. seropedicae* SmR1 acontece em uma lectina específica da superfície radicular do milho (*Zea mays*).

Em *H. rubrisubalbicans* M1, o sistema de “*quorum sensing*” é incompleto, não apresenta nem o cluster *alg* e nem o cluster *pel*. Porém contam com cluster *ws* e *psl* (Hrubri_1875). Sistemas de secreção afetam profundamente a produção de biofilme, porém muito do que se sabe acerca disso tem relação com a regulação feita pelo “*quorum sensing*”, dessa forma é difícil inferir a função dos sistemas de secreção em *H. rubrisubalbicans* M1.

1.5.2. Motilidade

Motilidade é um dos aspectos mais importantes no ciclo de vida da bactéria. Ele pode indicar se ela será capaz de escapar de estímulos negativos, como grandes amplitudes de temperatura, estresses ambientais e moléculas antibióticas assim como

também se será capaz de se mover em direção de estímulos quimiotáticos positivos, sendo um fator chave para a interação planta-bactéria, através de estímulos como moléculas de carboidratos, cálcio e metabólitos secundários vegetais como polifenóis.

Existem 6 tipos principais motilidade, além daquelas que são específicas para alguns gêneros de bactéria, são elas: motilidade do tipo “*swimming*” - dependente exclusivamente dos flagelos, feita em ambientes líquidos e que pode ser auxiliada por moléculas surfactantes. A motilidade tipo “*swarming*” - envolve flagelos e o pilus tipo IV, essa motilidade também é dependente de umidade e pode ser favorecida por surfactantes (HARSHEY *et al.*, 1994; MATTICK *et al.*, 2002). A motilidade tipo “*twitch*” é dependente do pilus do tipo IV e do produto de genes *pilT*, que permitem a dinamicidade da fimbria, através de polimerização e despolimerização, é feita em superfícies sólidas, onde a dinâmica de polimerização do pilus leva a um impulso na direção contrária da superfície em questão, semelhante ao movimento de um nadador feito na parede da piscina (KAISER *et al.*, 2000).

Esses 3 tipos de motilidade descritos até o momento são chamados de motilidade clássica, que necessitam de grande dispêndio de energia. Os próximos 3 tipos são formas alternativas de motilidade que envolvem estruturas curtas e da secreção de surfactantes. A motilidade tipo “*gliding*” - (que também envolve a motilidade social) pode ou não empregar os pili tipo IV, tipo T, adesinas e a formação de biofilme para que a bactéria se desloque aos arredores da própria colônia, através de feixes bem organizados (BURCHARD *et al.*, 1983). As motilidades do tipo “*sliding*” e “*spreading*” são relacionadas com o “*quorum sensing*”, foram observadas em bactérias previamente consideradas imóveis, como no caso de *Staphylococcus spp.* O movimento é passivo, a pressão gerada pelo crescimento da colônia e a sinalização que esse evento gera via “*quorum sensing*” leva a produção e secreção de surfactantes, que diminuem a força de interação bactéria-bactéria na colônia, levando ao deslizamento das bactérias para as porções mais distantes da colônia. Evento observado como a formação de um agregado bacteriano organizado com formato de folha que se desloca uniformemente (KAITO *et al.*, 2007). A produção de surfactantes, como ramnolipídios e polihidroxicanoatos, já foram observados promovendo a motilidade tipo “*sliding*”. Em *P. aeruginosa*, já foi observado que deleção que prejudica o pilus do tipo IV levou a aumento dessa motilidade, principalmente com o aumento de ramnolipídios (MURRAY & KAZMIERCZAK, 2008; POLLITT *et al.*, 2017; TSOMPANIDOU *et al.*, 2011; MARTINEZ *et al.*, 1999 & HARSHEY, 2003). A

motilidade tipo “*darting*” é a forma menos compreendida, parece ser passiva, onde a força coesiva presente na colônia é vencida pelo crescimento celular, levando a uma forma de arremesso. As estruturas e moléculas envolvidas são desconhecidas (POLLITT *et al.*, 2017).

Quanto aos sinais ambientais que afetam a motilidade, é bem documentado que temperatura próxima ao crescimento ótimo da bactéria inibe a motilidade, principalmente as flagelares e a motilidade tipo “*sliding*”. Em *Serratia marcescens*, foi observado que as motilidades tipo “*swimming*”, “*swarming*” e “*sliding*” são afetados pela secreção de pigmentos surfactantes, como a serrawetina e seguindo o mesmo exemplo observado com ramnolipídios em *P. aeruginosa*, que tem sua maior produção em baixas temperaturas (MATSUYAMA *et al.*, 1989). Quanto a parte nutricional, a motilidade clássica dispense grandes quantidades de energia, desse modo é comumente necessário ambiente ou meio de cultura rico para observar esse evento, em *E. coli*, *Salmonella enterica* e *Serratia liquefaciens* é necessária a adição de casa-aminoácidos ao meio de cultura para visualizar motilidade tipo “*swarming*”. Algumas bactérias necessitam de aminoácidos ou produtos metabólicos desses para ativar genes regulatórios importantes, como os *flh* (Hrubri_1913 e Hrubri_1914), presentes no genoma de *H. rubrisubalbicans* M1, já foram mostrados regulando em torno de 60 genes em *E. coli* K12 (ALBERTI *et al.*, 1990; MATSUYAMA *et al.*, 1989 & MATSUYAMA *et al.*, 1995).

Nesta tese serão discutidas as motilidades convencionais por algumas razões: embora *H. rubrisubalbicans* M1 conte com os genes necessários para a produção de alguns surfactantes, não existem indícios da secreção de ramnolipídios e não foram observados grânulos de polihidroxibutiratos, como são observados em *H. seropedicae* SmR1. O sistema de “*quorum sensing*” é incompleto e a bactéria não conta com genes *spr* relacionado com a motilidade tipo “*spreading*”.

Formação de flagelos: A estrutura flagelar é comumente composta de 3 partes: o corpo basal (ou motor reversível), o gancho (ou junta universal) e o filamento (ou hélice propelente). Em *Salmonella enterica*, um dos organismos modelo, o corpo basal é composto pelo anel C (citoplasmático), anel MS (membrana/supra membrana), anel P (peptídeoglicano), anel L (LPS) e a porção rígida polimérica, bastão, que realiza o movimento. A porção rígida que movimenta o bastão forma a porção proximal, produto dos genes dos genes *flgB*, *flgC* e *flgF*. A porção distal é transmembrana e é codificada pelo gene *flgG*. Os anéis MS e C formam um complexo, resultando num motor

reversível. O anel C é sintetizado pelo produto dos genes *fliG*, *fliM* e *fliN* e é ancorado pelo anel MS, codificado pelo gene *fliF*. Os genes *flgI* e *flgH* codificam proteínas que se associam ao redor da porção rígida do bastão, a proteína *flgI* associada aos proteoglicanos e a proteína *flgH* na membrana externa formando o complexo do anel L (LPS) (MACNAB *et al.*, 2003, THOMAS *et al.*, 2006).

O flagelo pode se movimentar tanto na direção horária quanto na direção anti-horária, essa distinção é mediada pelos genes *fliM*, *fliN* e *fliG*. Quando a proteína sinalizadora quimiotática CheY fosforilada interage com *fliM*, ela auxilia uma mudança de conformação de *fliN*, que por sua vez, interage com *fliG*, muda de conformação levando à torção do anel C, gerando o movimento horário (LEE *et al.*, 2010). Quando não há estímulo químico, o flagelo se mantém no estado relaxado, realizando um movimento suave e aleatório que será nortado via quimiotaxia.

O movimento quimiotático é desenvolvido em razão de uma diversa gama de estímulos (escassez de nutrientes, estresse oxidativo, estresse térmico, estresse hídrico e aerotaxia). A direção e intensidade do movimento é dependente do anel C. Uma das formas de regulação mais conhecidas é feita através dos sistemas de dois componentes, nesse caso a fosforilação de *fliM* pela proteína Che fosforilada (YUAN *et al.*, 2013).

CheW e CheA são receptores de sinais, diversos, como monossacarídeos, amino ácidos, formas reativas de oxigênio e nitrogênio e alguns dipeptídeos. CheY e CheZ são controladores da resposta motora, sendo responsáveis pela cascata de fosforilação (CheA fosforila CheY), onde CheY fosforilada deve fosforilar o motor flagelar o ativando, enquanto o tempo de meia vida dessa resposta é controlado por CheZ. CheR e CheB controlam o estado de metilação. Sem que haja sinal quimiotático, o sistema é metilado e não é capaz de ativar CheA (WELCH, 1993).

Formação e estrutura do pilus: Trata-se de uma fimbria proteica arranjada de maneira helicoidal com seus aminoácidos hidrofóbicos arranjados no interior da estrutura e seus resíduos hidrofílicos arranjados no exterior da estrutura. Esse arranjo gera uma estrutura elástica e flexível que varia entre 5 a 8 nm, mas devido sua dinamicidade e comprimento variável envolvido na motilidade, é comumente observada em seu comprimento mais estável de 5 nm (SKERKER, 2001).

O arcabouço da estrutura depende das proteínas p, PilB e PilC, com as proteínas PilM, PilN, PilO e PilP constituindo uma estrutura entre as membranas interna e externa. A proteína PilQ funciona como secretina. As pilina principal forma a

maior parte da estrutura extensível e é composta exclusivamente ou principalmente por PilA, em *Neisseria gonorrhoeae* a proteína PilE também compõe a pilina principal. As pilinas menores revestem a ponta do pilus e conta com diversas proteínas envolvidas, gerando divergência entre as diversas espécies, em *Pseudomonas aeruginosa* temos PilE, PilU, PilV, PilX e PilW, em *N. gonorrhoeae* temos PilH, Pill, PilJ, PilK e PilL (CRAIG *et al.*, 2019). Já os genes *pilT*, estão relacionados com a regulação do comprimento do pilus, permitindo a motilidade tipo “*twitch*”.

H. rubrisubalbicans M1 conta todos os genes envolvidos na biossíntese de pilus tipo IV presente em *P. aeruginosa* e *N. gonorrhoeae*. Isso nos sugere a possibilidade de uma diversidade de pili nessa bactéria, permitindo a adaptação conforme o ambiente ou estilo de vida. A diversidade possível devida a quantidade de pilinas menores pode explicar parte da razão pela qual *H. rubrisubalbicans* é capaz de se associar a uma diversa gama de vegetais, sem necessariamente ter a presença de mecanismos específicos. Essa mesma ideia se aplica ao LPS, molécula já observada na adesão as raízes de diversos vegetais, entre eles *H. seropedicae* SmR1 interagindo com lectinas específicas na raiz do trigo (BALSANELLI, 2010). Quando comparados os Perfis eletroforéticos, *H. rubrisubalbicans* M1 conta com diversidade de ramificações muito superior ao de *H. seropedicae* SmR1 (TOMAZINI, 2013), permitindo adesão a uma maior gama de superfícies sem que haja a necessidade de ativação de cascatas bioquímicas previamente ao contato.

1.5.3. Competição bacteriana

A competição é a força motriz da seleção natural, levando a inovações que convergem na diversificação dos organismos. A competição acontece em todos os níveis observáveis e levou os microrganismos a desenvolver e adaptar constantemente diversos mecanismos para melhorar a aquisição de nutrientes. Esses mecanismos incluem adaptações prévias (apresentadas em mecanismo de “*hedge*”), coordenação e cooperação (como “*quorum sensing*”), produção de antibióticos e maquinários que conferem vantagem competitiva (como sistemas de motilidade e sistemas de secreção), podendo alterar grandemente o balanço competitivo.

Desde os experimentos clássicos de cinética de crescimento bacteriano de Monod (1949) já é sabido que existe uma relação entre limitação de nutrientes e o crescimento bacteriano. Tilman (1977) utilizou a cinética de Monod para propor o modelo de limitação de nutrientes, inferindo que: a demanda individual e a demanda e taxa de consumo de nutrientes determinará a predominância de diferentes táxons. Sob determinadas taxas de concentrações nutricionais, microrganismos competidores podem coexistir de forma estável, mas sob outras taxas nutricionais, outras espécies podem desaparecer devido a limitações agudas específicas. Em função do tempo, o consumo de nutrientes essenciais irá determinar a competição (HIBBING *et al.*, 2010). De modo geral, a teoria das taxas nutricionais observa todas as oscilações das linhagens microbianas através do padrão nutricional. Embora gere fundação conceitual na predição do resultado da competição, não é possível observar a diversidade de mecanismos pelos quais o microrganismo compete. Microrganismos não são passivos, desenvolveram diversos mecanismos para melhorar a aquisição de nutrientes (SMITH, 2008 & MURRAY, 2008)

Competição: A primeira forma de competição é a intraespecífica, representando a competição dentro da mesma população em um ambiente onde os nutrientes são limitados, como frascos de cultura e biofilmes. Essa competição pode gerar subpopulações mais competentes na colonização desse nicho alternativo (KASSEN *et al.*, 2004 & BOLES *et al.*, 2004). Em *Pseudomonas aeruginosa* ocasionalmente surgem clones que produzem grandes quantidades de EPS, permitindo que a bactéria flutuasse em direção a superfície das culturas, obtendo melhor acesso ao oxigênio, ganhando vantagem competitiva em relação as outras (RAYNEY *et al.*, 1998). Outro mecanismo é a formação de mecanismos não transientes, ou presença de subpopulações pré-adaptadas para condições diversas, também conhecido como mecanismo de “*hedge*”, representando a diversidade dentro da colônia. Um exemplo de “*hedge*” está na produção de colicina pela população de *E. coli*. Embora todos produzam, nem toda a colônia é resistente a essa molécula, além disso, as diversas subpopulações contam com diferentes níveis de resistência aleatoriamente, representando um mecanismo de diversidade não induzível (KERR *et al.*, 2002).

Exclusão competitiva: São fenótipos desenvolvidos para diminuir ou evadir a competição, como a secreção de antibióticos, formação de biofilmes e motilidade (NARISAWA *et al.*, 2008).

Cooperação: embora células da mesma espécie compitam entre si, cada vez mais é observado que a pressão seletiva beneficia características de cooperação a nível multicelular. O melhor exemplo é o “*quorum sensing*”, um sistema de comunicação e controle populacional feito através do envio e sensoriamento de diversas moléculas sinais (centradas na homoserino lactona) em resposta a estímulos ambientais diversos. Mas mesmo em mecanismos de cooperação, tende aparecer fatores competitivos adicionais. Devido ao elevado gasto energético do “*quorum sensing*” subpopulações contendo mutações nesse sistema tendem a aparecer - os trapaceiros “*social cheaters*”, que se beneficiam do sistema coletivo sem uma contrapartida (WEST *et al.*, 2007). Em *P. aeruginosa*, o mutante *lasR* apresenta fenótipo de crescimento aumentado em relação a estirpe selvagem devido ao desconto energético proveniente da não secreção de uma protease, que por sua vez é aproveitada da vizinhança (SANDOZ *et al.*, 2007). Uma curiosidade: alguns estudos vêm mostrando um tipo de T6SS utilizado para eliminar “*social cheaters*” (ALTERI *et al.*, 2013).

Coevolução interespecífica: muitas espécies acabam evoluindo por proximidade em função do tempo, um exemplo está na microbiota oral. Pacientes colonizados por *Streptococcus oligofermentans* apresentavam menor incidência de caries, causado por *S. mutans*. *S. oligofermentans* se adaptou em utilizar o ácido láctico produzido por *S. mutans* na produção de peróxido de hidrogênio, inibindo o crescimento do seu competidor (CHRISTENSEN *et al.*, 2002 & TONG *et al.*, 2007).

Limitação de nutrientes: pode ser dividida em competição por exploração (sem interação entre os competidores) e competição por interferência (vencedor leva os recursos). Um exemplo clássico de competição exploratória está em estirpes capazes de acumular o fósforo do meio na forma de fosfatos, exaurindo para as competidoras. Um exemplo de competição por interferência está na competição pelo ferro através da secreção de moléculas quelantes conhecidas como sideróforos. Produção de sideróforos de alta afinidade com o ferro geram vantagem competitiva contra espécies que não produzem sideróforos ou produzem sideróforos de baixa afinidade (WILSON, 2000; OEHMEN, 2007; KHAN, 2006 & JOSHI, 2006).

Posicionamento favorável: Essa estratégia normalmente ocorre na busca por novos nichos ou depois de estabelecida para dificultar a aproximação de competidoras. Na competição bucal, algumas espécies pioneiras produzem adesinas para receptores específicos, presente numa película interdental. A competidora

expressa um polissacarídeo de membrana que reconhece esses receptores na competidora pioneira (RICKART, 2003). Após se estabelecer, algumas bactérias como *Lactobacillus spp.* podem produzir glicoproteínas que dificultam a adesão de competidoras como *E. coli* (GOLOWCZYC *et al.*, 2007). Grande produção de EPS pode sufocar competidoras no biofilme (XAVIER, 2007).

Fuga: motilidade na competição – algumas espécies utilizam a locomoção para escapar da competição. Em seu biofilme *Agrobacterium tumefaciens* na presença de *P. aeruginosa* passa a expressar flagelos para evitar confronto (NA *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* utiliza motilidade para deslocar competitivamente suas subpopulações com menor motilidade, se posicionando nas regiões mais aeradas, observado a partir do formato clássico das suas colônias (KLAUSEN, 2003).

Atrapalhar sinais do “*quorum sensing*”: bactérias podem alterar, degradar ou internalizar os sinais de ácil-homoserino-lactonas (UROZ *et al.*, 2005).

Um dos fatores emergentes no estudo da competição são os T6SS, que serão abordados no item 1.6.

1.6. SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO VI (T6SS)

As células bacterianas são envolvidas por um envelope que delimita suas fronteiras e permite a aquisição e excreção de diversas moléculas, essa dinâmica é essencial para sua viabilidade, visto as condições hostis do ambiente ao redor (SILHAVY, 2012; FILLoux, 2010). Os sistemas de secreção são maquinários pré-existentes que foram readaptados via pressão seletiva ambiental favorecendo a externalização de uma ampla gama de moléculas, perfazendo um acesso direto entre o citosol e a membrana externa de bactérias Gram-negativas por diversas vias (GERLACH, 2007). O sistema de secreção tipo VI (T6SS) é um desses sistemas: um maquinário análogo ao sistema injetor do bacteriófago T4 (MOGOUS *et al.*, 2006; PUKATZKI *et al.*, 2006), capaz de perfurar e injetar proteínas efetoras em uma célula adjacente. Essas proteínas tem a capacidade de afetar a interação com esse alvo, podendo por exemplo, facilitar o processo de colonização, trazer vantagem

competitiva na microbiota local ou até mesmo nortear a especificidade da colonização “*in planta*” (BERNAL *et al.*, 2018 & BLADERGROEN, 2003).

Estruturalmente, o T6SS se assemelha ao fago T4, formando uma estrutura pontiaguda semelhante a uma seringa. Essa estrutura é dividida em 2 porções formadas separadamente no citosol e na membrana plasmática, que são acopladas no momento da ação. No citosol é formado o polímero Hcp-VgrG-PAAR, formando o túbulo com a extremidade pontiaguda. O túbulo é formado através da polimerização de anéis de hexâmeros de Hcp (*hemolysin co-regulated protein*), após formado o túbulo é adicionado a ponta um trímero de VgrG à porção N-terminal do Hcp. Embora o domínio PAAR não seja essencial, ele confere maior poder de perfuração a estrutura e aumenta a capacidade de carreamento de proteínas efetoras, que comumente são secretados carreados por uma dessas três proteínas formadoras do túbulo. A segunda porção é a estrutura contrátil e integra de membrana que suporta o túbulo, promovendo impulso para a perfuração da célula adjacente. Essa estrutura basal é formada pela porção contrátil VipA/B (ou TssB/C - arrançados em conformação helicoidal) e pelo bolsão integral (ImpA, ImpE, ImpF, ImpJ e ImpK, a sinonímia TssC, TssD, TssE, TssG e TssH). O complexo basal conecta a porção injetora à membrana citoplasmática através da interação com um complexo integral de membrana formado a partir de ImpL, ImpM e ImpJ (ou TssL, TssM e TssJ). Após o complexo basal e o polímero Hcp-VgrG-PAAR estarem prontos, o túbulo é acoplado ao complexo basal através do citosol, pronto para o disparo através da contração de VipA/B. Após realizada sua função, existe uma ATPase (ClpV/B - TssA) acoplada ao complexo basal que utiliza ATP para despolimerizar o túbulo de Hcp, reciclando os componentes para o próximo disparo (PUKATSKI *et al.*, 2006; BERNAL *et al.*, 2018).

A regulação dos T6SS é muito diversificada, em *P. aeruginosa* é regulado transducionalmente por LasR via “*quorum sensing*” (LESIC *et al.*, 2009) e pós-transcricionalmente via RsmA (BRENCIC 2009), através da expressão das quinases PppA e PpkA. Pós traducionalmente conta com três vias: 1 - independente de fosforilação, ativada por TagF, porém o sinal de ativação é desconhecido; 2 – inativo – com PpkA fosforilada; 3 – dependente de fosforilação – PppA fosforila subunidade Fha da ClpV, ativada através de contato. Sana (2012) observou dependência de ferro na ativação do T6SS. Também já foram observadas regulações por reguladores transcricionais. Losada (2018) mostrou que dos 6 T6SS presentes em *Burkholderia pseudomallei*, 4 eram regulados positivamente por MarR, além disso, MarR modulava

o regulador transcricional LisR em outros clusters. Vale ressaltar que a regulação é muito variável dentro das espécies. As proteínas PppA/PpkA não são amplamente disseminadas e muitas vezes o regulador TagF pode não estar presente ou ativo. Cada espécie conta com suas particularidades que devem ser exploradas separadamente.

Quanto a distribuição, os T6SS são amplamente distribuídos nas bactérias Gram-negativas, principalmente nas proteobactérias, sendo encontrado tanto em bactérias patogênicas como nas comensais. Análises filogenéticas agrupam o T6SS em 5, com distribuição homogênea tanto em bactérias comensais como em bactérias patogênicas, sugerindo vantagens competitivas e que sua função não sendo restrita a virulência. As proteobactérias apresentam T6SS com alta frequência, sendo estimado que 25% delas contenham pelo menos uma cópia em seu genoma (BINGLE, 2008) e devido à grande diversidade o sistema foi inicialmente dividido em 6 subfamílias (1, 2, 3, 4a, 4b e 5)(BOYER, 2007; BARRET, 2011 & BERNAL, 2017) e subsequentemente mais 2 sistemas evolutivamente distintos: um presente em uma ilha patogênica de *Fransciscella* (CLEMENS, 2015) e um exclusivo de *bacterioidetes* (RUSSEL, 2014) (T6SSⁱⁱ e T6SSⁱⁱⁱ respectivamente), enquanto os 6 homólogos observados em proteobactérias podem ser agrupados no T6SSⁱ. Algumas espécies podem apresentar mais de um T6SS (7% das proteobactérias contêm mais de 2 clusters), muitas vezes exercendo funções diferentes, como é o caso das *Burkholderia spp.* (SCHWARTZ, 2010) onde *B. pseudomallei* conta com 6 T6SS distintos. Múltiplos T6SS comumente são observados em bactérias generalistas, onde a função é muito bem moldada para o nicho onde a bactéria se insere, um exemplo está em *Yersinia pestis*, bactéria capaz de colonizar artrópodes e mamíferos, foi observado um T6SS controlado por mudanças de temperatura, se adaptando conforme o hospedeiro (ROBINSON, 2009). A princípio, o estudo dos T6SS foi norteado pela busca de fatores de virulência, principalmente em alvos animais, por isso a função de invasão foi mais discutida nos primeiros 10 anos de estudo, posteriormente observaram a função competitiva contra outras espécies e recentemente tem observado o caráter de limitação de infecção e simbióticos do T6SS, principalmente observado em bactérias comensais.

Quanto a função, os T6SS podem ser divididos em 3 tipos: competitivos, anti-hospedeiros e limitantes.

Como os estudos do T6SS foram inicialmente norteados pela virulência, o primeiro grupo observado foi dos T6SS anti-hospedeiros. Aqui temos diversos exemplos de bactérias capazes de modular a imunidade de seus hospedeiros para facilitar a colonização. O primeiro trabalho foi de Pukatzki e colaboradores em 2006, envolvendo a invasão de macrófagos em modelo de ratos por *Vibrio cholerae*, o autor observou que a proteína VgrG (valine-glycine rich repeat protein G) levava a alterações na arquitetura do citoesqueleto, modulando a resposta imune a invasão. Mogous (2006) foi o autor que caracterizou a estrutura do T6SS e verificou a importância do T6SS de *P. aeruginosa* em pacientes com fibrose cística. Burtnick (2010) mostrou que *Burkholderia malei* utiliza o T6SS controlar a imunidade, através da formação de gigantes multinucleadas em modelo de Hamster, diminuindo a eficiência da imunidade. Em plantas, Barker (2009) mostrou que deleções no T6SS de *Agrobacterium tumefaciens* resultava em dificuldade na invasão celular e na batata, dificultando a formação de tumores clássicos.

A partir dos estudos de Konovalova (2010), associando o T6SS a formação de frutificações corpóreas entre espécies diferentes de bactérias, as características competitivas começaram a vir à tona. Logo em seguida Hood e colaboradores (2010) observaram a presença de proteínas efetoras com pares de imunidade, no caso as proteínas Tse tóxica e Tsi imune em *Pseudomonas aeruginosa* obtidas através de coprecipitação. O autor observou duas características interessantes: 1 - superexpressão não afetava células eucarióticas e 2 - em Co cultura, as competidoras eram fortemente inibidas, mas quando expressavam Tsi, esse efeito cessava. Também foi observado em *P. aeruginosa*, que a secreção de alguns quelantes metálicos (ferro, níquel e zinco) são dependentes de T6SS (CHEN *et al.*, 2016), representando um meio de competitividade por recursos.

Por últimos temos os limitantes. Existem alguns estudos que vão contra esse perfil patogênico. O primeiro estudo "*in planta*" envolvendo T6SS foi o trabalho de Bladergroen (2003), o autor estudava mutações de um cluster envolvido na virulência de *A. tumefaciens* que posteriormente se foi chamado de T6SS. Essa bactéria tem a capacidade de nodular, porém é bastante restrito a algumas espécies de planta, como a couve (*Brassica oleraceae*) desse estudo. A mutação em TssK/ImpJ levou parcialmente a perda da seletividade dessa nodulação, passando a colonizar ervilhas. Na estirpe selvagem o T6SS está envolvido em sinalizar a não infecção da ervilha. Os estudos de Bladergroen também mostraram que efetores não necessariamente

precisam ser injetados, podendo ser secretados no meio para influenciar o hospedeiro. Um exemplo em mamíferos, mutantes do T6SS de *Salmonella typhimurium* passam a colonizar mais intensamente macrófagos em modelo de rato, sugerindo que o T6SS seja responsável por limitar a infecção (PARSONS, 2005).

Os T6SS podem contar com caráter coletivo. Ma (2009) observou que em *B. pseudomallei*, *B. cenocepacia* e *Salmonella entérica*, alguns T6SS eram expressos apenas após a fagocitose. A hipótese é que esses colonizadores primários estariam se sacrificando para iniciar o processo de estabelecimento para os colonizadores secundários.

Embora seja tentador tentar encaixar os T6SS uma função pré-definida ou ainda tentar inferir uma função para um T6SS desconhecido utilizando estudos de filogenética, está cada vez mais claro que a função desses sistemas está relacionada apenas com as proteínas efetoras que são capazes de secretar, muitas vezes exibindo diversas funções conforme algum estímulo ambiental.

Muitos efetores e suas respectivas proteínas de imunidade contam com certa homologia com Hcp, VgrG e PAAR (DONG *et al.*, 2013). Após analisar esse fato, foi verificado que as proteínas efetoras são comumente carregadas por essas proteínas, ligadas covalentemente ou apenas através de interações fracas (SCHNEIDER *et al.*, 2013). Outro detalhe importante é que um T6SS específico pode acomodar diferentes VgrG/PAAR, presentes dispersos pelo genoma. Essa diversidade implica na possível entrega de múltiplos efetores numa única contração de VipA/B por um único T6SS (SCHNEIDER, 2013; SILVERMANN, 2013). Então, com a deleção de um sistema de secreção em específico, mesmo que haja menor afinidade, outro T6SS presente na célula pode assumir a secreção (RUSSEL, 2013).

Sobre os efetores: Os três principais alvos observados até esse momento são a parede celular (como a amidase Tse que hidrolisa peptidoglicanos em *E. coli* na competição intestinal – Ma *et al.*, 2018), fosfolípidios (comumente carregados pelo Hcp e só foram observada na invasão celular, e Tde carregado pelo VgrG de *E. coli* de RUSSEL *et al.*, 2013) e ácidos nucleicos (VgrG contendo elemento Rhs – “*rearranged hot spot proteins*” – permitem diversas proteínas efetoras a se ligar ao seu C-terminal e está comumente relacionada com controle populacional, já foram observadas atividade de DNase, RNase e metaloprotease) (YANG *et al.*, 2018).

A investigação dos papéis do T6SS na interação planta-bactéria é muito recente. Já foi verificado o envolvimento do T6SS na interação planta-bactéria em

diversas espécies bacterianas, envolvidas na virulência, competição na rizosfera e formação de biofilme (HUREK *et al.*, 2003; FINNEY *et al.*, 2019; TIAN *et al.*, 2015; TIAN *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2014 & GALLIQUE *et al.*, 2017). Tem ficado mais evidente que a principal função dos T6SS na rizosfera é competição e não invasão, como inicialmente imaginado (BERNAL *et al.*, 2017). Em *A. tumefaciens* a competitividade é aumentada “*in planta*”. Ma e colaboradores (2014) observaram que *A. tumefaciens* foi capaz de deslocar *P. aeruginosa* competitivamente “*in planta*”, sendo que em qualquer outra condição, *P. aeruginosa* daria cabo facilmente de sua competidora. Esse estudo mostrou que a efetividade do T6SS pode ser nicho dependente e que resultados “*in vitro*” podem relevar condições chave nos ensaios. Esse aumento “nicho dependente” foi mais explorado por Haapalainen (2012), que mostrou aumento competitivo epifítico contra fungos e protozoários, anteriormente mais competitivos.

Ainda não foi demonstrada a presença de proteínas efetora no interior de células vegetais. Até esse momento, só foram evidenciados a ausência de doença sob ausência de proteínas efetoras ou a ativação do T6SS na presença de extrato vegetal. Mattinen (2007) mostrou a ausência de proteínas efetoras (inclusive VgrG e Hcp) em plantas predadas por uma estirpe mutante deletada no T6SS de *Pectobacterium atrosepticum* e a presença dessas proteínas no sobrenadante do meio de cultura contendo extrato de planta. Embora não tenha sido possível determinar diretamente a ação do T6SS na doença, alguns fenótipos alterados são recorrentes, como motilidade e produção de biofilmes (ZHANG *et al.*, 2014, GALLIQUE *et al.*, 2017 & LIN *et al.*, 2015). Em *P. aeruginosa* mutantes ImpM/TssM apresentam formação de biofilme aumentada, por outro lado, em *E. coli*, mutante ImpM apresentou formação de biofilme diminuída, possivelmente por menor adesão aos epitélios (de PACE *et al.*, 2011). A possível adesina que liga a formação do biofilme com o T6SS não foi identificada, porém esse fenótipo é recorrente e pode ser específico para gêneros diferentes.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi buscar por genes de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 envolvidos no processo de interação planta-bactéria. Para isso, foram identificados genes de interesse que tinham sua expressão aumentada durante a interação com o sorgo. Esses genes foram mutagenizados e utilizados para construir estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1, a partir desses mutantes foram avaliados fenótipos envolvidos na interação planta-bactéria, como mostrado a seguir:

1. Análise “*in silico*” dos dados obtidos a partir de transcriptoma na presença e na ausência do sorgo.
2. Obtenção das estirpes mutantes nos genes selecionados através da interrupção do gene selvagem através da cópia truncada pelo gene *kan2* transferido através do vetor suicida pSUP202.2;
 - 2.1. Determinação do perfil de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pelos mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1;
 - 2.2. Determinação do perfil de motilidade dos mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1;
 - 2.3. Determinação do perfil competitivo dos mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1 durante a colonização radicular de *Sorghum bicolor* versus a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1;
 - 2.4. Determinação do perfil de formação de biofilme em função do tempo pelos mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1;
 - 2.5. Determinação do perfil de geração de sinais da estria vermelha do sorgo pelos mutantes de *H. rubrisubalbicans* M1;
 - 2.6. Análise da ultraestrutura de mutantes para genes envolvidos na interação planta-bactéria.
 - 2.7. Perfil de motilidade e ultraestrutura de bactérias isoladas em solo escocês (*Herbaspirillum seropedicae* estirpe 322, *H. frisingense* estirpe 970 e *Azoarcus spp.* estirpes VB-32T e TTM91);
3. Determinação do perfil de expressão das regiões Inter gênicas dos clusters que codificam para o T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1;

4. Determinação do perfil competitivo dos mutantes para genes que codificam para o T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 versus as estirpes selvagens *H. rubrisubalbicans* M1, *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* FP2;

3. JUSTIFICATIVA

O fato de *H. rubrisubalbicans* M1 ser uma bactéria levemente patogênica para algumas variedades de cana-de-açúcar e sorgo representa um ótimo modelo experimental no estudo de genes relacionados com a interação planta-bactéria, especialmente naqueles envolvidos no processo-doença. A compreensão do efeito desses genes nos fenótipos de interação planta-bactéria nos permite editar genomas de modo a obter bactérias com melhores características associativas e diminuir ou eliminar doenças.

Para que uma bactéria seja eficiente na colonização da planta, ela precisa apresentar fenótipos de competitividade adequados, para sobreviver na rizosfera, deve ser capaz de se aderir às raízes e se propagar nesse vegetal, envolvendo diversos fenótipos como motilidade, quimiotaxia e formação de biofilme. A partir de análises transcriptômicas, podemos selecionar e analisar diversos genes envolvidos com esses fenótipos. Entre os maquinários sabidamente envolvidos na interação planta-bactéria temos o sistema de secreção tipo VI, envolvido diretamente na competição da rizosfera, seletividade na colonização da planta e no processo-doença de diversas espécies bacterianas, direta ou indiretamente através da produção de biofilme. *H. rubrisubalbicans* M1 conta com um cluster de biossíntese desse sistema pouco usual, que parece estar diretamente relacionado com a interação planta-bactéria.

A descoberta e caracterização desses T6SS pode representar possibilidade de aumentar a eficiência e a gama de espécies de plantas que a bactéria é capaz de colonizar. Através da introdução de T6SS apropriados, poderíamos criar estirpes bacterianas supereficientes, competitivas e não-patogênicas a partir de estirpes até então incapazes de serem utilizadas como bio-inoculantes, apresentando ótima vantagem econômica e de otimização de produção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMOS UTILIZADOS

As estirpes bacterianas utilizadas estão listadas na TABELA 3:

TABELA 3: ARSENAL DE ESTIRPES SELVAGENS E CONSTRUÇÕES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

| Estirpe | Característica | referência |
|---------------------------------------|--|-------------------------------|
| <i>Eschirichia coli</i> | | |
| TOP10 | Estirpe para seleção do tipo blue/white screening devido a característica $\phi 80lacZ\Delta M15$, Sm ^R | INVITROGEN |
| S17.1 | recA, hsdR RP4-2-Tc :: Mu-Km::Tn7 | SIMON <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | | |
| FP2 | N-nitroguanidina variante da estirpe tipo Sp7, Nif ⁺ , isolada de raízes de <i>Digitaria decumbens</i> | PEDROSA <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Herbaspirillum spp.</i> | | |
| SmR1 | Variante espontâneo da estirpe tipo Z78, Sm ^R , Nif ⁺ , isolada de raízes de sorgo | PEDROSA <i>et al.</i> , 1997 |
| M1 | Estirpe selvagem de <i>H. rubrisubalbicans</i> , NaI ^R , amp ^R , isolada de <i>Sorghum bicolor</i> | BALDANI <i>et al.</i> 1986. |
| Mutantes | | |
| RAM4 | <i>H. seropedicae</i> SmR1 que expressa proteína Ds-red. Sm ^R , NaI ^R e Km ^R . | MONTEIRO <i>et al.</i> , 2008 |
| HRubri_0065 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | Este trabalho |

Continua na próxima página

| | | |
|-------------|---|---------------|
| | central do gene <i>Hrubri_0065</i> que codifica para uma proteína feoB. Km ^R | |
| | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | |
| HRubri_0505 | central do gene <i>Hrubri_0505</i> que codifica para uma proteína sensora de oxigênio. Km ^R . | Este trabalho |
| | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | |
| HRubri_0763 | central do gene <i>Hrubri_0763</i> que codifica para um álcool desidrogenase. Km ^R . | Este trabalho |
| | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | |
| HRubri_0842 | central do gene <i>Hrubri_0842</i> que codifica para uma porina. Km ^R . | Este trabalho |
| | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | |
| HRubri_1953 | central do gene <i>Hrubri_1953</i> que codifica para a flagelina. Km ^R . | Este trabalho |
| | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | |
| HRubri_0835 | central do gene <i>Hrubri_0835</i> que codifica para a porção periplasmática de um transportador ABC de transporte de açúcares. Km ^R . | Este trabalho |
| | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | |
| HRubri_0839 | central do gene <i>Hrubri_0839</i> que codifica para uma D-xilose desidratase. Km ^R . | Este trabalho |
| | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | |
| HRubri_0935 | central do gene <i>Hrubri_0935</i> que codifica | Este trabalho |

| | | |
|-------------|--|---------------|
| | para uma acetil transferase da família GNAT. Km ^R . | |
| HRubri_1197 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_1197</i> que codifica para proteína semelhante ao fator GlcG. Km ^R . | Este trabalho |
| HRubri_2391 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2391</i> que codifica para uma proteína FeS. Km ^R . | Este trabalho |
| HRubri_2483 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2483</i> que codifica para uma álcool desidrogenase que contem ferro. Km ^R . | Este trabalho |
| HRubri_2585 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2585</i> que codifica para um transportador MHS. Km ^R . | Este trabalho |
| HRubri_2937 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2937</i> que codifica para uma proteína que contem DUF4440. Km ^R . | Este trabalho |
| HRubri_3783 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_3783</i> que codifica para um transportador C4-TRAP do metabolismo de carboidratos. Km ^R . | Este trabalho |
| HRubri_3948 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | Este trabalho |

central do gene *Hrubri_3948* que codifica para a vanilato O-demetilase. Km^R.

Mutantes do T6SS

| | | |
|-------------|--|---------------|
| Hrubri_2309 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2309</i> que codifica para o Hcp do cluster-II. Km ^R . | Este trabalho |
| Hrubri_2312 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2312</i> que codifica para a proteína ImpJ do cluster-II. Km ^R . | Este trabalho |
| Hrubri_2313 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2313</i> que codifica o VgrG do cluster-II. Km ^R . | Este trabalho |
| Hrubri_2319 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2319</i> que codifica o ImpK do cluster-II. Km ^R . | Este trabalho |
| Hrubri_2320 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_2320</i> que codifica o DotU do cluster-II. Km ^R . | Este trabalho |
| Hrubri_3993 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_3993</i> que codifica para ImpJ do cluster-I. Km ^R . | Este trabalho |
| Hrubri_3994 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção central do gene <i>Hrubri_3994</i> que codifica para o elemento DotU do cluster-I. Km ^R . | Este trabalho |
| Hrubri_3995 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contendo inserção do gene <i>kan2</i> interrompendo a porção | Este trabalho |

Continua na próxima página

central do gene *Hrubri_3995* que codifica para o VgrG do cluster-I. Km^R.

| Construções de expressão gênica | | |
|---|--|------------------------------|
| pMP220 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pMP220 vazio, Tc ^R . | SILHAVY <i>et al.</i> , 1984 |
| pPW452 | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pWP452 vazio, Tc ^R . | SPAINK <i>et al.</i> , 1987 |
| pMP220Hrubri_2 308Fw1R:: <i>lacZ</i> | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pMP220 contendo a 1 ^o possível região promotora do gene <i>Hrubri_2308</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_2 308Fw2R:: <i>lacZ</i> | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pMP220 contendo região promotora completa do gene <i>Hrubri_2308</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_3 976:: <i>lacZ</i> | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pMP220 contendo região promotora do gene <i>Hrubri_3976</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_3 977:: <i>lacZ</i> | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pMP220 contendo região promotora do gene <i>Hrubri_3977</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_3 991:: <i>lacZ</i> | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pMP220 contendo região promotora do gene <i>Hrubri_3991</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_3 992:: <i>lacZ</i> | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pMP220 contendo região promotora do gene <i>Hrubri_3992</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pPW452Hrubri_3 997:: <i>lacZ</i> | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pWP452 vazio contendo região promotora do gene <i>Hrubri_3997</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pPW452Hrubri_3 998:: <i>lacZ</i> | <i>H. rubrisubalbicans</i> M1 contando plasmídeo pWP452 vazio contendo região promotora do gene <i>Hrubri_3998</i> . Tc ^R . | Este trabalho |

Sm - estreptomicina, Tc - tetraciclina, Km – Canamicina, Nal – ácido nalidixico e Amp – ampicilina.

4.2. PLASMÍDEOS

Os plasmídeos e construções utilizados neste trabalho estão listados na TABELA 4.

TABELA 4: plasmídeos utilizados nesse trabalho:

| Plasmídeo | Característica | Referência |
|--------------------|---|----------------------------|
| pGEM-T easy vector | Ap ^R ; <i>lacZ</i> , vetor linearizado para clonagem direta de produtos de PCR | INVITROGEN |
| pSUP202.2 | Ap ^R ; Tc ^R ; Cm ^R ; <i>mob</i> site | SIMON <i>et al.</i> , 1983 |
| pUC4K | Ap ^R ; Km ^R ; cassete Tn5 Km | PHARMACIA |
| pSUPHR0065Tn 5Km | Vetor pSUP202.2 contendo gene <i>Hrubri_0065</i> interrompido pelo transposon Tn5Km, Km ^R . | Este trabalho |
| pSUPHR0505Tn 5Km | Vetor pSUP202.2 contendo gene <i>Hrubri_0505</i> interrompido pelo transposon Tn5Km, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM-THr0763Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_0763</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM-THr0842Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_0842</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM-THr1953Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_1953</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM-THr0835Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_0835</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM-THr0839Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_0839</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |

Continua na próxima página

| | | |
|------------------------------------|---|---------------|
| pGEM- THr0935Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_0935</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr1197Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_1197</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr2391Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2391</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr2483Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2483</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr2585Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2585</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr2937Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2937</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr3783Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_3783</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr3948Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_3948</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| Sistema de secreção tipo VI | | |
| pGEM- THr2309Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2309</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr2312Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2312</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |

| | | |
|--------------------|---|---------------|
| pGEM- THr2313Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2313</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr2319Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2319</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr2320Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_2320</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr3993Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_3993</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr3994Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_3994</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |
| pGEM- THr3995Km | Vetor pGEM-T easy contendo gene <i>Hrubri_3995</i> interrompido pelo gene <i>Kan2</i> doado pelo vetor pUC4K, Km ^R . | Este trabalho |

Expressão gênica

| | | |
|---------------------------|--|------------------------------|
| pMP220 | TcR, gene <i>lacZ</i> sem promotor | SILHAVY <i>et al.</i> , 1984 |
| pPW452 | TcR, gene <i>lacZ</i> sem promotor invertido a partir do vetor pMP220 | SPAINK <i>et al.</i> , 1987 |
| pMP220Hrubri_2 308Fw1R | Vetor pMP220 digerido por EcoRI e PstI, ligando a 1 ^o região promotora do gene <i>Hrubri_2308</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_2 308Fw2R | Vetor pMP220 digerido por EcoRI e PstI, ligando toda a região promotora do gene <i>Hrubri_2308</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_3 976 | Vetor pMP220 digerido por EcoRI e PstI, ligando a região promotora do gene <i>Hrubri_3976</i> . Tc ^R . | Este trabalho |

Continua na próxima página

| | | |
|-----------------------|---|---------------|
| pMP220Hrubri_3 977 | Vetor pMP220 digerido por EcoRI e PstI, ligando a região promotora do gene <i>Hrubri_3977</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_3 991 | Vetor pMP220 digerido por EcoRI e PstI, ligando a região promotora do gene <i>Hrubri_3991</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pMP220Hrubri_3 992 | Vetor pMP220 digerido por EcoRI e PstI, ligando a região promotora do gene <i>Hrubri_3992</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pPW452Hrubri_3 997 | Vetor pPW452 digerido por EcoRI e PstI, ligando a região promotora do gene <i>Hrubri_3997</i> . Tc ^R . | Este trabalho |
| pPW452Hrubri_3 998 | Vetor pPW452 digerido por EcoRI e PstI, ligando a região promotora do gene <i>Hrubri_3998</i> . Tc ^R . | Este trabalho |

Sm - estreptomicina, Tc - tetraciclina, Km – Canamicina, Nal – ácido nalidixico e Amp – ampicilina.

4.3. CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTIVO

Estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (SAMBROOK *et al.*, 1989) contendo os antibióticos adequados, sob agitação a 120 rpm, à 37° C. A adição de 15 g/L de ágar ao meio LB origina o meio LA.

As estirpes de *Herbaspirillum spp.* foram cultivadas em meio líquido NFb-malato (KLASSEN *et al.*, 1997), contendo 50 mmol/L de solução de fosfatos (K₂HPO₄ 17,8 g/L; KH₂PO₄ 159,5 g/L) e 20 mmol/L de cloreto de amônio, a 30°C, sob agitação a 120 rpm por tempo suficiente para que atingisse densidade ótica (595 nm) aproximadamente 1,0.

As estirpes crescidas no Instituto James Hutton foram crescidas em um meio M8 suplementado modificado por Marta Maluk (UMS). Esse meio é preparado da

seguinte forma: 1º preparar o meio mínimo: (K_2HPO_4 0,5 mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/L; NaCl 0,2 g/L; tampão MOPS 20 mM; ácido málico 30 mM e NH_4Cl 10 mM). Adicionar 1ml de microelementos ($EDTA-Na_2$ 0,00375 g/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,0016 g/L; $NaMoO_4$ 0,002 g/L; H_3BO_3 0,0025 g/L; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,002 g/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,002 g/L e $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,001 g/L) e ajustar o pH para 7.

Após esterilização por autoclavação, são adicionados 1 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (7,5 g/L), 1 mL de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,2 g/L) e 1mL de mistura de vitaminas (Tiamina HCL 1 g/L; D-Pantotenato de cálcio 2 g/L e Biotina 0,1 g/L). Esses suplementos foram esterilizados por filtração (micropore 0,22 μ m) e adicionados ao meio morno.

Para meio semissólido, foram adicionados 0,15% de ágar para os ensaios de motilidade tipo “*swimming*”, 0,3% para a motilidade tipo “*swarming*” e 1% para a motilidade tipo “*twitch*” ao meio mínimo antes de ser autoclavado.

4.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos e as concentrações utilizadas para *E.coli* e *Herbaspirillum spp.* estão assinalados na TABELA 5:

TABELA 5: Antibióticos e concentrações utilizados nesse trabalho:

| Antibiótico | Concentração final para cultivo de estirpes de <i>E. coli</i> | Concentração final para cultivo de estirpes de <i>Herbaspirillum spp.</i> e <i>Azospirillum spp.</i> |
|------------------------|--|---|
| Estreptomicina (Sm) | 80 μ g.mL ⁻¹ | 80 μ g.mL ⁻¹ |
| Canamicina (Km) | 100 μ g.mL ⁻¹ | 500 μ g.mL ⁻¹ |
| Ampicilina (Amp) | 100 μ g.mL ⁻¹ | 250 μ g.mL ⁻¹ |
| Cloranfenicol (Cm) | 30 μ g.mL ⁻¹ | 30 μ g.mL ⁻¹ |
| Ácido nalidíxico (NaL) | 5 μ g.mL ⁻¹ | 10 μ g.mL ⁻¹ |

Continua na próxima página

Tetraciclina (Tc)

10 µg.mL⁻¹10 µg.mL⁻¹

As soluções estoques de antibióticos Canamicina, ampicilina e estreptomicina, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore HAWP 25 0,45 µm). A solução estoque de tetraciclina foi preparada em etanol 70% e a solução de cloranfenicol foi dissolvido em DMSO. Todas as soluções de antibióticos foram estocadas a -20°C e as soluções em uso foram mantidas a 4°C.

4.5. PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

Os primers foram construídos através da ferramenta “*Primer-BLAST*” do sítio do NCBI (YE *et al.*, 2012). A lista dos primers utilizados nesse trabalho mostram a sequência, o gene amplificado, o tamanho do produto de PCR e a temperatura de fusão (TM). Esses dados serão apresentados na TABELA 6, a seguir.

TABELA 6: Primers construídos e utilizados nesse trabalho:

| Primer | Sequência | Gene | TM (°C) |
|-------------------|--------------------------------|---|---------|
| Y1 | TGGCTCAGAACGAACGCTG GCGGC | Amplifica em torno de 1,5 kb do gene 16S | 55 |
| Y3 | CTGACCCCACTTCAGCATTG TTCCAT | | 55 |
| Hrubri_0065 Fw | CACCCGGATGTCAGATCGT C | Amplifica 343 pb do gene <i>Hrubri_0065</i> , codifica para uma | 60 |

Continua na próxima página

| | | | |
|-------------|----------------------|--|----|
| Hrubri_0065 | CGGTCAACACCGAATACCC | proteína hipotética, presente no cluster <i>pilT</i> | 60 |
| Rv | A | | |
| Hrubri_0505 | CGTATTGCTCAGCGGTTGT | Amplifica 356 pb do gene <i>Hrubri_0505</i> , codifica para uma proteína sensora de oxigênio | 60 |
| Fw | G | | |
| Hrubri_0505 | TGGCGGCACAGATCAGAAA | | 60 |
| Rv | T | | |
| Hrubri_0762 | CGTGACCGTCTACAAGGGT | Amplifica 366 pb do gene <i>Hrubri_0762</i> , codifica para Adh | 60 |
| Fw | T | | |
| Hrubri_0762 | AATACCGGCAGGCTGATGT | | 60 |
| Rv | C | | |
| Hrubri_0842 | CGCTGTTCAATCGTCGTTCC | Amplifica 388 pb do gene <i>Hrubri_0842</i> , codifica para uma porina | 60 |
| Fw | | | |
| Hrubri_0842 | TCATACACGTCGGTGTAGC | | 60 |
| Rv | G | | |
| Hrubri_1953 | GCGCTCTCCAAGGAAGTCA | Amplifica 637 pb do gene <i>Hrubri_1953</i> , codifica para a flagelina | 60 |
| Fw | A | | |
| Hrubri_1953 | TGGCCAGCGAGATGTTCTT | | 60 |
| Rv | C | | |
| Hrubri_0835 | CATCGCCTATGACCGTCTGA | Amplifica 513 pb do gene <i>Hrubri_0835</i> , codifica para um componente do transportador ABC | 60 |
| Fw | | | |
| Hrubri_0835 | GAATACTGCTCGCCACGGA | | 60 |
| Rv | T | | |
| Hrubri_0839 | CTGTTCCGTCATTGCGACCT | Amplifica 419 pb do gene <i>Hrubri_0839</i> , codifica para a xilose desidrogenase | 60 |
| Fw | | | |
| Hrubri_0839 | CACAGCTTGATCTGGCGTTC | | 60 |
| Rv | | | |

Continua na próxima página

| | | | |
|-------------|-----------------------|--|----|
| Hrubri_0935 | CATCGCTGCACCTTTGACCT | Amplifica 603 pb do gene <i>Hrubri_0935</i> , codifica para a acetil transferase GNAT | 60 |
| Fw | | | |
| Hrubri_0935 | CATCATCGCGTCAGCCGTA | | 60 |
| Rv | G | | |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_1197 | TTTCCGTGGTTCGATGATGGT | Amplifica 343 pb do gene <i>Hrubri_1197</i> , codifica para um regulador GlcG like | 60 |
| Fw | G | | |
| Hrubri_1197 | GCGATCTGCACGTCTTCCG | | 60 |
| Rv | A | | |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_2391 | ATGCGCTGCATCGATACGTT | Amplifica 483 pb do gene <i>Hrubri_2391</i> , codifica para uma proteína Ferro enxofre | 60 |
| Fw | | | |
| Hrubri_2391 | CCCTATTTTCGAGGTGAGGG | | 60 |
| Rv | C | | |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_2483 | ACGGTGGCAATATCCGTGA | Amplifica 597 pb do gene <i>Hrubri_2483</i> , codifica para uma proteína | 60 |
| Fw | C | | |
| Hrubri_2483 | CGATCTTTTCACCCATCGCC | | 60 |
| Rv | | | |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_2585 | AACCGAAGAATTCATGCGC | Amplifica 405 pb do gene <i>Hrubri_2585</i> , codifica para uma proteína | 60 |
| Fw | C | | |
| Hrubri_2585 | TAGCTGGCGTACAGGAAGG | | 60 |
| Rv | A | | |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_2937 | CAATGCCAACCCCGAACTCT | Amplifica 361 pb do gene <i>Hrubri_2937</i> , codifica para uma proteína | 60 |
| Fw | | | |
| Hrubri_2937 | GAAGGTGTAGCGGGCATGA | | 60 |
| Rv | A | | |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_3783 | AGCCCCTTGCCCTTCATTC | | 60 |
| Fw | | | |

Continua na próxima página

| | | | |
|-------------|---------------------|---|----|
| Hrubri_3783 | AGGATTACAGCCAGGTGTG | Amplifica 550 pb do gene | |
| Rv | G | <i>Hrubri_3783</i> , codifica para uma proteína | 60 |

| | | | |
|-------------|----------------------|---|----|
| Hrubri_3948 | GATCCGCGCTATCGCTTCAA | Amplifica 301 pb do gene | 60 |
| Fw | | <i>Hrubri_3948</i> , codifica para uma proteína | |
| Hrubri_3948 | AAGGTGGCTGCTGTTTGTTG | | 60 |
| Rv | | | |

Sistema de secreção tipo VI

| | | | |
|-------------|----------------------|--|----|
| Hrubri_2309 | CTGCTTCGAAATGACCTCCG | Amplifica 402 pb do gene | 60 |
| Fw | | <i>Hrubri_2309</i> , codifica para o Hcp | |
| Hrubri_2309 | CAGCCCTTCATCAGCATCCC | | 60 |
| Rv | | | |

| | | | |
|-------------|----------------------|---|----|
| Hrubri_2312 | CACAATTCAGCCGCTTCGAC | Amplifica 563 pb do gene | 60 |
| Fw | | <i>Hrubri_2312</i> , codifica para ImpH | |
| Hrubri_2312 | CACCTTGCTGCCGATGTAG | | 60 |
| Rv | A | | |

| | | | |
|-------------|----------------------|---|----|
| Hrubri_2313 | ATGTGGCGATCTTCCTTCCG | Amplifica 1399 pb do gene | 60 |
| Fw | | <i>Hrubri_2313</i> , codifica para o VgrG | |
| Hrubri_2313 | GGATGGAAATAGTCGGGCG | | 60 |
| Rv | T | | |

| | | | |
|-------------|----------------------|---|----|
| Hrubri_2319 | CCCAGCACATGCAACAGAA | Amplifica 1174 pb do gene | 60 |
| Fw | C | <i>Hrubri_2319</i> , codifica para ImpJ | |
| Hrubri_2319 | ACTTCATCCTTGTCCAGCGG | | 60 |
| Rv | | | |

| | | | |
|-------------|---------------------|---|----|
| Hrubri_2320 | CCACAATGGACATCCACCG | Amplifica 630 pb do gene | 60 |
| Fw | A | <i>Hrubri_2320</i> , codifica para DotU | |

Continua na próxima página

| | | | |
|-------------|----------------------|---|----|
| Hrubri_2320 | ACTGTGCTGCCAATCGGTAT | | 60 |
| Rv | | | |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_3993 | CTATCACGAAACACGCCTG | | 60 |
| Fw | C | Amplifica 1182 pb do gene | |
| Hrubri_3993 | | <i>Hrubri_3993</i> , codifica para ImpJ | |
| Rv | TACATCGCCCCCTTGCTTTC | | 60 |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_3994 | CTCGCTGCTAGACCTGATGT | | 60 |
| Fw | A | Amplifica 600 pb do gene | |
| Hrubri_3994 | | <i>Hrubri_3994</i> , codifica para DotU | |
| Rv | CAGTTCAGCCCCAGGTAGG | | 60 |
| <hr/> | | | |
| Hrubri_3995 | AGTTGGCACCCGGAAAAGA | | 60 |
| Fw | T | Amplifica 1869 pb do gene | |
| Hrubri_3995 | CACAACGCTGTTTCGGTAAA | <i>Hrubri_3995</i> , codifica VgrG | |
| Rv | GG | | 60 |
| <hr/> | | | |

4.6. MANUTENÇÃO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C para uso frequente ou -80°C para estoques mantidos por mais de 3 meses.

Para estoques para até 6 meses, as estirpes de *Herbaspirillum spp.* foram estocadas em frascos de vidros de 5 mL contendo 3 mL de meio NFbHPN malato semissólido, a temperatura ambiente, sem agitação e devidamente lacrados com filme de silicone. As estirpes de *A. brasilense* foram mantidas em meio NFbHPN lactato, da mesma forma que as estirpes de *Herbaspirillum spp.* Para estoques para uso em até 7 dias, as estirpes podem ser mantidas em meio sólido suplementado com os antibióticos adequados.

O repique dos estoques de glicerol devem ser realizados a cada 6 meses e devem ser mantidos com os antibióticos adequados para evitar excisão dos plasmídeos. Estoques mantidos em meio semissólido devem ser repicados a cada 6 meses e mantidos com os antibióticos adequados.

4.7. TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.7.1. Extração de DNA genômico

Como a qualidade do DNA genômico utilizado nesse trabalho não é um ponto crítico. A extração é simples, feita a partir da fervura direta de 3 colônias em 50 μ L de H₂O ultrapura durante 15 minutos, seguido de banho de gelo e centrifugação do extrato a 10000 x G por 1 minuto.

4.7.2. Extração e purificação de DNA plasmidial

A técnica utilizada é a lise alcalina ou miniprep (SAMBROOK, 1989). 1,5 mL de cultura bacteriana crescida por até 18 horas contendo antibióticos é centrifugada por 1 minuto a 12.000 x G. A massa celular resultante é ressuspensa em 150 μ L de tampão GET (glucose 50 mM, EDTA 1 mM, Tris 25 mM pH 8) que serve para inativar nucleases. São adicionados 150 μ L de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M) ao sistema de extração, que deve ser suavemente homogeneizado por inversão durante 2 minutos, para que não sejam liberados fragmentos de DNA genômico ao sistema de extração. O tampão de lise é neutralizado através da adição de 150 μ L de tampão KCAF (tampão fosfato e ácido fórmico 3M, pH 4,8). A neutralização leva em torno de 15 minutos, em descanso em banho de gelo. Após neutralizada, as amostras serão centrifugadas por 5 minutos a 10000 x G, de modo a retirar os restos celulares do

sistema de extração. A purificação é feita a partir de extração orgânica com 150 µL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) que serão centrifugados para desfazer a emulsão. A porção aquosa é retirada e é adicionada 3 volumes de etanol absoluto, que leva a condensação do DNA, essa etapa é mantida em banho de gelo durante 30 minutos para aumentar o rendimento. Esse sistema é centrifugado por 30 minutos a 12000 x G e o sobrenadante é desprezado. A última etapa de purificação através da adição de 1 mL de etanol 70% e centrifugação a 12000 x G por mais 15 minutos. O sobrenadante é desprezado e esse sistema é evaporado em rotaevaporador por 30 minutos. O DNA é ressuspendido em 30 µL de água ultrapura. 10% do volume da amostra foi analisado em eletroforese em gel de ágarose 1% como forma de controle de qualidade.

4.7.3. Eletroforese em gel de ágarose

A amostra é misturada com tampão de corrida de amostra FSUDS (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, Ficoll® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,025%) numa proporção de 5:1 e aplicadas diretamente no sistema contendo o gel de ágarose. O sistema consiste de uma cuba eletroforética contendo volume adequado de tampão TAE (EDTA dissódico 1 mM; Tris 40 mM e ácido acético glacial 20 mM), condutor de corrente elétrica e um gel de ágarose (1%) preparado com tampão TAE. É aplicada corrente elétrica nesse sistema, forçando com que a amostra que teve sua carga elétrica ajustada como negativa pelo excesso de SDS, percorra a malha do gel de ágarose, sendo separado pelo tamanho das moléculas presentes na amostra, com as moléculas maiores percorrendo distâncias menores. A voltagem e o tempo de corrida variaram conforme a voltagem, amostra e comprimento do gel. Após a eletroforese, o gel será tratado com brometo de etídio, agente alquilante de DNA que permite sua visualização sob luz ultravioleta 320 nm, utilizando o sistema UVP (BioImagin Systems).

4.7.4. Restrição do DNA

A restrição do DNA foi realizada conforme os protocolos dos fabricantes das enzimas de restrição (FERMENTAS ou INVITROGEN). O cálculo das unidades de enzima, tempo de restrição e análise de restrição das diversas sequências contidas nesse trabalho foram realizados através de informações e ferramentas disponibilizadas por New England Biolabs (NEB), para evitar desperdício. A clivagem foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

4.7.5. Ligação de fragmentos de DNA

O vetor linearizado e o fragmento de DNA de interesse, devidamente clivado com as enzimas de restrição adequadas, foram quantificados através de densitometria em sistema UVP (BioImagin Systems) após eletroforese, usando o padrão de peso molecular 1 Kb "*Ladder*" (FERMENTAS) como referência. O sistema de reação de ligação continha vetor linearizado e DNA inserto em uma razão molar de aproximadamente 1:5 mol; T4 DNA ligase; e tampão de ligação, perfazendo o volume final de 10 µL. A reação é incubada a 16°C por até 48 horas. O produto da reação é utilizado na transformação adequada para as estirpes em questão.

4.7.6. Amplificação do DNA via PCR

O sistema de reação de PCR contém: 0,5 pmol de cada primer; 10 ng de DNA molde; 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ e 1 unidade enzimática de TaqDNA polimerase e tampão para a enzima conforme instruções do fabricante.

Os primers foram desenhados para que as temperaturas de fusão fossem 60°C, de modo que os parâmetros utilizados nas PCRs fossem os mesmos, como descritos a seguir:

- Desnaturação inicial 96°C 5 minutos
 - Ciclos (30 a 35 ciclos):
- Desnaturação 96°C por 60 segundos
- Anelamento: 60°C por 30 segundos
- Extensão: 72°C 1 minuto por 1kb de DNA amplificado
 - Etapa de finalização: 72°C por 7 minutos

As reações foram calculadas para 10 µL e 2 µL do produto de PCR são aplicados em gel de ágarose 1% como controle de qualidade.

4.7.7. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de Sanger utilizado precisa de 2 etapas: 1 – amplificação do fragmento de interesse da forma comum. 2 – Amplificação com dideoxynucleotídeos, que finalizam à o alongamento do fragmento, permitindo avaliar uma sequência de interesse. Foi utilizado o sequenciamento para analisar a sequência do gene mutante, plasmídeos e confirmar a espécie bacteriana que estamos trabalhando.

1° etapa: Após feita a reação de PCR do fragmento de interesse, ele foi tratado com 1 unidade de exonuclease I e fosfatase alcalina e incubado por 45 minutos a 37°C.

2° etapa: 200 ng do DNA molde da 1° etapa é utilizado para a reação de terminação de cadeia (segundo o protocolo de GE healthcare science). A reação contém 3 µL do tampão contendo mistura de dideoxynucleotídeos, 0,5 pmol de um dos

primers e água ultrapura suficiente para completar 10 µL. Os parâmetros da reação foram 1 minuto a 95°C e 35 ciclos de 1 minuto a 57°C e 3 minutos a 60°C.

O produto de PCR de terminação foi precipitado utilizando 200 mM de acetato de amônia e 2 volumes de etanol absoluto. Essa solução é incubada em banho de gelo por 30 minutos e é centrifugada a 10000 x G por 20 minutos. O sobrenadante é desprezado, lavado com 200 µL de etanol 70% e centrifugado por 15 minutos a 10000 x G. O sobrenadante é desprezado. A amostra é desidratada via rotaevaporação por 30 minutos e está pronta.

As amostras foram analisadas em um ABI PRISM 377 (Amersham-biosciences). Os resultados foram avaliados através do algoritmo BLAST do NCBI.

4.8. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

4.8.1. Transformação bacteriana utilizando células quimiocompetentes

A metodologia foi adaptada de Chung e colaboradores (1989). A bactéria TOP10 foi inoculada em meio LB e incubada a 37°C sob agitação até atingir uma D.O.₆₀₀ em torno de 0,5, 1,5 mL dessa cultura foi centrifugado por 1 minuto a 10000 x G e o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em tampão TSS (meio LB contendo 10% (p/v) de PEG8000; 5% (v/v) de SDS; 50 mM MgCl₂), 5 ng de DNA plasmidial foram adicionados ao sistema e o mesmo foi incubado em banho de gelo por 30 minutos. O sistema foi incubado em banho Maria a 42°C, por 45 segundos e imediatamente transferido para o banho de gelo por 1 minuto. 400 µL de meio LB foi adicionado ao sistema e as células foram recuperadas por 1 hora a 37°C. A suspensão foi plaqueada em meio LA contendo antibióticos de seleção e incubar até o aparecimento de colônias.

As colônias crescidas foram selecionadas e utilizadas para preparar DNA plasmidial para confirmação.

4.8.2. Transformação bacteriana utilizando células eletrocompetentes

A metodologia foi adaptada de Dower e colaboradores (1990). Em 10 mL de NFb-Malato contendo 10 mM de mistura de fosfatos, foi inoculado 1% de cultura saturada e incubado a 30°C/120 rpm até que a D.O.₆₀₀ atinja 1,0. A cultura foi centrifugada sob refrigeração (4°C) por 30 minutos a 4000 x G, o sobrenadante foi desprezado e as células lavadas com 1 volume de água ultrapura estéril gelada, essa etapa de lavagem foi repetida 3 vezes. Após a lavagem com água, as células foram lavadas com 1 volume de glicerol 10% e centrifugadas novamente, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas no glicerol adsorvido no frasco e divididas em alíquotas de 400 µL. Para a eletroporação 5 ng de DNA plasmidial foram misturados com uma alíquota e eletroporado em um Cell Porator (life technologies) com as seguintes especificações:(4 KΩ, 330 µF para *E. coli* e 2,8 KΩ, 330 µF para *H. rubrisubalbicans*). Após eletroporação 1 mL de meio NFb-Malato foi adicionado e as células recuperadas por 3 horas. Após esse período as células foram plaqueadas em meio NFb-Malato sólido contendo antibióticos de seleção e incubadas até o aparecimento de colônias.

As colônias selecionadas (mutantes) foram confirmadas via sequenciamento direto das colônias.

4.9. MÉTODOS DE COMPETIÇÃO DIRETA

4.9.1. Competição em placa de 96 poços

Para avaliar o nível de competitividade das estirpes mutantes do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1, foi realizado o cocultivo da estirpe mutante contra estirpes selvagens (*H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *Azospirillum brasilense*

FP2). A diferença competitiva entre *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* já é conhecida (TULESKI *et al.*, 2019; este trabalho), além delas escolhemos *A. brasilense* por se tratar de uma bactéria associativa competente e geneticamente mais distante do que outras espécies do gênero *Herbaspirillum*.

O T6SS é ativado por contato, dessa forma escolhemos o crescimento estático. As placas de 96 poços foram escolhidas devido a comodidade e bom ritmo de crescimento que as estirpes comumente apresentam.

As diferentes estirpes foram cultivadas de forma simples por 18 horas no dia anterior ao experimento. A D.O.₅₉₅ foi ajustada para 0,050 e foram inoculadas 1:1 em meio NfB malato suplementado sem antibióticos. Para a competição contra o *A. brasilense* FP2, os meios de cultura foram misturados 1:1, considerando que a composição e a suplementação são distintas (Matérial suplementar TABELA 2S).

As placas foram incubadas em estufa a 30°C. Tomamos alíquotas nos tempos 0, 3, 6 e 12 horas para avaliar as UFC.mL⁻¹, através da contagem direta por micro gota.

4.10. ENSAIOS “*in planta*”

4.10.1. Desinfecção das sementes de milho e sorgo

A desinfecção das sementes de milho foi feita com etanol 70% por 5 minutos, o etanol foi descartado e uma solução de hipoclorito de sódio 12% contendo 0,5% de polissorbitano 20 foi adicionada por mais 15 minutos. As sementes foram lavadas com água ultrapura 3 vezes e preparadas para o plantio hidropônico.

Para as sementes de sorgo, foi utilizado o protocolo acima, porém sem a desinfecção por etanol 70%, visto que as sementes desidratam facilmente.

4.10.2. Plantio de milho e sorgo

O plantio foi feito em placas de Petri contendo ágar-água (0,8% de ágar (p/v) em água ultrapura). As sementes desinfetadas foram transferidas para a placa de Petri e incubadas por até 3 dias (suficiente para que a plântula obtenha 1 centímetro de comprimento). Para o sorgo, o plantio em ágar-água foi substituído pelo plantio em vermiculita estéril.

4.10.3. Inoculação das plântulas de milho e sorgo

As plântulas foram retiradas da placa de Petri e submersas em uma suspensão de células (10^5 células.mL⁻¹) e incubadas por 30 minutos sob agitação (30°C a 120 rpm). Após esse período, são lavadas com solução NaCl 0,9% estéril 3 vezes e colocadas para crescer em tubos de ensaio de 60 mL de volume contendo 25 mL de “*plant-medium*” (HOAGLAND & ARNON, 1950) estéril, onde apenas a raiz da plântula esteve em contato com o meio (FIGURA 1).

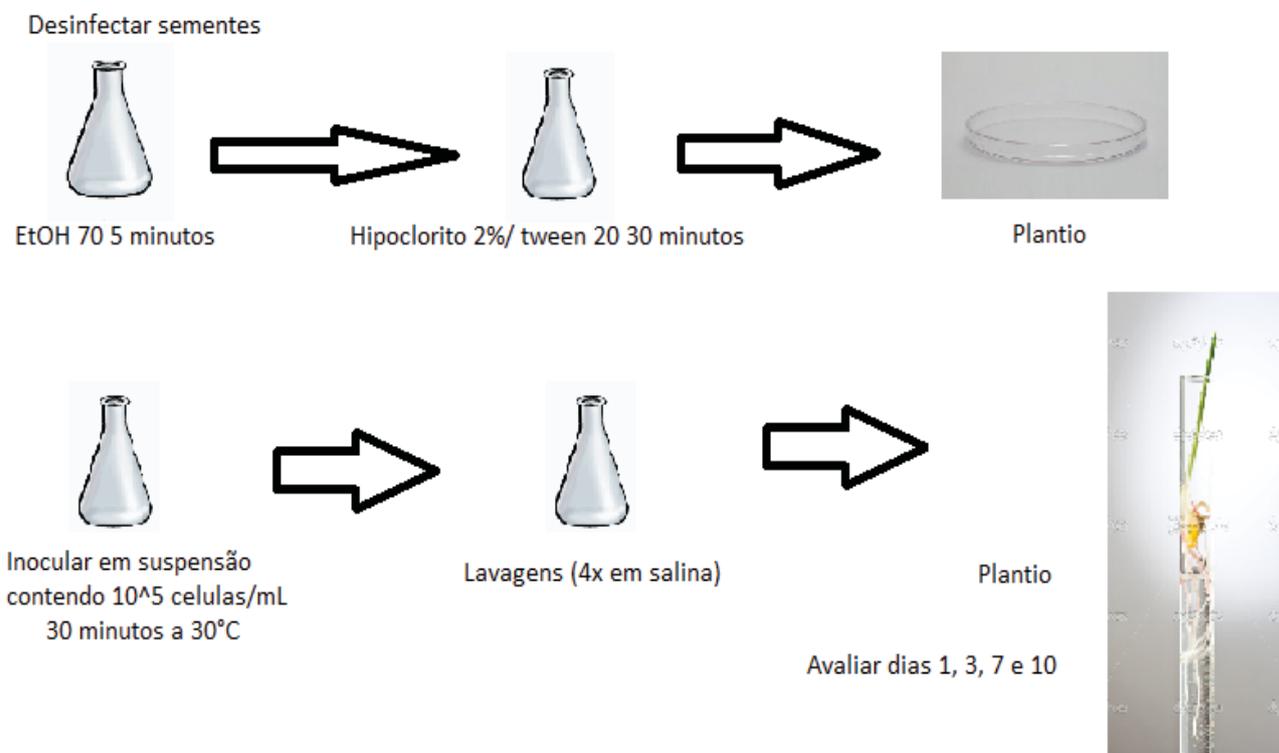


FIGURA 1: Esquema de plantio hidropônico e inóculo em tubo de ensaio.

4.10.4. Ensaios de adesão, colonização epifítica e endofítica de plântulas de milho

Para os ensaios de adesão e colonização epifítica a raiz principal foi seccionada e pesada de modo asséptico, utilizando um micro tubo estéril. 1 mL de salina estéril foi adicionado ao sistema e esse foi colocado sob agitação extrema (vortex) por 1 minuto. O sobrenadante foi diluído (diluições seriadas) e plaqueado pela técnica da micro gota ou *pourplate*.

Para o ensaio de colonização endofítica, a raiz resultante do ensaio de colonização epifítica teve sua superfície esterilizada através de 1 mL de etanol 70% por 1 minuto, o etanol foi desprezado e a raiz foi ressuspensa em salina estéril por 1

minuto. A raiz foi macerada em um graal e com o macerado foi feita diluição seriada, que foi plaqueada utilizando a técnica da micro gota ou *pourplate* (FIGURA 2).

O esquema a seguir exemplifica o processo:

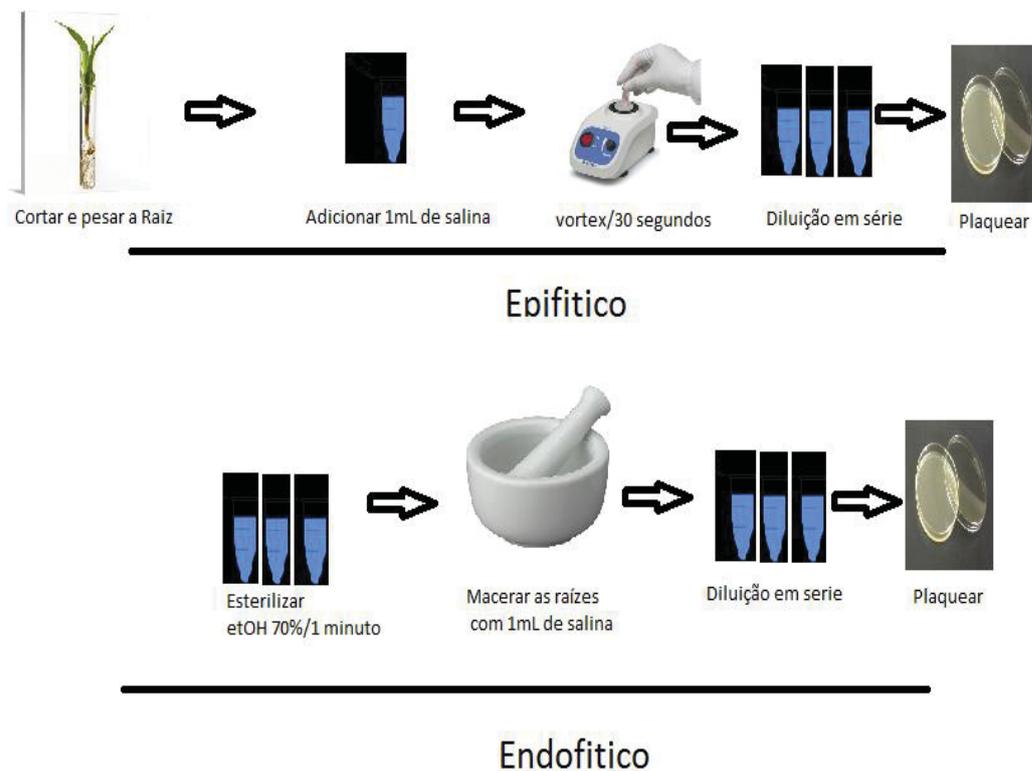


FIGURA 2: Esquema dos ensaios de adesão, colonizações epifítica e endofítica.

4.10.5. Ensaio de competição epifítica

Os ensaios de competição epifítica de raízes de milho foram realizados utilizando diferentes estirpes, em proporção 1:1 (selvagem:mutante), mantendo o total de 10^5 células.mL⁻¹ de inóculo.

O restante dos experimentos segue como descrito no item 4.10.4.

4.11. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. rubrisubalbicans* M1 EM CAUSAR A DOENÇA DA ESTRIA VERMELHA EM CULTIVAR SUSCEPTÍVEL DE *Sorghum bicolor*.

As estirpes de *H. rubrisubalbicans* foram inoculadas de duas maneiras: 500 μL de uma suspensão celular contendo 10^5 células. mL^{-1} por perfuração do colmo da planta ou 1 mL de uma suspensão celular contendo 10^7 células. mL^{-1} diretamente sobre a raiz da planta.

O desenvolvimento da doença foi avaliado através do aparecimento de manchas vermelhas nas folhas até 21 dias após o inóculo.

4.12. ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE BIOFILME ATRAVÉS DA FIBRA DE VIDRO

O ensaio se baseia na ligação da biomassa à lã de vidro e a capacidade de quantificação pela coloração com violeta genciana.

50 mg de fibra de vidro estéril foram adicionados a 10 mL de cultura cultivadas em meio NfbHPN ou somente em 10 mL de meio NfbHPN (controle negativo). As amostras foram incubadas por 16 horas a 30°C e 120 rpm.

O sobrenadante foi desprezado e a fibra de vidro foi lavada 3 vezes com salina estéril. 1 mL de solução de violeta genciana 1% (p/v) foram adicionados e após 5 minutos o sobrenadante foi desprezado. A fibra de vidro foi lavada com salina até que não desprendesse resíduos da coloração. 1 mL de etanol absoluto foi adicionado, o que causou a remoção do corante, e essa solução teve a sua absorbância determinada a 550 nm.

Os resultados correspondem a D.O._{550} das amostras subtraída da D.O._{550} do controle negativo. Os resultados reportados representam a média de pelo menos três experimentos independentes, cada um com amostras em duplicata.

4.13. ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA β -GALACTOSIDASE

Foram construídos primers que amplificaram as regiões promotoras dos clusters que codificam para os T6SS. Esses produtos de PCR foram ligados nos vetores de expressão pMP220 (SILHAVY *et al.*, 1984) e pPW452 (SPAINK *et al.*, 1987), esses vetores contam com o gene *lacZ* a jusante do seu sitio de clonagem, de modo que o vetor pMP200 pode avaliar a expressão de regiões promotoras com sequências na orientação 5'->3' e o vetor pPW452 pode avaliar a expressão de regiões promotoras com sequências na orientação 3'->5', para uma dada condição escolhida para o ensaio, avaliada conforme fenótipos de interesse ou a presença de sequências consenso para reguladores transcricionais. Nesse caso foi avaliado o ciclo de vida da bactéria (3, 6 e 24 horas), presença da planta ou metabólitos (raízes estéreis diretamente na cultura ou extrato de raízes de sorgo e cana-de-açúcar suscetíveis a doença), estresse oxidativo (1 mM de peróxido de hidrogênio), estresse térmico (45°C por 30 minutos) e presença de bactérias competidoras (*H. seropedicae* SmR1 e *E. coli*).

A partir de um pré-inóculo, a cultura foi ajustada para D.O.₅₉₅ de 0,1 e foi cultivada em incubadora agitadora (30°C por 120 RPM) por 3 horas. No ponto de 3 horas as condições de escolha são alocadas e a bactéria será incubada como previamente por mais 3 horas. Adicionamos 200 μ L da cultura (contém a enzima), 500 μ L de tampão Z completo (Na₂HPO₄ 0,06 M; NaH₂PO₄ 0,04 M; KCl 0,01 M e MgSO₄ 0,001M. Filtrar com membrana bacteriológica e ajustar o pH para 7. Na hora do uso, adicionar 5 μ L de β -mercaptoetanol por mL de tampão Z) e 100 μ L de ONPG (substrato). Esse sistema deve ser ajustado a 30°C antes do experimento começar. Esse experimento é de cinética enzimática, desse modo o tempo percorrido pelo experimento foi rigorosamente anotado.

A D.O.₅₉₅ (crescimento celular), D.O.₄₅₀ (produto colorimétrico da atividade enzimática) e D.O.₅₅₀ (refringência causada por restos celulares) são medidas e o cálculo da atividade de β -galactosidase é calculada (unidades Miller) como mostrado na equação a seguir:

EQUAÇÃO 1: Cálculo da atividade de β -galactosidase segundo Miller e colaboradores (1972):

$$\frac{D. O. (450 \text{ nm}) - [1,75 \times D. O. (550 \text{ nm})]}{\text{Tempo} \times \text{Volume} \times D. O. (595 \text{ nm})}$$

4.14. ENSAIOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As análises foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM) JEOL1400 (Jeol, Nieuw-Vennep, Tokio). As amostras foram analisadas sob tensão de 80 kV por terem sido analisadas através da técnica de “*negative staining*”, com a amostra sendo impregnada com metais pesados e aplicada sobre discos de níquel (nickel mesh 200 da TEM Technologies) encapados por polímeros de nitrocelulose (parlodion) ou plásticos (formvar). Os procedimentos serão descritos a seguir:

1 – Fixação: foi utilizado tampão cacodilato com fixador glutaraldeído (ácido cacodílico 0,2 M; glutaraldeído 2% v/v adicionado no momento da utilização) em proporção 1:1 diretamente com a cultura bacteriana (D.O.₅₉₅ previamente ajustada para 1,0). As amostras são seladas em microtubos de 2 mL de volume e acondicionadas a 4°C até o momento da impregnação com metal pesado.

2 – Contraste por impregnação com metais pesados: a escolha do metal pesado depende da estrutura analisada e do pH da amostra. Aqui foi utilizado o acetato de molibdênio (0,5% v/v) por se tratar da coloração de fundo mais branda em relação ao estresse osmótico e não ter formado precipitados metálicos durante o ensaio. A amostra fixada foi diluída com acetato de amônio (1% p/v) em proporção 1:4 (amostra : diluente) e em seguida foi adicionado acetato de molibdênio em proporção 1:1 com a amostra fixada e diluída. Foram aguardados no mínimo 60 minutos para a impregnação e então a amostra pode ser aplicada sobre os discos para a análise.

3 – Aplicação: A aplicação é feita via adsorção na superfície do disco, para isso é utilizado ambiente estéril onde uma gota da amostra é aplicada sobre uma superfície sólida e o disco é posicionado sobre a amostra durante 20 segundos. O disco adsorvido de amostra é secado por 60 minutos e pode ser analisado no microscópio.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. rubrisubalbicans* M1 CONSTRUÍDAS DEVIDO A MUTAÇÕES EM GENES QUE SÃO REGULADOS POSITIVAMENTE DURANTE A INTERAÇÃO ENTRE *H. rubrisubalbicans* M1 COM AS RAÍZES DE *Sorghum bicolor*.

Nessa seção de apresentação de resultados, todos os resultados serão agrupados por estirpe mutante. Aqui será mostrados a análise “*in silico*” para o gene, percorrendo sobre a vizinhança gênica, E análise da região promotora mostrando possíveis sítios para proteínas transcricionais e a sequência iniciadora. A demonstração dos sítios será feita utilizando-se fonte diferenciada para as regiões iniciadoras e através de parêntesis logo à frente do sítio. A análise dos operons e das regiões promotoras foram feitas na plataforma SOFTBERRY (FGENESB e BROM) (SALOVYEV & SALAMOV, 2011).

Em seguida serão mostrados os fenótipos importantes para a interação planta-bactéria das estirpes mutantes em relação a estirpe selvagem, sendo eles: curva de crescimento, formação de biofilme em função do tempo, perfil motilidade, perfil de colonização das raízes de sorgo simples e sob competição contra a estirpe selvagem, formação de sinais de doença no sorgo e microscopia eletrônica (quando aplicável).

Para as análises das curvas de crescimento, análise dos Perfis de colonização, ensaios de motilidade e formação de biofilme, serão mostradas tabelas comparativas na seção de discussão.

Para as microscopias eletrônicas, infelizmente vários desses mutantes apresentam fenótipo de fragilidade osmótica em relação a estirpe selvagem, de modo que a apresentação das figuras não seria proveitosa, assim algumas foram omitidas.

*****Todas as figuras e gráficos estão contidos nos materiais suplementares, no final dessa tese. Página 252 apresenta TABELA-RESUMO de todos os resultados. Nas tabelas, a motilidade é variável discreta em milímetros, eventualmente os resultados podem se repetir.***

5.1.1. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0065

O gene *Hrubri_0065* codifica para uma proteína hipotética. Não conta com homologia relevante, mas está presente em várias espécies de do gênero *Herbaspirillum spp.* Este gene é vizinho do gene *pilT*, a análise da vizinhança sugere que esse gene não faz parte de nenhum operon. Sua região promotora conta com TATA box e sítios para reguladores transcricionais SoxS e RpoD17, como mostrado a seguir.

caaAATTTCT(SoxS)tgcgAGTGGCCATTgaagtCCGCCTTTT(Rpod17)GGCCG
 ACTAGAgagaagactcgtcgcgccgtcagcgcattgttctgactcaagccagcaggcgcggcaccggaagc
 gcccttgccgcttctccgcacgcagaccgatcagcctcagcagttctaccaaggagatacc

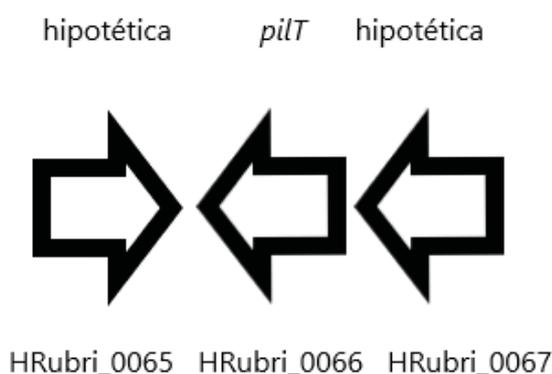


FIGURA 3: Configuração do operon *HRubri_0065HRubri_0066HRubri_0067*.

Embora não conte com informações adicionais na literatura, esse gene pode estar relacionado com a formação pilus tipo *Twitch*, sendo um dos ensaios adicionais realizados. É homólogo ao gene Hsero_0053 em *H seropedicae* SmR1, informação que pode ser utilizada pelo grupo de pesquisa no futuro. Podemos observar fenótipo de crescimento diminuído em relação a estirpe selvagem (Figura S1), fenótipo de

formação de biofilme inalterada (Figura S2), ultraestrutura inalterada com presença de flagelos (Figura S3). Apenas o fenótipo de motilidade tipo “*twitch*” se mostrou menor do que a estirpe selvagem, de acordo com a análise “*in silico*” (Figura S4). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo não apresentou atenuação (Figura S5) e os Perfis de colonização das raízes do sorgo simples (Figura S6) e o perfil de competição na colonização das raízes do sorgo (Figura S7) não apresentaram alterações significativas em relação a estirpe selvagem. Os resultados referentes a estirpe Hrubri_0065 estão dispostos na tabela 7, a seguir:

TABELA 7: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0065.

| Resultados da estirpe Hrubri_0065 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,77 | 0,1118 | 1,52 | 1,080* | 0,0188 | 2,18 | 2,38 | 0,5256 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 6,80 | 0,3953 | 5,25 | 5,10 | 0,2761 | 0,98 | 0,5913* | 0,00001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,45 | 6,39 | 0,6990 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,67 | 8,68 | 0,9716 | 8,13 | 7,85 | 0,3640 | 8,54 | 8,32 | 0,4354 | 8,32 | 8,45 | 0,6584 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,20 | 5,65 | 0,1322 | 5,82 | 5,61 | 0,4776 | 5,13 | 5,72 | 0,0596 | 6,30 | 5,69 | 0,0569 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,83 | 6,39 | 0,1486 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |

Continua na próxima página

| | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|
| 7,56 | 8,680* | 0,0016 | 7,50 | 7,85 | 0,244 | 7,45 | 8,318* | 0,0092 | 7,58 | 8,445* | 0,0092 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,65 | 5,20 | 0,142 | 5,60 | 5,82 | 0,4572 | 5,70 | 5,13 | 0,0676 | 5,69 | 6,36 | 0,0686 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,3964* | 0,0192 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante não apresentou alteração de fenótipo em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Mutante apresenta irregularidades no muco que recobre a membrana externa | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.2. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0505

O gene *Hrubri_0505* codifica para uma proteína hipotética que contém domínio ATTG. É disseminada no gênero *Herbaspirillum spp.* Faz vizinhança genica com clusters que codificam para sensores de aerotaxia (*aer*) e regulador do sistema de 2 componentes GGDEF (diguanylate ciclase). Não faz parte de operon e não forma cluster gênico. Sua região promotora está mostrada a seguir:

```
cggtcatgccttggtcgtgtctgcgagtgcggtactgaggagtcTGGAGActAGAGGGAG(RpoS
17)atgggtaGGCTATTATctggtctttggcggttatg
```

Esse gene conta com escassa informação na literatura, mesmo considerando o cluster aer. Nossos dados de microscopia eletrônica corroboram com a informação que esse gene está relacionado com o sensoriamento de oxigênio, visto as vacuolações presentes na figura 10S, características de estresse oxidativo. Esse gene é homólogo do gene *Hsero_0515*. Podemos observar fenótipo de crescimento

inalterado (figura 8S), fenótipo de formação de biofilme diminuído em relação a estirpe selvagem no ponto de 96 horas (figura 9S), ultraestrutura com formação de vacuolações de membrana, indicativo de estresse oxidativo, compatíveis com a análise “*in silico*” (figura 10S). Apenas o fenótipo de motilidade tipo “*twitch*” se mostrou menor do que a estirpe selvagem (figura 11S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples (figura 12S) apresentou leve aumento na colonização endofítica no dia 1 após inoculo em relação a estirpe selvagem enquanto que e o perfil de competição na colonização das raízes do sorgo (figura 13S), a estirpe mutante apresentou perfil diminuído em relação a estirpe selvagem durante a etapa de adesão. O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo não apresentou atenuação (figura 15S). A tabela 8 mostra os dados obtidos na análise fenotípica da mutante Hrubri_0505, a seguir:

TABELA 8: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0505.

| Resultados da estirpe Hrubri_0505 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,48 | 0,5536 | 1,52 | 0,977* | 0,0002 | 2,18 | 1,45* | 0,0001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 6,91 | 0,6208 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,45 | 6,382* | 0,0090 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,67 | 8,50 | 0,5480 | 8,13 | 8,23 | 0,7080 | 8,54 | 8,93 | 0,197 | 8,32 | 8,51 | 0,5198 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,20 | 5,914* | 0,0254 | 5,82 | 5,59 | 0,4374 | 5,13 | 5,57 | 0,1486 | 6,30 | 5,562* | 0,0487 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|--|
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 6,83 | 6,35 | 0,12480 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 7,56 | 8,508* | 0,0052 | 7,50 | 8,235* | 0,0222 | 7,45 | 8,936* | 0,0005 | 7,6 | 8,500* | 0,0064 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 5,91 | 5,197* | 0,027 | 5,59 | 5,82 | 0,4376 | 5,57 | 5,13 | 0,132 | 5,6 | 6,252* | 0,0376 | |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | |
| 0,46 | 0,46 | 0,9218 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou diminuição no fenótipo de geração da estria vermelha em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | | |
| Mutante apresenta vacúolos na superfície celular | | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.3. Caracterização fenotípica da estirpe mutante *Hrubri_0762*

O gene *Hrubri_0762* codifica para uma álcool desidrogenase com preferência para o propanol (*Adh*). Forma operon com o gene *Hrubri_0763* e forma cluster com um transportador ABC de açúcares que vai do gene *Hrubri_0761* até o gene *Hrubri_0771*. O TATA box está presente no gene *Hrubri_0763* e conta com sítios para os reguladores transcricionais RpoD17, MarR, CytR, TyrR e Fnr, como mostrado a seguir.

atacaactttaagcacaacTTTAAAttag (tggatataa –RpoD17) ctaGGCTATACTtg
 (MarR) taa(CytR) tt (TyrR) ttttga (Fnr)
 cgctgcgtaaggctgcgagacaacggaccctaattcgtagaacagcaactttaaagccagaccaccactgc

aactcaacgacccggtcgagaaggtggctctaccacggcacgagggcgggcactatcgcgcggtcgtccgacCGT
 agctggtagcggaaactgcagtgccgctgccgcacgtagtgaccgacgcctatccgctacaagagccagcta
 ctgtcgtccggctagtcgctcgtcggcaggccgtggggcgggcggtgccagaccggctacgccggaaccgaacc
 acgaacacgacgacgtcccgcgcggtggagaagccaccaccacgggtctaagtctgctcgagccctaacga
 ccggtcctccaccggtgcaagtctaacaaccactggtgcacgtaccggagcgggtgctacggcgccagcgcgcg
 cgcgcatg

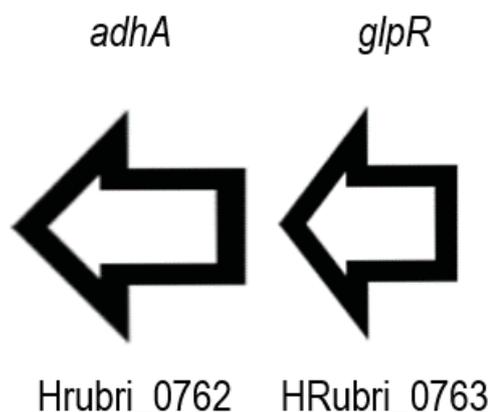


FIGURA 4: Representação do operon *adhAglpR*

Mutações na álcool desidrogenase já foram observadas na interação planta-bactéria, comprometendo a sobrevivência do *Azoarcus indigenus* frente a excreção de metabólitos secundários (REINHOLD-HUREK, 1998). É homólogo do gene *Hsero_0964*. Podemos observar fenótipo de crescimento alterado a partir do final da fase exponencial, compatível com a função de detoxificação (figura 15S), fenótipo de formação de biofilme inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 16S). A motilidade tipo “*swarming*” se mostrou menor do que a estirpe selvagem (figura 17S). Ultraestrutura não foi passível de análise devido ao fenótipo de fragilidade osmótica, comum a diversos mutantes presentes nesse trabalho (figura 18S). Ambos os Perfis de colonização das raízes do sorgo simples (figura 19S) quanto o perfil de competição na colonização das raízes do sorgo (figura 20S) não apresentaram alteração do fenótipo em relação a estirpe selvagem. O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo apresentou leve atenuação dos sinais da doença, porém ainda foi capaz de formá-los (figura 21S).

TABELA 9: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0762.

| Resultados da estirpe Hrubri_0762 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,49 | 0,6386 | 1,52 | 0,731* | 0,00001 | 2,18 | 1,447* | 0,0002 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 4,71* | 0,0001 | 5,25 | 5,50 | 0,2761 | 0,98 | 0,95 | 0,995 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,45 | 6,25 | 0,2096 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,67 | 8,08* | 0,0500 | 8,13 | 8,02 | 0,7334 | 8,54 | 8,26 | 0,3470 | 8,32 | 7,544* | 0,0168 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,20 | 5,55 | 0,2314 | 5,82 | 5,61 | 0,4774 | 5,13 | 5,03 | 0,7334 | 6,30 | 6,05 | 0,3996 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,55 | 6,26 | 0,3306 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,21 | 8,05 | 0,498 | 7,84 | 8,08 | 0,516 | 8,13 | 8,26 | 0,613 | 7,74 | 7,58 | 0,512 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,55 | 5,19 | 0,315 | 5,65 | 5,82 | 0,5642 | 5,01 | 5,13 | 0,6402 | 6,06 | 3,31 | 0,0001 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,48 | 0,6194 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou diminuição no fenótipo de geração da estria vermelha em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| |
|------------------------|
| Microestrutura: |
|------------------------|

| |
|---|
| Mutante apresentou marcante fragilidade de membrana, impossibilitando visualização. |
|---|

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.4. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_842

O gene *Hrubri_0842* codifica para uma porina de membrana externa e foi o gene com maior diferencial de expressão durante o transcriptoma de interação do *H. rubrisubalbicans* M1 com o sorgo. Não forma operon e forma cluster com genes que codificam para um transportador ABC de açúcares (*Hrubri_0841* ao *Hrubri_0852*). Sua região promotora conta com TATA box e sítios para reguladores ArgR, ArgR2, LexA, Lrp, PhoB e MetR, como mostrado a seguir.

Tcactgttttcata(phoB)agtctccggggacgggTTTCTAaatttttca(metR)atgaTTTTTTTA
Ttagaaattgatgatcaaatcgcatatcggaattgctaaagatttcattggaagacatg

Porinas de membrana externa são conhecidas na literatura como importantes nas etapas iniciais da colonização vegetal (ACHOUAK *et al.*, 1998), porém nesse caso não afetou o perfil de colonização. É homólogo ao gene *Hsero_1043*. Podemos observar fenótipo de crescimento alterado a partir do final da fase exponencial (figura 22S), fenótipo de formação de biofilme diminuído no ponto de 96 horas em relação a estirpe selvagem (figura 23S). A motilidade tipo “*swarming*” inalterada em relação a estirpe selvagem (figura 24S). Ultraestrutura não foi passível de análise devido ao fenótipo de fragilidade osmótica. Ambos os Perfis de colonização das raízes do sorgo simples (figura 25S) quanto o perfil de competição na colonização das raízes do sorgo (figura 26S) apresentaram leve alteração, mostrando aumento no fenótipo de adesão em relação a estirpe selvagem. O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo a estirpe Hrubri_0842 foi umas das 3 que não teve a capacidade de gerar sinais da estria vermelha do sorgo (figura 27S).

TABELA 10: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0842.

| Resultados da estirpe Hrubri_0842 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,38 | 0,0198* | 1,52 | 0,75* | 0,0001 | 2,18 | 1,493* | 0,0002 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 6,59 | 0,2192 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,45 | 7,051* | 0,014 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,67 | 8,39 | 0,3278 | 8,13 | 8,27 | 0,6104 | 8,54 | 8,12 | 0,166 | 8,32 | 8,40 | 0,7850 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,20 | 5,07 | 0,6830 | 5,82 | 5,99 | 0,5640 | 5,13 | 5,52 | 0,1968 | 6,30 | 6,21 | 0,759 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,58 | 5,452* | 0,00380 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,40 | 8,67 | 0,364 | 8,28 | 8,13 | 0,6104 | 8,10 | 8,54 | 0,1176 | 8,40 | 8,32 | 0,785 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,08 | 5,20 | 0,683 | 5,99 | 5,82 | 0,5198 | 5,50 | 5,13 | 0,2194 | 6,20 | 6,44 | 0,4182 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,41 | 0,1208 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou fenótipo de geração da estria vermelha fortemente comprometido. | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| |
|------------------------|
| Microestrutura: |
|------------------------|

| |
|---|
| Mutante apresentou forte agregação nas condições do ensaio, impossibilitando a visualização |
|---|

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.5. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_1953

O gene *Hrubri_1953* codifica a flagelina única do sistema FliC. Não forma operon e faz parte do cluster de biossíntese de flagelos *fli* (vai do gene *Hrubri_1963* ao gene *Hrubri_1943*). Sua região promotora conta com TATA box e sítios para o regulador transcricional SoxS, como mostrado a seguir.

```
Cgaaatagcccgtcagaaccttttcaaatcccgaaaacgtttttagaaaaagttccgaaagtcacggattg
caaccagaagatgggtactcagggccgcaaagttggagacaactaaaaccata(SoxS)attaCTGACGacg
gtacaattaagaggaTTCTAAACTctggctactaggctcactccataagtcgctgctgacgctgcgtaagtcaa
ggcaacgcacaactcgctgccctattccggccgccgagcaggaaccgcgacaactgcgcgctccggccttctgtctg
caacctagcgcaatg
```

O gene que codifica para a flagelina C, comumente o polímero mais importante para a motilidade de filamentos longos. A perda total da motilidade era esperada, como observado em *H. seropedicae* SmR1, porém, nesse caso o *H. rubrisubalbicans* M1 conta com os genes parálogos *Hrubri_1931* e *Hrubri_1872*, que podem estar envolvidos no processo de biossíntese dos flagelos, podendo parcialmente explicar apenas perda parcial da motilidade nesse mutante. A perda dos flagelos também já foi mostrada afetando a colonização de *H. seropedicae* SmR1 em *Setaria viridis*, embora sendo utilizada outra metodologia (ALVES *et al.*, 2019). Esse gene é homólogo do gene *Hsero_2070* em *H. seropedicae* SmR1 e o gene *Hrubri_1872* não conta com homologia. Podemos observar fenótipo de crescimento diminuído em relação a estirpe selvagem (figura 28S), fenótipo de formação de biofilme não se apresentou alterado em relação a estirpe selvagem (figura 29S). Ultraestrutura não foi passível de análise devido ao fenótipo de agregação excessiva (figura 30S). As motilidades tipo “*swimming*”, “*swarming*” e “*twitch*” se apresentaram diminuídas em relação a estirpe selvagem (figura 31S). Ambos os Perfis de colonização das raízes do sorgo simples (figura 32S) quanto o perfil de competição na colonização das raízes

do sorgo (figura 33S) apresentaram leve alteração, mostrando diminuição no fenótipo de colonização epifítica, endofítica e competição nos dias 1 e 3 após o inóculo em relação a estirpe selvagem. O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo a estirpe Hrubri_1953 apresentou leve diminuição na capacidade de formação de sinais da estria do sorgo, porém, se manteve capaz de formá-los.

TABELA 11: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_1953.

| Resultados da estirpe Hrubri_1953 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,3975* | 0,0426 | 1,52 | 0,698* | 0,0001 | 2,18 | 1,857* | 0,036 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 5,33* | 0,0002 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,45 | 5,82* | 0,0080 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,67 | 8,99 | 0,2660 | 8,13 | 8,18 | 0,8378 | 8,54 | 8,67 | 0,658 | 8,32 | 8,71 | 0,2078 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,20 | 5,12 | 0,8114 | 5,82 | 5,92 | 0,7334 | 5,13 | 5,04 | 0,7590 | 6,30 | 5,542* | 0,0194 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,82 | 5,558* | 0,002 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,7 | 7,774* | 0,008 | 8,1 | 7,80 | 0,166 | 8,5 | 8,20 | 0,2708 | 8,3 | 8,60 | 0,3407 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,2 | 5,851* | 0,0378 | 5,8 | 5,005* | 0,0138 | 5,1 | 5,41 | 0,347 | 6,30 | 5,604* | 0,029 |

Continua na próxima página

| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|--|--|--|--|--|
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | |
| 0,46 | 0,371* | 0,0124 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou diminuição no fenótipo de geração da estria vermelha em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | |
| Mutante apresentou forte agregação nas condições do ensaio, impossibilitando a visualização | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.6. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0835

O gene *Hrubri_0835* codifica para um componente periplasmático do transportador ABC de múltiplos açúcares. Não forma operons e faz parte do cluster de biossíntese desse transportador ABC. Sua região promotora conta com TATA e sítios para reguladores transcricionais SoxS, PurR, ArcA, MetJ e RpoE, como mostrado a seguir.

```
Gcgggatttttaag(PurR)cttaattaa(ArcA)gataacTTTACAtagagggAGTTATACCgaa
aaccata(SoxS)tccattacgctcaaaaaatcattagaaatgtattggtaaagcaattaatgtagagcccgcaaac
agttgctctgcatg
```

Já foi mostrado em *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter* e em *Brucella suis* que esse transportador de múltiplos açúcares está diretamente relacionado com a virulência “*in planta*” (HE *et al.*, 2009; CORNISH *et al.*, 1989 & ALVAREZ-MARTINEZ *et al.*, 2001). É homóloga do gene *Hsero_1037* em *H. seropedicae* SmR1. A seguir serão mostrados os fenótipos de crescimento, formação de biofilme, motilidade, colonização e competição durante a colonização e formação de sinais da estria vermelha do sorgo. Podemos observar fenótipo de crescimento

inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 35S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou fortemente diminuído em relação a estirpe selvagem (figura 36S). As motilidades tipo “*swimming*” e “*swarming*” se apresentaram diminuídas em relação a estirpe selvagem, enquanto que a motilidade tipo “*twitch*” não foi alterada (figura 37S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples se mostrou diminuído em ambas colonizações epifítica e endofítica a partir do dia 3 após inoculo, principalmente para o fenótipo de colonização endofítica (figura 38S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi fortemente diminuído em todos os tempos gráficos avaliados, sem apresentar sinais de recuperação do fenótipo competitivo até o 10° dia após o inóculo (figura 39S). No ensaio de formação da estria vermelha do sorgo, a estirpe Hrubri_0835 foi uma das 3 estirpes mutantes que não apresentaram capacidade de formação de sinais da estria do sorgo (figura 40S).

TABELA 12: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0835.

| Resultados da estirpe Hrubri_0835 | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|--|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | |
| 0,51 | 0,3502* | 0,006 | 1,52 | 1,011* | 0,0002 | 2,18 | 1,552* | 0,0004 | | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | |
| 7,00 | 2,02 | 0,00001 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 6,64 | 6,48 | 0,3738 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 8,93 | 9,30 | 0,2006 | 8,37 | 8,19 | 0,5402 | 8,79 | 8,20 | 0,056 | 8,57 | 7,601* | 0,0044 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 5,35 | 5,21 | 0,6264 | 5,99 | 4,624* | 0,0004 | 5,28 | 3,56 | 0,0001 | 6,5 | 5,541* | 0,0052 | |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|--|
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 6,60 | 4,972* | 0,00001 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 7,54 | 6,589* | 0,0052 | 8,34 | 6,413* | 0,00001 | 9,02 | 6,798* | 0,00001 | 7,71 | 5,999* | 0,00001 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 5,87 | 3,795* | 0,00001 | 4,52 | 3,606* | 0,007 | 5,28 | 3,650* | 0,00001 | 4,76 | 2,966* | 0,00001 | |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | |
| 0,46 | 0,42 | 0,1804 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante foi a única a não desenvolver os sinais da estria vermelha do sorgo, mesmo após 35 dias após o inóculo. | | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | | |
| Mutante apresenta vacúolos na superfície celular | | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.7. Caracterização fenotípica da estirpe mutante *Hrubri_0839*

O gene *Hrubri_0839* codifica para a D-xilose-1-dehidrogenase. Forma operon (genes *Hrubri_0836Hrubri_0837Hrubri_0838Hrubri_0839*) no mesmo cluster que codifica para o transportador ABC de múltiplos açúcares do gene *Hrubri_0835*. O TATA box está presente no gene *Hrubri_0836* e conta com ao sítios para reguladores transcricionais ArgR e RpoD17, como mostrado a seguir.

```
cctggcacctggcgcatggtactgttctggctgaggacgatagcgccatgtgtaccgcacaggaaT(
RpoD17)TCATCgtcgacgccggttGGGTGTGATgtctttgccggggcggtttgtgccctggcataccgtt
gcaagacaagacgcgtaaaaaagagtcgccggttcagcgactctcagattgatg
```

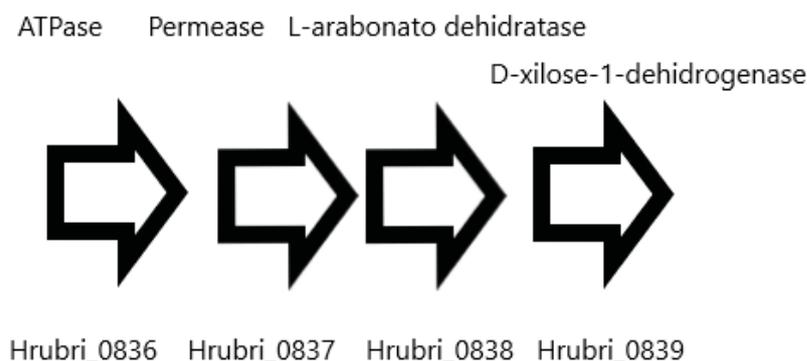


FIGURA 5: Configuração do operon *xyID*.

Existem poucos dados sobre esse gene, já foi mostrado como acessório no metabolismo de carboidratos, afetando o crescimento celular (STEPHENS *et al.*, 2007). É homólogo do gene *Hsero_1041* em *H. seropedicae* SmR1. A seguir serão mostrados os fenótipos de crescimento, formação de biofilme, motilidade, colonização e competição durante a colonização e geração de sinais da estria vermelha do sorgo. Podemos observar fenótipo de crescimento levemente diminuído em relação a estirpe selvagem a partir do final da fase exponencial (figura 41S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou aumentado nos pontos de 48 e 72 horas e diminuído no ponto de 96 horas em relação a estirpe selvagem (figura 42S). A motilidade tipo “*swimming*” se apresentou diminuída enquanto a motilidade tipo “*swarming*” se apresentou inalterada em relação a estirpe selvagem (figura 43S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples se mostrou diminuído na colonização endofítica a partir do dia 3 após inoculo sem aparente recuperação do fenótipo (figura 44S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi fortemente diminuído em todos os tempos gráficos com exceção da adesão, ao fenótipo de competição epifítica parece ser reestabelecido no 10º dia após o inóculo (figura 45S). No ensaio de formação da estria vermelha do sorgo, a estirpe Hrubri_0839 foi uma das 3 estirpes mutantes que não apresentaram capacidade de formação de sinais da estria do sorgo (figura 46S).

TABELA 13: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0839.

| Resultados da estirpe Hrubri_0839 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 1,614* | 0,00001 | 1,52 | 3,30* | 0,0001 | 2,18 | 3,951* | 0,0001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 3,78 | 0,00001 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,64 | 7,025* | 0,045 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,93 | 8,63 | 0,2992 | 8,37 | 8,91 | 0,082 | 8,79 | 8,99 | 0,5238 | 8,57 | 9,05 | 0,1204 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,35 | 5,46 | 0,712 | 5,99 | 4,81* | 0,001 | 5,28 | 5,69 | 0,1906 | 6,5 | 5,098* | 0,0002 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,59 | 6,14 | 0,14020 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,02 | 6,301* | 0,00001 | 8,20 | 6,727* | 0,00001 | 10,01 | 7,753* | 0,00001 | 8,00 | 7,023* | 0,0042 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,56 | 3,691* | 0,00001 | 4,57 | 3,055* | 0,00001 | 5,41 | 4,560* | 0,0104 | 4,57 | 3,160* | 0,0002 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,538* | 0,038 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| A estirpe mutante teve a capacidade de gerar sinais da estria vermelha do sorgo | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| |
|--|
| Microestrutura: |
| Não foi possível visualizar a amostra. |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.8. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0935

O gene *Hrubri_0935* codifica para uma acetil transferase da família GNAT. Forma operon com o gene *Hrubri_0934* (fosfoglicerato desidrogenase) e faz parte do cluster de biossíntese do transportador ABC peptídeo/níquel, envolvido na adaptação metabólica ambiental. proteína hipotética. Conta com TATA box e sítio de ligação para o regulador transcricional NarL, como mostrado a seguir.

```
tccatcatcgcgtagccgtagctgggcggtcgaactggaagaagccgatggcaccagtcggtagccgg
cagcggcatgtgtacctggcctccccggcacttcggcccgcctggtcctgccgatgatcggcTTGTATtacca
gctcaaGGATAAGCTggcctgaatgctcctt(NarL)gtctcccgattactttactgaataccgcatgaattc
actcgaactgcaacgcccggacctgatg
```

fosfoglicerato acetil transferase
desidrogenase GNTA



Hrubri_0934 Hrubri_0935

FIGURA 6: Configuração do operon *HRubri_0934HRubri_0935*.

Não existe informação na literatura sobre esse gene na interação planta-bactéria, essa acetiltransferase parece estar associada com a acetilação de proteínas histonas. É homólogo do gene *Hsero_1128* em *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar fenótipo de crescimento levemente diminuído em relação a estirpe selvagem a partir do final da fase exponencial (figura 47S), fenótipo de formação de biofilme fortemente diminuído no ponto de 96 horas em relação a estirpe selvagem (figura 48S). Não apresentou alterações fenotípicas em relação a motilidade em relação a estirpe selvagem (figura 49S). Os Perfis de colonização das raízes do sorgo e o perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foram fortemente diminuídos em todos os tempos gráficos com exceção da adesão, não parece ser reestabelecido no 10° dia após o inóculo (figuras 50S e 51S). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo não se apresentou alterado em relação a estirpe selvagem (figura 52S).

TABELA 14: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_0935.

| Resultados da estirpe Hrubri_0935 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 1,06* | 0,0088 | 1,52 | 1,41 | 0,5772 | 2,18 | 4,825* | 0,0001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 5,25 | 0,00001 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,64 | 6,28 | 0,065 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,93 | 7,045* | 0,0001 | 8,37 | 7,282* | 0,002 | 8,79 | 8,98 | 0,5068 | 8,57 | 7,755* | 0,0124 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,35 | 4,202* | 0,0012 | 5,99 | 4,820* | 0,0012 | 5,28 | 3,831* | 0,0001 | 6,5 | 5,407* | 0,002 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|--|
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 7,06 | 5,12 | 0,00001 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 7,82 | 6,282* | 0,00001 | 7,89 | 6,843* | 0,0026 | 9,53 | 8,558* | 0,0046 | 7,81 | 6,103* | 0,00001 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 5,09 | 3,726* | 0,0004 | 4,38 | 2,972* | 0,0002 | 4,99 | 4,97 | 0,9154 | 4,74 | 2,901* | 0,00001 | |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | |
| 0,46 | 0,49 | 0,376 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante não apresentou alteração de fenótipo em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | | |
| Não foi possível visualizar a amostra. | | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.9. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_1197

O gene *Hrubri_1197* codifica para uma proteína mal caracterizada semelhante ao regulador GlcG (glicolato oxidase) do operon *glc*, do metabolismo da glicose. Pertence ao cluster de biossíntese da carbamoil-fosfato sintase, não forma operon. conta com TATA box e sítios para reguladores transcricionais Lrp e RpoD18, como mostrado a seguir.

```
tcaggtttttctacacgaggcaggaaaatcccggtaaaggagtggcagatgctcgaatagttcccgagat
cattgagaaaagcggggcgattgtgggaaatgggtcggatgctgaggggcccacgtgcaccgatgagtttgctgg
cgcaggATGTCAaaaaagactttctggTCGTACAATc(RpoD18)agcgttcatttttt(Lrp)ctgcctatcg
gagcaaacatg
```

A presença do operon glicolato pode ser benéfico para a planta devido a liberação de CO₂ (KEBEISH *et al.*, 2007). É homólogo com o gene *Hsero_1977* de *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento mais alterado em relação a estirpe selvagem observado nesse trabalho (figura 53S), fenótipo de formação de biofilme diminuído no ponto de 96 horas em relação a estirpe selvagem (figura 54S). Não apresentou alterações fenotípicas em relação a motilidade em relação a estirpe selvagem (figura 55S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples não apresentou alterações em relação a estirpe selvagem (figura 56S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo apresentou leves alterações foram alterados apenas fortemente diminuídos em todos durante a adesão e colonização endofítica no dia 1 após inoculo em relação a estirpe selvagem, rapidamente reestabelecendo fenótipo competitivo (figura 57S). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo se apresentou levemente alterado, com diminuição da capacidade de geração de sinais da estria vermelha do sorgo, porém ainda capaz de gera-las ao decorrer do experimento (figura 58S).

TABELA 15: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_1197.

| Resultados da estirpe Hrubri_1197 | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,51 | 0,9852 | 1,52 | 1,47 | 0,7932 | 2,18 | 2,41 | 0,118 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 5,44 | 0,0002 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,1 | 5,833* | 0,1162 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,24 | 7,172* | 0,0018 | 7,72 | 7,71 | 0,9716 | 8,11 | 8,64 | 0,073 | 7,91 | 7,96 | 0,8646 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |

Continua na próxima página

| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
|---|---------|---------|----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|
| 4,94 | 3,876* | 0,0022 | 5,53 | 4,92 | 0,055 | 4,87 | 4,57 | 0,3148 | 5,99 | 4,930* | 0,0026 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,81 | 6,15 | 0,05300 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 7,86 | 7,56 | 0,3538 | 7,71 | 8,13 | 0,2006 | 9,61 | 9,10 | 0,1252 | 8,00 | 8,39 | 0,2328 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,17 | 3,952* | 0,0016 | 5,07 | 5,18 | 0,7304 | 4,79 | 4,82 | 0,8895 | 5,00 | 5,19 | 0,5532 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,320* | 0,0001 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou diminuição no fenótipo de geração da estria vermelha em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Não foi possível visualizar a amostra. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor P < 5%.

5.1.10. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2391

O gene *Hrubri_2391* codifica para uma proteína FeS com domínio LRV. Faz parte do cluster dos genes *nif* e faz parte de operon (genes *Hrubri_2394Hrubri_2393Hrubri_2392Hrubri_2391*) com sua região promotora no gene *nifB*. Essa região promotora conta com TATA box e sítios para reguladores transcricionais SoxS e RpoD17, como mostrado a seguir.

Cgggcgtaggccccgcccttgctgtcactctttttgaaaacgagaccgggatgcagtgcatgcacctacgc
 ggtcggcccctcaggtagtcttctcggccgaccgcgctgcggcttctatatgctgttacgtcgtgtccggccttacgccga
 ctacggtacctctaccctgttcttctctacgccgctacactcctatcgctgttagctgctctgtaacacccgccgcaaca
 gtacttcggtttggcacggtctctttattagttagttaagtttctgtatcgcttttagcacacacccgacgtacctatcaggg
 gaagtcctttcactacggaccggaagacgactcctgtaagccgATGAAAcaggtcgttccacggatCGCTAA
 ACTacaggacctatg



FIGURA 7: Configuração do operon *nifB*

É homólogo com o gene *Hsero_2867* de *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 59S), fenótipo de formação de biofilme inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 60S). Não apresentou alterações fenotípicas em relação a motilidade em relação a estirpe selvagem (figura 61S). Essa estirpe foi a única a apresentar o fenótipo de colonização endofítica simples diminuído em relação a estirpe selvagem durante todo o experimento (figura 62S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi grandemente diminuído, com possível reconstituição do fenótipo competitivo epifítico no 10° dia após inóculo (figura 63S). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo se apresentou levemente alterado, com diminuição da capacidade de geração de sinais da estria vermelha do sorgo, porém ainda capaz de gera-las ao decorrer do experimento (figura 64S).

TABELA 16: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2391.

| Resultados da estirpe Hrubri_2391 | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|-------------------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,66 | 0,0812 | 1,52 | 1,69 | 0,4118 | 2,18 | 4,042* | 0,0001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 6,91 | 0,0078 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,1 | 6,318 | 0,2866 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,24 | 7,277* | 0,036 | 7,72 | 7,40 | 0,266 | 8,11 | 9,319* | 0,0006 | 7,91 | 7,78 | 0,6584 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,94 | 3,44 | 0,0001 | 5,53 | 3,581* | 0,0001 | 4,87 | 3,553 | 0,0001 | 5,99 | 3,885* | 0,0001 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,66 | 5,002* | 0,00001 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 7,66 | 5,066* | 1E-05 | 7,80 | 4,774* | 0,00001 | 9,81 | 6,557* | 0,00001 | 8,19 | 7,115* | 0,0042 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,75 | 3,625* | 0,003 | 5,12 | 2,774* | 0,00001 | 5,81 | 3,744* | 0,00001 | 4,49 | 3,092* | 0,0006 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,46 | 0,9852 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante não apresentou alteração de fenótipo em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| |
|--|
| Microestrutura: |
| Não foi possível visualizar a amostra. |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.11. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2483

O gene *Hrubri_2483* codifica para uma álcool desidrogenase que contem Fe^{++} . Faz parte do cluster que codifica para a NADP transhidrogenase e não forma operon. Conta com TATA box e sítios para reguladores transcricionais Tus, RpoD17, MetJ, OmpR e RpoD18SoxS e RpoD17, como mostrado a seguir.

```
acagtttcattgacaggcgcaaacagtcgctcgcgcttgcggtggcgctcggtatcaacgcagcggccatcgt
gcatatcaggcaaatgtcggatcgcacatcccatcacaatcaagaaaacatTAGAAAcacaagctaactaat(
Tus)CT(RpoD17)TTACAT(MetJ)T(OmpR)ttgctttt(RpoD18)gcataggtcaatgttgcaaccata
gggaagcctagtatttctcagcgaacagacacggcccgtatcgggccgctgccgtgttttgactatggagaaca
ctatggcaatggcaaatcagacctttggcttctacatgccaaacgtatcgctcatgggctggggtgcgccgaggaagt
cggcctgcaagccaaggcattgggagcacgacgcggtgttctgtgtaccgacgtcggcatg
```

Essa classe álcool desidrogenase é mostrada com função de degradação de compostos tóxicos, notadamente presente em bactérias de solo, homologia alta com o gênero *Geobacter*. Não conta com homologia com *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 65S), fenótipo de formação de biofilme levemente diminuído no ponto de 96 horas em relação a estirpe selvagem (figura 66S). Apresentou motilidade tipo “*swimming*” levemente diminuído em relação a estirpe selvagem (figura 67S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples apresentou alterações leves em relações a estirpe selvagem, principalmente na colonização endofítica e nos dias 7 e 10 após inoculo na colonização epifítica (figura 68S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo apresentou leves alterações na competição durante a colonização epifítica dias 1 e 3 após inoculo e na competição durante a colonização endofítica dias

1 e 7 após inóculo em relação a estirpe selvagem (figura 69S). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo se apresentou levemente alterado, com diminuição da capacidade de geração de sinais da estria vermelha do sorgo, porém ainda capaz de gera-las ao decorrer do experimento (figura 70S).

TABELA 17: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2483.

| Resultados da estirpe Hrubri_2483 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,44 | 0,381 | 1,52 | 1,37 | 0,4524 | 2,18 | 4,028* | 0,0001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 5,18 | 0,00001 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,12 | 5,83 | 0,1152 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,24 | 7,94 | 0,3056 | 7,72 | 7,51 | 0,4596 | 8,11 | 7,55 | 0,062 | 7,91 | 7,01* | 0,007 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,94 | 4,303* | 0,043 | 5,53 | 5,17 | 0,2278 | 4,87 | 4,018* | 0,0101 | 5,99 | 4,769* | 0,0008 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,64 | 6,59 | 0,87520 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 7,76 | 6,418* | 0,0014 | 8,50 | 7,380* | 0,003 | 9,71 | 8,845* | 0,015 | 8,96 | 7,958* | 0,0064 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,06 | 3,49 | 0,075 | 4,76 | 4,28 | 0,14 | 5,25 | 4,160* | 0,0036 | 4,74 | 5,03 | 0,3694 |

Continua na próxima página

| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|--|--|--|--|--|
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | |
| 0,46 | 0,43 | 0,3716 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou diminuição no fenótipo de geração da estria vermelha em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | |
| Não foi possível visualizar a amostra. | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor P < 5%.

5.1.12. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2585

O gene *Hrubri_2585* codifica para uma permease de açúcares do simporte citrato/tricarbalilato H⁺ do complexo principal MHS. Não forma operon e faz parte do cluster de biossíntese da etanolamina amônia liase. Conta com TATA box, porém não apresenta sequências consenso para reguladores transcricionais conhecidos, como mostrado a seguir.

```

gggagtggcgcatcgcaccatattcgggtgcaggactgccTTGACGcatctcagcttgcacgtcCACC
AGACTtttttgcgcgattctggcgcaaatacggcgcaagctttcatccagctatcgaaaaaccgatatttgcaccc
attgccgccaaggcggtgcgcacacgcgatttcgggcatagaatcggcgcgcaatagctgtcccacaaaaaaa
gatcctgacacaagctgccgcacggcagtagcagacaggcgcaagaccggaatcaacacgggtccgccaatag
ataacgaggcacatatcatg

```

Forma uma proteína transmembrana necessária para a metabolização do metabólito alternativo tricarbalilato observado pela primeira vez *Salmonella typhimurion* LT2 (LEWIS *et al.*, 2004). É homólogo do gene *Hsero_2512* de *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 71S), fenótipo de formação de biofilme inalterado

em relação a estirpe selvagem (figura 72S). Apresentou motilidade tipo “*swarm*” levemente diminuído em relação a estirpe selvagem (figura 73S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples inalterado em relações a estirpe selvagem (figura 74S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi grandemente afetado, apresentou forte diminuição do fenótipo competitivo em relação a estirpe selvagem durante a colonização epifítica na adesão e nos dias 1, 3 e 7 após inóculo, porém parece iniciar o reestabelecimento desse fenótipo no dia 10 após o inóculo. Já durante a competição na colonização endofítica, a estirpe Hrubri_2585 teve o fenótipo fortemente comprometido e sem sinais de reestabelecimento até o 10º dia após o inóculo (figura 75S). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo se apresentou levemente alterado, com diminuição da capacidade de geração de sinais da estria vermelha do sorgo, porém ainda capaz de gera-las ao decorrer do experimento (figura 76S).

TABELA 18: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2585.

| Resultados da estirpe Hrubri_2585 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,19 | 0,00001 | 1,52 | 1,59 | 0,7390 | 2,18 | 3,533* | 0,0001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 3,76 | 0,00001 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,12 | 6,24 | 0,5096 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,24 | 8,31 | 0,7846 | 7,72 | 7,64 | 0,7494 | 8,11 | 7,457* | 0,038 | 7,91 | 7,99 | 0,8114 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,94 | 4,99 | 0,8914 | 5,53 | 5,03 | 0,1024 | 4,87 | 4,64 | 0,4298 | 5,99 | 5,96 | 0,9022 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| Adesão | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,65 | 4,897* | 0,00001 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,01 | 4,901* | 0,00001 | 8,16 | 6,022* | 0,00001 | 8,85 | 6,349* | 0,00001 | 7,41 | 6,48 | 0,1078 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,37 | 3,669* | 0,042 | 5,01 | 3,045* | 0,00001 | 5,31 | 2,988* | 0,00001 | 4,70 | 2,762* | 0,00001 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,331* | 0,0001 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou diminuição no fenótipo de geração da estria vermelha em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Não foi possível visualizar a amostra. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.13. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2937

O gene *Hrubri_2937* codifica para um peptídeo sinal. Forma operon com o gene *Hrubri_2938* (proteína transmembrana aceptora de metila transdutora da quimiotaxia) e cluster com o gene *Hrubri_2939*, que codifica para a mesma proteína. Conta com TATA box e sítios para reguladores transcricionais sRpoD18, Fis, RpoS17 e RpoD18, como mostrado a seguir.

```

cgggtgggcccggggcaggcgccgctgatggtggcgcctgccttgctttt(RpoD18)atatcgatTTTATA
aattATT(Fis)TATATT(RpoS17)aattt(RpoD18)tttgatggtcagtttcgggtcatgaaatttaaaccgg
tgatcttagttgcggtatg

```

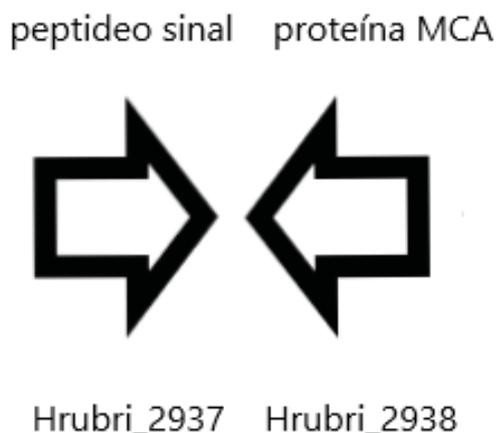


FIGURA 8: Configuração do operon *HRubri_2937HRubri_2938*.

Trata-se de um sistema envolvido na quimiotaxia e a adaptação ao nicho. Em *Bacillus subtilis* a mutação desse sistema leva a incapacidade de migrar em direção a glucose, asparagina e glutamina além de gerar forte coesão da cultura (HANLON *et al.*, 1994 & MILLER *et al.*, 2009). É homologa do gene *Hsero_2912* de *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 77S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou diminuído em relação a estirpe selvagem no ponto de 96 horas (figura 78S). Apresentou motilidade tipo “swarm” levemente aumentada em relação a estirpe selvagem (figura 79S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi levemente alterado em relação a estirpe selvagem, a saber nos dias 3 após o inóculo na colonização epifítica e 1 após o inóculo na colonização endofítica (figura 80S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi afetado, apresentou diminuição do fenótipo competitivo principalmente durante a adesão e dia 1 após o inóculo na colonização epifítica e no dia 1 após inóculo na competição durante a colonização endofítica, embora tenha apresentado alteração atípica no dia 7 após inoculo da competição epifítica (figura 81S). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo se apresentou levemente alterado, com diminuição da capacidade de geração de sinais da estria vermelha do sorgo, porém ainda capaz de gera-las ao decorrer do experimento (figura 82S).

TABELA 19: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2937.

| Resultados da estirpe Hrubri_2937 | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|-------------------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,701* | 0,031 | 1,52 | 1,47 | 0,7932 | 2,18 | 2,45 | 0,1198 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 9,15 | 0,00001 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,12 | 6,10 | 0,8924 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,24 | 7,85 | 0,1248 | 7,72 | 7,058* | 0,024 | 8,11 | 7,70 | 0,172 | 7,91 | 7,59 | 0,2848 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,94 | 4,075* | 0,0097 | 5,53 | 5,31 | 0,4716 | 4,87 | 4,76 | 0,708 | 5,99 | 4,978* | 0,0036 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,66 | 4,989* | 0,00001 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 7,85 | 6,169* | 0,00001 | 7,94 | 7,39 | 0,1094 | 9,61 | 6,647* | 0,00001 | 7,35 | 7,20 | 0,639 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,43 | 3,609* | 0,00001 | 5,05 | 4,39 | 0,0536 | 5,03 | 5,30 | 0,4026 | 4,65 | 3,808* | 0,0178 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,42 | 0,2444 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante não apresentou alteração de fenótipo em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| |
|--|
| Microestrutura: |
| Não foi possível visualizar a amostra. |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.14. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3783

O gene *Hrubri_3783* codifica para uma proteína periplasmática do sistema tipo TRAP, C4-dicarboxilato. Não forma operon e faz parte do cluster que codifica para a álcool desidrogenase *fabG*. Conta com TATA box e sítio para regulador transcricional TyrR, como mostrado a seguir.

```
ccggggctcctcgccctgtgaccgttggtgaccgttggtgactgccaacgccatcgactaaatgcaattgcattt
cctgtcgacagcgtagatgacagcggcggtgacagcggcgctgTGGACAgttacgacggcggtGTGTA
GCCTgtaaataaa(TyrR)cgcgaattacgaggacggacgaggacggacgaggacgtagcaatagccgtaac
gcggacataagagccgctattcccgcgcgacatg
```

Esse sistema parece transportar ácidos carboxílicos e taurina e estão envolvidos no catabolismo de ácido siálico (KAPATRAL *et al.*, 2002) que por sua vez estão envolvidos na externalização de carboidratos e formação de biofilme, explicando sua maior produção. É homólogo do gene *Hsero_3818* de *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 83S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou aumentado em relação a estirpe selvagem nos pontos de 48 e 72 horas (figura 84S). Não apresentou fenótipo de motilidade alterado (figura 85S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi totalmente alterado em relação a estirpe selvagem, com diminuição do fenótipo durante a adesão, dias 1, 3 e 7 após o inóculo na colonização epifítica e nos dias 1, 3 e 10 após o inóculo na colonização endofítica (figura 86S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo também foi afetado, apresentou diminuição do fenótipo competitivo durante a colonização epifítica em todos os períodos gráficos e diminuição no fenótipo competitivo endofítico nos dias 1 e 3 após o inóculo, porém nesse caso parece ter reestabelecido levemente o fenótipo

(figura 87S). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo se apresentou inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 88S).

TABELA 20: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3783.

| Resultados da estirpe Hrubri_3783 | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|--|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | |
| 0,51 | 1,355* | 0,00001 | 1,52 | 3,09* | 0,0001 | 2,18 | 3,825* | 0,0001 | | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | |
| 7,00 | 4,88 | 0,00001 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,001 | | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 6,12 | 5,84 | 0,1208 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 8,24 | 5,94 | 0,0001 | 7,72 | 5,975* | 0,0001 | 8,11 | 7,54 | 0,068 | 7,91 | 7,39 | 0,092 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 4,94 | 3,676* | 0,006 | 5,53 | 3,88 | 0,0001 | 4,87 | 4,67 | 0,50 | 5,99 | 3,97 | 0,0001 | |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 6,62 | 5,150* | 0,00001 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 7,86 | 5,257* | 0,00001 | 7,27 | 5,291* | 0,00001 | 9,70 | 6,948* | 0,00001 | 8,95 | 6,780* | 0,00001 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 4,90 | 3,873* | 0,0054 | 4,50 | 3,085* | 0,00001 | 5,55 | 4,92 | 0,0636 | 5,03 | 4,085* | 0,0088 | |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
|--|---------|---------|-----|---------|---------|--|--|--|--|--|--|
| 0,46 | 0,41 | 0,141 | 0,6 | 0,54 | 0,999 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante não apresentou alteração de fenótipo em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Não foi possível visualizar a amostra. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.1.15. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3948

O gene *Hrubri_3948* codifica para a proteína vanilato O-demetilase (*vanA*). Forma operon com o gene *Hrubri_3947* e participam no cluster de biossíntese para um transportador ABC de aminoácidos ramificados. A região promotora está presente no gene *Hrubri_3947*, conta com sítios para 2 reguladores transcricionais RpoD17, como mostrado a seguir.

```

gggcaaaagattcaagtcgaacgaactcatggttgctccggaagtggatgaccagcatgacacaggca
cgactgccgcgcatcgacataattcgaaaatcgcataaacattatgcagaaaattctattTCAAAt(RpoD17
)aatt(RpoD17)tgtcctCGGTATGATttctccaactgactgccatcccatatcaaccacaaggcagcagtgc
cggactgggttcggcctatccaacagaggagacaacatg

```

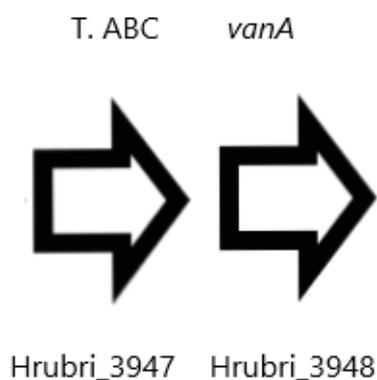


FIGURA 9: Configuração do operon *HRubri_3947HRubri_3948*.

Esse gene não conta com dados na literatura. Não conta com homologia com *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 89S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 90S). Não apresentou alterações nos fenótipos de motilidade (figura 91S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi levemente alterado em relação a estirpe selvagem, com diminuição do fenótipo durante a colonização endofítica nos dias 3 e 7 após o inóculo, com aparente reestabelecimento desse fenótipo (figura 92S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi afetado, apresentou diminuição do fenótipo competitivo durante a colonização epifítica durante a adesão e dias 1, 7 e 10 após o inóculo, já o fenótipo competitivo endofítico se apresentou diminuído em relação a estirpe selvagem nos dias 3 e 7 após o inóculo (figura 93S). O ensaio de formação da estria vermelha do sorgo se apresentou inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 94S).

TABELA 21: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3948.

| Resultados da estirpe Hrubri_3948 | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,51 | 0,44 | 0,1746 | 1,52 | 1,75 | 0,2696 | 2,18 | 3,924* | 0,0001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 7,00 | 7,22 | 0,50120 | 5,25 | 5,18 | 0,5404 | 0,98 | 0,7328* | 0,0001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,12 | 6,10 | 0,8968 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,24 | 7,95 | 0,3184 | 7,72 | 7,84 | 0,6703 | 8,11 | 7,74 | 0,226 | 7,91 | 6,935* | 0,0046 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |

Continua na próxima página

| | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|
| 4,94 | 4,95 | 0,9792 | 5,53 | 5,64 | 0,6902 | 4,87 | 4,80 | 0,8114 | 5,99 | 5,291* | 0,0298 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,37 | 4,891* | 0,00001 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,39 | 7,079* | 0,00001 | 8,43 | 7,86 | 0,0897 | 8,98 | 6,847* | 0,00001 | 8,98 | 7,059* | 0,00001 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,19 | 3,96 | 0,4556 | 5,05 | 4,021* | 0,0046 | 4,40 | 4,19 | 0,5128 | 5,56 | 4,583* | 0,0054 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,363* | 0,0001 | 0,55 | 0,54 | 0,999 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou fenótipo de geração da estria vermelha fortemente comprometido. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Não foi possível visualizar a amostra. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.2. RESULTADOS DOS MUTANTES REFERENTES AO TRANSCRIPTOMA DE INTERAÇÃO ENTRE *H. rubrisubalbicans* M1 COM AS RAÍZES DE *Sorghum bicolor*.

Nessa sessão serão apresentados dados referentes aos mutantes do T6SS bem como algumas análises específicas desses clusters para o *H. rubrisubalbicans* M1.

Os experimentos de competição direta e expressão genica das regiões promotoras para os dois clusters serão justificados, demonstrando as razões dos perímetros utilizados. Assim como no item 7.3, todos os resultados serão agrupados

por estirpe mutante, contendo a análise “*in silico*” para o gene, discorrendo sobre a vizinhança genica, formação e conformação de clusteres e operons (bem como demonstração pitoresca no caso de formação de operon), análise da região promotora mostrando possíveis sítios para proteínas transcricionais e a sequência iniciadora. A demonstração dos sítios será feita utilizando-se fonte diferenciada para as regiões iniciadoras e através de parêntesis logo à frente do sitio. Em seguida mostraremos fenótipos importantes para a interação planta-bactéria das estirpes mutantes em relação a estirpe selvagem, sendo eles: curva de crescimento, formação de biofilme em função do tempo, perfil motilidade, perfil de colonização das raízes de sorgo simples e sob competição contra a estirpe selvagem, formação de sinais de doença no sorgo e microscopia eletrônica (quando aplicável). Após a apresentação dos dados de fenótipos envolvidos na interação planta-bactéria, serão mostrados os dados de expressão gênica e competição direta, visto que o T6SS-VI é o sistema mais comum e está diretamente relacionado com a competição interespecífica, supressão colonial e processos de supressão imune de possíveis hospedeiros.

As análises para os fenótipos de crescimento, produção de biofilme, motilidade e as comparações nos experimentos de colonização direta e competição durante a colonização do sorgo serão apresentadas na sessão de discussão na forma de tabelas.

5.2.1. ANÁLISE “*in silico*” DO T6SS EM *H. rubrisubalbicans* M1

Herbaspirillum rubrisubalbicans conta com 2 clusters (FIGURA 103) que codificam para o sistema de secreção tipo VI. Eles foram divididos em: cluster 1 (maior, dos genes HR_3972 ao HR_3995) e o cluster 2 (menor, dos genes HR_2308 ao HR_2322). Ao contrário das outras espécies de *Herbaspirillum spp.*, esses 2 clusters não apresentam homologia entre si, sendo o cluster 1 semelhante aos clusters comumente presentes nesse gênero, homólogos a T6SS associados com competitividade interespecífica e o cluster 2, homólogo a T6SS de gamaproteobactérias, especialmente ao T6SS-5 de *Burkholderia glumae* e *Burkholderia plantarii* – duas espécies patogênicas para vegetais, especialmente o

arroz (HAM *et al.*, 2010), parece estar relacionado com interações ambientais, que no nosso caso poderia indicar influências na interação planta-bactéria.

A análise dos T6SS conta com dois problemas: 1 – *H. rubrisubalbicans* M1 conta com clusters bem especializados e difusos em espécies pouco estudadas, resultando em muitos genes sem função definida e com baixa homologia. 2 - Não existem várias informações consenso na análise dos T6SS, embora os clusters sejam de fácil visualização, grande parte das proteínas, principalmente as proteínas efetoras, são desconhecidas e estão difusas no genoma.

As análises feitas nesse trabalho foram feitas a partir do banco de dados “SecretEPB” (contém as sequências e análises para genes envolvidos com sistemas de secreção que envolvam proteínas efetoras) e através de algoritmos de alinhamento contra o genoma de *H. rubrisubalbicans* M1 (Blast-NCBI ou KEGG). Mesmo utilizando todos os genes confirmados dos T6SS conhecidos, ainda não foi possível elucidar os 2 clusters apenas por homologia, assim foi utilizado o programa STRING (11.0 - <https://string-db.org/>) que consegue analisar possíveis interações entre as proteínas num dado espaço amostral, sendo uma boa forma de buscar por possíveis proteínas efetoras fora do cluster, utilizando-se homologia com as proteínas Hcp e VgrG estrutural. *H. rubrisubalbicans* M1 não está contido na base de dados do STRING, sendo necessário utilizar dados de *H. seropedicae* SmR1 – que por sua vez, não conta com homologia com o cluster-II, desse modo ainda não foi possível elucidar boa parte das proteínas.

A próxima etapa foi a utilização do algoritmo SecRet6 (LI *et al.*, 2015 - doi: 10.1111/1462-2920.12794.). SecRet6 é um sistema de predição que utiliza dados publicados no KEGG e MicrobWiki (atualmente 221 espécies) e emprega possibilidade de determinado gene compor algum T6SS.

A última etapa foi a análise dos motivos proteicos (MA *et al.*, 2007; CHEN *et al.* 2011; SOLOMONS *et al.* 2014 & LIEN *et al.*, 2017). Os trabalhos de Ma, Chen, Lien e Solomons elucidaram a função de determinados domínios de função desconhecida (DUF), nos permitindo atribuir funções a genes desconhecidos e atribuir as proteínas efetoras. As funções e características dos genes do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 estão mostrados na TABELA 12.

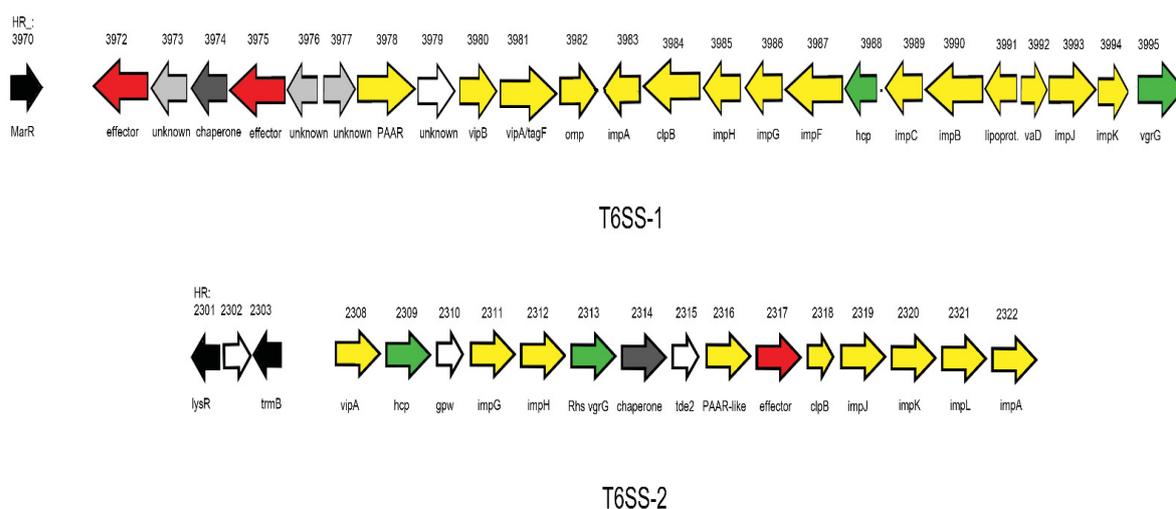


FIGURA 10: Clusters dos T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Em vermelho temos genes que codificam para proteínas efetoras, em amarelo temos genes que codificam para proteínas estruturais, em verde temos genes que codificam para proteínas efetoras e estruturais (comumente excretadas concomitantemente com outras proteínas efetoras), em cinza temos genes que codificam para proteínas com função desconhecida porém associados ao T6SS (SecretEPB), em branco temos genes que codificam para genes desconhecidos e em preto temos os genes que codificam para os possíveis ativadores transcricionais. No decorrer desse trabalho serão mostrados que o cluster-I está relacionado com a competição interespecífica e supressão do crescimento colonial e que o cluster-II está relacionado com a supressão do hospedeiro e processo de colonização “*in planta*”.

Características do Cluster T6SS-I:

O T6SS-I é o maior cluster, contendo 32 genes mais o regulador transcricional MarR (*Hrubri_3970*). O regulador MarR já foi observado regulando o T6SS em *Burkholderia pseudomallei* (o repressor transcricional MarR teve efeito regulatório em todos os 6 T6SS dessa bactéria, observado a partir de ensaios de β -galactosidase em construções contendo o gene que codifica para a proteína Hcp. Nesses ensaios MarR é repressor do T6SS-2, sua deleção levou a aumento de 50 vezes na expressão da proteína Hcp2 em ensaios de β -galactosidase e diminuiu a expressão do T6SS-6, além de efeito menos pronunciado, mas presente nos outros T6SS (LOSADA *et al.*, 2018). MarR é regulado por estímulos ambientais (depleção de nutrientes, oxirredução, temperatura aumentada e presença de metabólitos secundários – regula a formação de biofilme), onde sua cisteína é oxidada e permite a expressão desse

gene. Losada e colaboradores observaram que MarR ativou LysR, regulador presente no cluster-2 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 e muito comum estar presente próximo aos clusters de T6SS em várias espécies. Hrubri_3970 (*marR*) conta com diversos domínios regulatórios, entre eles vale ressaltar o domínio TrmB (um domínio que regula outro regulador transcricional presente próximo ao cluster T6SS-II), Fe_dep_repress (domínios destacamos o repressor dependente de ferro) e DUF2250 (domínio comum aos T6SS, porém não compreendido). Assim observado por Losada e colaboradores, os reguladores LysR e TrmB presentes no cluster-2 são possivelmente regulados pelo MarR.

Dos genes *Hrubri_3972* ao *Hrubri_3995* temos o cluster codificante do T6SS-I propriamente dito. Essa estrutura é dividida em 2 porções que se formam separadamente e são montadas no espaço periplasmático. Temos o complexo Hcp-VgrG-PAAR formado pelos genes *Hrubri_3988*, *Hrubri_3995*, *Hrubri_3978*, representando o túbulo pontiagudo. Para que proteínas efetoras sejam dobradas e possam ser externalizadas é necessária uma chaperona, nesse cluster está representado na DUF4123 do gene *Hrubri_3974*. Temos ainda os genes *Hrubri_3972* (contem DUF 2235 que se liga ao DUF796 do Hcp e 4407 de ligação ao VgrG), *Hrubri_3973* (DUF3304, se liga ao domínio PAAR) e *Hrubri_3975* (DUF2345 efetor) como proteínas efetoras internas desse cluster e ainda os genes *Hrubri_0039*, *Hrubri_0200*, *Hrubri_0234*, *Hrubri_1169*, *Hrubri_3330*, *Hrubri_3635* e *Hrubri_3742* (todos contendo DUF2345 de ligação ao VgrG) como proteínas efetoras externas ao cluster. Esse trimero estrutural está atravessado na membrana externa e necessita de uma estrutura transmembrana para ligá-lo a base estrutural e regulatória do sistema. *Hrubri_3976* codifica uma proteína transmembrana associada a *Hrubri_3977* (endolisina). Na porção interna da membrana temos a estrutura contrátil VipA/B, aqui ambas sendo codificadas pelo gene *Hrubri_3980*. VipA/B é regulado via fosforilação, realizada pelo regulador negativo TagF codificada pelo gene *Hrubri_3981* e são alimentados energeticamente pela ATPase ClpB/V, codificada pelo gene *Hrubri_3984*. A membrana interna é estabilizada por uma porina, codificada pelo gene *Hrubri_3982* e os demais genes *imp* (*Hrubri_3983*, *Hrubri_3985*, *Hrubri_3986*, *Hrubri_3987*, *Hrubri_3989*, *Hrubri_3990*, *Hrubri_3993* e *Hrubri_3994*).

Características do Cluster T6SS-II:

O Cluster 2, que vai dos genes *HR_2308* ao *HR_2323*, codifica um maquinário atípico para o gênero *Herbaspirillum spp.*, sendo homólogo ao T6SS-5 de *Burkholderia glumae*, *Burkholderia pseudomallei* e *Burkholderia thailandensis*. Esse sistema de secreção em *Burkholderia spp.* controla a infecção, auxiliando na formação de células nucleadas gigantes, que comprometem o sistema imune do hospedeiro, e parece estar associado ao ciclo de vida intracelular dessa bactéria. Conta com 2 reguladores transcricionais próximos ao cluster, LysR codificada pelo gene *HR_2301* e TrmB codificada pelo gene *Hrubri_2303*, contando com a possível interação com o regulador MarR presente no cluster-I. MarR também conta com domínio de regulação em TrmB, que é regulado por açúcares através do domínio TR ic1R.

Embora seja menor e aparentemente mais simples do que o cluster-I, conta com VgrG tipo Rh, mais complexa é com possível controle tardio (GLOOR *et al.*, 1988). Trimeró Hcp-VgrG-PAAR está representado pelos genes *Hrubri_2309**Hrubri_2313**Hrubri_2310*, esse VgrG tipo Rh mostra interação com o domínio GPW_gp25 do gene *hrubri_2310*, sendo uma possível forma de controle. Os genes que codificam para proteínas efetoras dentro do cluster são *Hrubri_2308* (que além de estrutural conta com domínio EvpB – efector), *Hrubri_2315* (proteína tóxica Tde) e *Hrubri_2317* (contem DUF4150 de ligação ao VgrG também presente apenas nesse cluster).

O gene *Hrubri_2314* codifica para a chaperona (DUF 2169, diferente da chaperona presente no cluster-I) que dobra proteínas efetoras no túbulo de Hcp gene, o gene *Hrubri_2316* codifica para a estrutura contrátil VipA/B e conta com domínio para porina e o gene *Hrubri_2318* codifica para a ATPase ClpB/V.

Os genes *Hrubri_2311*, *Hrubri_2312*, *Hrubri_2319* *Hrubri_2320* *Hrubri_2321* e *Hrubri_2322* representam os genes *imp*, formando o poro e o restante da estrutura.

O cluster-II não apresenta o regulador negativo TagF.

A proteína efectora Tde2 já mostrada dependente do DUF2169 (LIEN *et al.*, 2017), pode ser exclusiva desse cluster.

A tabela a seguir contém todos os genes relacionados com o sistema de secreção tipo VI em *H. rubrisubalbicans* M1. As colunas que mostram a formação de operon e qual a sua direção são importantes para compreender a estratégia de clonagem empregada nos ensaios de expressão:

TABELA 22: Características dos T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1

| Gene | Característica | Operon | Direção |
|--------------------|---|--------|----------|
| Cluster-II | | | |
| <i>Hrubri_2308</i> | ImpC, proteína efetora EvpB | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2309</i> | Proteína estrutural e efetora Hcp | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2310</i> | Proteína estrutural GPW_gp25 | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2311</i> | Proteína estrutural ImpG | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2312</i> | Proteína estrutural ImpH | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2313</i> | Proteína estrutural e efetora VgrG com Elemento Rh | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2314</i> | Chaperona | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2315</i> | Tde2 | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2316</i> | DUF3540, possível VipA/B | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2317</i> | Proteína efetora, contém DUF4150 | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2318</i> | ATPase ClpB/V | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2319</i> | Proteína estrutural ImpJ | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2320</i> | Proteína estrutural ImpK | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2321</i> | Proteína estrutural ImpL | 1 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_2322</i> | Proteína estrutural ImpA | 1 | 5' -> 3' |
| Cluster-I | | | |
| <i>Hrubri_3972</i> | Proteína efetora, contém DUF2235 e 4407 | 1 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3973</i> | Hipotética, contém DUF3304 | 1 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3974</i> | Chaperona, contém DUF4123 | 1 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3975</i> | Proteína efetora, contém DUF2345 | 1 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3976</i> | Proteína transmembrana putativa | 1 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3977</i> | Endolisina VanY | 2 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3978</i> | Contém domínio PAAR, possível proteína efetora | 2 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3979</i> | Proteína conservada desconhecida | 2 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3980</i> | Proteína estrutural ImpL, VipA/B | 2 | 5' -> 3' |

| |
|----------------------------|
| Continua na próxima página |
|----------------------------|

| | | | |
|--------------------|---|---|----------|
| <i>Hrubri_3981</i> | impM e regulador TagF | 2 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3982</i> | Porina de membrana externa | 2 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3983</i> | Proteína estrutural ImpA | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3984</i> | ATPase ClpB/V | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3985</i> | Proteína estrutural ImpH | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3986</i> | Proteína estrutural ImpG | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3987</i> | Proteína estrutural ImpF | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3988</i> | Proteína estrutural e efetora Hcp | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3989</i> | impC, proteína efetora EvpB | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3990</i> | Proteína estrutural ImpB | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3991</i> | lipoproteína, homologa da proteína VgrG | 3 | 3' -> 5' |
| <i>Hrubri_3992</i> | VasD | 4 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3993</i> | Proteína estrutural ImpJ | 4 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3994</i> | Proteína estrutural ImpK | 4 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3995</i> | Proteína estrutural e efetora VgrG | 4 | 5' -> 3' |
| <i>Hrubri_3996</i> | Domínio M23 de uma peptidase | 4 | 5' -> 3' |

Genes não contidos nos clusters de biossíntese do T6SS

| | | | |
|--------------------|--|-----|-----|
| <i>Hrubri_0039</i> | Proteína efetora, contém DUF2345 e 3540 de ligação ao Hcp | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_0200</i> | Proteína efetora contendo domínio PAAR e domínios DUF2345, VgrG e 1611_N | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_0234</i> | Proteína efetora, contém DUF2345 e 3540 de ligação ao Hcp | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_0968</i> | Proteína efetora, domínio NTOX44 | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_1110</i> | VgrG estrutural | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_1169</i> | Proteína efetora, contém DUF2345 e VgrG | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_2556</i> | Proteína efetora VgrG com elemento Rh, contém DUF2345 e sarcoglycan_1 | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_2799</i> | Provável efetora com domínio tóxico GP5C | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_3330</i> | Proteína efetora, contém DUF2345 e domínio CarboxipepD | N/A | N/A |

Continua na próxima página

| | | | |
|--------------------|--|-----|-----|
| <i>Hrubri_3635</i> | Proteína efetora, contém DUF2345 e domínio mu_Phage_45 | N/A | N/A |
| <i>Hrubri_3742</i> | Proteína efetora, contém DUF2345 e domínio TnpB_Is66 | N/A | N/A |

5.2.2. Caracterização fenotípica da estirpe mutante *Hrubri_2309*

O gene *Hrubri_2309* codifica para a proteína efetora e estrutural Hcp do cluster-II do T6SS, homologa das bactérias *Burkholderia glumae* e *Burkholderia plantarii*. Forma uma grande operon com o restante do cluster, iniciando pelo gene *Hrubri_2308* e terminando no gene *Hrubri_2324*. A região promotora do gene *Hrubri_2308* conta com sítios de ligação para os reguladores transcricionais ArgR, Fis e Fnr, como mostrado a seguir.

CgCGcctgtagatatcgCGtgatctcgctt**ttggca**aattgggtgtaatt**cgttatcca**tgCGgacaggctgacttagaaaaggCGcatccaggtgagcaccgaagtaaaactccgGCCacatggCGgtaccGGagacagccGCagattagcacaaggatcactGCCacttcgTtactttttacttccacagtgGGtattttctCGctccacagggTgaattcctacccctcccgaaccCGcatCGgCGctgaccgatggttccCGgagggccGGttccaggggggaaatacaccatcccGGgcaaag(ArgR)at(Fis)aaaaataataaatCGttgaat(fnr)atcaataactGGtcatgaacatCGgttggcagcCAattgcaatactgtccgctgtacgaatccGGcatcagggCGttgtggggcagacgatCGggaagcagaacgagcacacGGcacaatccagggTgtatttaattcaatCGgCGacttCGagggCGaggctacgaaatg

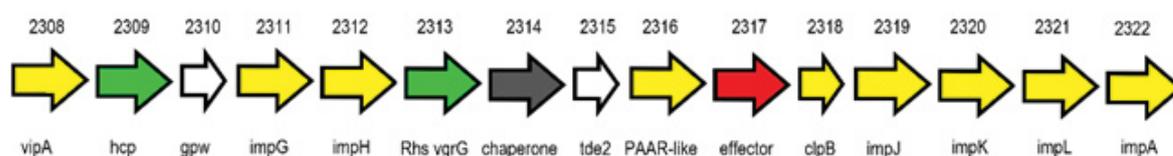


FIGURA 11: Estrutura do operon TSS6-II.

Não apresenta homologia com *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 95S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou fortemente aumentado em relação a estirpe selvagem nos tempos de 48, 72 e 96 horas (figura 96S). Apresentou diminuição notável no fenótipo de motilidade (figura 97S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi alterado em relação a estirpe selvagem, com diminuição do fenótipo de colonização epifítico nos dias 1, 3, 7 e 10 após o inóculo e do fenótipo endofítico no dia 3 após o inóculo (figura 98S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi fortemente afetado em todos os tempos gráficos, com aparente restituição do fenótipo competitivo epifítico a partir do dia 3 após o inóculo (figura 99S). A ultraestrutura da estirpe Hrubri_2309 mostra acúmulo de uma camada eletro densa em sua superfície, possivelmente relacionada com a grande produção de biofilmes (figura 100S). Foi a única estirpe do T6SS com menor formação da estria vermelha do sorgo, mostrando possível envolvimento do Hcp desse cluster (figura 101S).

TABELA 23: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2309.

| Resultados da estirpe Hrubri_2309 | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,60 | 2,84* | 0,00001 | 1,77 | 3,46* | 0,00001 | 2,32 | 3,59* | 0,0001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 5,04 | 2,18 | 0,00001 | 15,38 | 6,22 | 0,0001 | | | | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 5,47 | 5,41 | 0,8138 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 6,89 | 6,31 | 0,054 | 8,32 | 7,222* | 0,0018 | 8,22 | 7,16* | 0,0024 | 8,26 | 7,58* | 0,0330 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |

Continua na próxima página

| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|
| 5,16 | 4,76 | 0,1862 | 5,03 | 3,94* | 0,002 | 5,36 | 4,51* | 0,0104 | 5,31 | 4,69* | 0,0490 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 5,89 | 3,801* | 0,00001 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 7,28 | 3,913* | 0,00001 | 8,07 | 5,105* | 0,00001 | 8,22 | 6,222* | 0,00001 | 8,37 | 7,318* | 0,0026 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,56 | 2,913* | 0,00001 | 5,02 | 4,105* | 0,007 | 5,79 | 3,056* | 0,00001 | 5,14 | 3,126* | 0,00001 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,45 | 0,7676 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Única estirpe mutante T6SS com diminuição marcante na geração da estria vermelha. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Mutante apresentou marcante produção de muco sobre a membrana externa. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.2.3. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2312

O gene *Hrubri_2312* codifica para a proteína estrutural ImpH do cluster-II do T6SS. A análise da região promotora está contida no 7.4.2, figura 11 e na sessão de testes de β -galactosidase, item 7.5.

Não apresenta homologia com *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento diminuído em relação a estirpe selvagem (figura 102S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou levemente diminuído em relação a estirpe selvagem, principalmente no tempo de 48 horas, apresentando alteração significativa (figura 103S). Apresentou leve aumento no fenótipo de motilidade (figura

104S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi alterado em relação a estirpe selvagem, com diminuição do fenótipo de colonização epifítico nos dias 3, 7 e 10 após o inóculo e do fenótipo endofítico nos dias 1, 7 e 10 após o inóculo (figura 105S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi fortemente afetado durante a competição pela adesão as raízes e no dia 1 da competição epifítica, com aparente restituição desse fenótipo. A competição durante a colonização endofítica permaneceu diminuída durante todos os tempos gráficos (figura 106S). A mutação desse gene foi a primeira mutação de T6SS já feita (BLADERGROEN *et al.*, 2003). Assim como observado por esse autor, mutação da proteína ImpH causou aumento na virulência. Em *H. rubrisubalbicans* M1 observamos o mesmo fenômeno, podendo inclusive gerar a estria vermelha em plântulas com 3 dias de idade (figura 87).

TABELA 24: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2312.

| Resultados da estirpe Hrubri_2312 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,60 | 0,23* | 0,0004 | 1,77 | 1,10* | 0,021 | 2,32 | 1,67 | 0,0890 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 5,04 | 7,71 | 0,00001 | 5,25 | 5,10 | 0,2761 | 0,98 | 0,5913* | 0,00001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 5,47 | 5,51 | 0,8752 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 6,89 | 6,91 | 0,9534 | 8,32 | 7,433* | 0,0080 | 8,22 | 7,41* | 0,0128 | 8,26 | 7,72 | 0,0816 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,16 | 4,121* | 0,0028 | 5,03 | 4,91 | 0,6541 | 5,36 | 4,55* | 0,0138 | 5,31 | 4,29 | 0,2078 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|--|
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 5,90 | 2,86 | 0,00001 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 7,09 | 5,585* | 0,0002 | 7,70 | 7,050* | 0,0404 | 8,26 | 7,65 | 0,0524 | 7,53 | 6,829* | 0,0332 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 4,75 | 2,901* | 0,00001 | 4,58 | 4,09 | 0,1104 | 5,32 | 2,940* | 0,00001 | 4,17 | 3,135* | 0,00412 | |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | |
| 0,46 | 0,355* | 0,0001 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante causa doença em plântulas. | | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | | |
| Mutante não apresentou alterações fenotípicas em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.2.4. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2313

O gene *Hrubri_2313* codifica para a proteína efetora e estrutural VgrG do cluster-II do T6SS. A análise da região promotora está contida no 7.4.2, figura 11 e na sessão de testes de β -galactosidase, item 7.5.

Não apresenta homologia com *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 109S), fenótipo de formação de biofilme fortemente aumentados em relação a estirpe selvagem em todos os tempos gráficos (figura 110S). Apresentou leve diminuição no fenótipo de motilidade (figura 111S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi levemente alterado em relação a estirpe selvagem, com diminuição do fenótipo de colonização epifítico nos dias 1 e 3 após o inóculo e do fenótipo endofítico nos dias 3 e 10 após o inóculo (figura 112S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi fortemente afetado durante a competição pela adesão as

raízes e no dia 1 da competição epifítica, com aparente restituição desse fenótipo. A competição durante a colonização endofítica se mostrou diminuída principalmente no dia 1 após o inóculo (figura 113S). Essa estirpe mutante gerou sinais da estria vermelha do sorgo aumentados (figura 115S) e levou ao comprometimento do crescimento do sorgo inoculado (figuras 87 e 88).

TABELA 25: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2313.

| Resultados da estirpe Hrubri_2313 | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|--|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | |
| 0,60 | 1,76* | 0,00001 | 1,77 | 5,07* | 0,00001 | 2,32 | 6,64* | 0,0001 | | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | |
| 5,04 | 4,28 | 0,075 | 5,25 | 5,10 | 0,2761 | 0,98 | 0,5913* | 0,00001 | | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 5,47 | 5,44 | 0,9062 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 6,89 | 6,30 | 0,0508 | 8,32 | 6,982* | 0,0001 | 8,22 | 8,17 | 0,8648 | 8,26 | 7,52* | 0,0222 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 5,16 | 4,91 | 0,3996 | 5,03 | 3,85* | 0,0010 | 5,36 | 5,16 | 0,4984 | 5,31 | 3,87* | 0,0002 | |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 5,67 | 2,842* | 0,00001 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 7,07 | 5,060* | 0,00001 | 8,14 | 8,09 | 0,8646 | 8,45 | 7,011* | 0,0002 | 7,59 | 7,12 | 0,1174 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |

Continua na próxima página

| | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|----------------------------|---------|---------|------|-------|---------|------|------|--------|
| 4,66 | 3,060* | 0,00001 | 4,40 | 3,97 | 0,1574 | 5,76 | 4,193 | 0,00001 | 4,09 | 4,00 | 0,7509 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,45 | 0,6894 | 0,55 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresenta aumento nos sinais da doença e compromete o crescimento do sorgo. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Mutante apresentou marcante produção de muco sobre a membrana externa. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.2.5. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2319

O gene *Hrubri_2319* codifica para a proteína estrutural ImpJ do cluster-II do T6SS. A análise da região promotora está contida no 7.4.2, figura 11 e na sessão de testes de β -galactosidase, item 7.5.

Não apresenta homologia com *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 116S), fenótipo de formação de biofilme inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 117S). Fenótipo de motilidade inalterados em relação a estirpe selvagem (figura 118S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi alterado em relação a estirpe selvagem, com diminuição do fenótipo de colonização endofítico em todos os tempos gráficos (figura 119S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi fortemente afetado durante a competição pela adesão as raízes e no dia 1 da competição epifítica, com aparente restituição desse fenótipo. A competição durante a colonização endofítica se mostrou diminuída principalmente nos dias 1 e 3 após o inóculo (figura 120S). Essa estirpe mutante gerou sinais da estria vermelha do sorgo diminuídos, porém ainda foi capaz de gera-los (figura 122S).

TABELA 26: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2319.

| Resultados da estirpe Hrubri_2319 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,60 | 0,54 | 0,6128 | 1,77 | 1,02* | 0,01 | 2,32 | 1,56 | 0,056 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 5,04 | 6,34 | 0,024 | 5,25 | 5,10 | 0,2761 | 0,98 | 0,5913* | 0,00001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 5,47 | 5,58 | 0,6660 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 6,89 | 6,89 | 0,9965 | 8,32 | 7,701* | 0,0490 | 8,22 | 8,05 | 0,5640 | 8,26 | 7,41* | 0,0104 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,16 | 4,56 | 0,0558 | 5,03 | 4,34* | 0,0380 | 5,36 | 4,94 | 0,1664 | 5,31 | 4,33* | 0,0042 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 5,91 | 3,885* | 0,00001 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 6,99 | 4,865* | 0,00001 | 7,73 | 6,759* | 0,0038 | 8,33 | 6,540* | 0,00001 | 7,08 | 7,17 | 0,759 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,41 | 2,865* | 0,00001 | 4,04 | 2,793* | 0,006 | 5,82 | 4,670* | 0,001 | 4,92 | 4,40 | 0,092 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,41 | 0,144 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou leve diminuição na progressão da etria vermelha do sorgo. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Mutante não apresentou alterações fenotípicas em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.2.6. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2320

O gene *Hrubri_2320* codifica para a proteína estrutural transmembrana DotU do cluster-II do T6SS. A análise da região promotora está contida no 7.4.2, figura 11 e na sessão de testes de β -galactosidase, item 7.5.

Não apresenta homologia com *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 123S), fenótipo de formação de biofilme inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 124S). Fenótipo de motilidade inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 125S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi levemente alterado em relação a estirpe selvagem, com aumento da colonização epifítica no dia 1 após o inóculo e diminuição do fenótipo de colonização epifítico no dia 3 após o inóculo (figura 126S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi fortemente afetado durante a competição pela adesão as raízes, com aparente restituição desse fenótipo. A competição durante a colonização endofítica se mostrou diminuída principalmente no dia 1 após o inóculo (figura 127S). Essa estirpe mutante gerou menos sinais da estria vermelha do sorgo, porém ainda é capaz de gera-los (figura 129S).

TABELA 27: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_2320.

| Resultados da estirpe Hrubri_2320 | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|------------|---------|---------|-------------|---------|---------|--|--|--|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,60 | 0,30* | 0,0020 | 1,77 | 1,08* | 0,0146 | 2,32 | 2,05 | 0,4626 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| "swarming" | | | "swimming" | | | "twitching" | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 5,04 | 5,06 | 0,9596 | 5,25 | 5,10 | 0,2761 | 0,98 | 0,5913* | 0,00001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|----------------------------|---------|---------|-------|---------|---------|--------|---------|---------|--|
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 5,47 | 5,34 | 0,6112 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 6,89 | 7,89* | 0,0028 | 8,32 | 6,934* | 0,0001 | 8,22 | 8,12 | 0,7334 | 8,26 | 8,03 | 0,4374 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 5,16 | 5,02 | 0,6342 | 5,03 | 4,77 | 0,3814 | 5,36 | 4,95 | 0,1762 | 5,31 | 5,29 | 0,9476 | |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | | |
| 5,72 | 3,771* | 0,00001 | | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 6,89 | 6,238* | 0,004 | 7,57 | 7,37 | 0,4984 | 8,30 | 6,785* | 0,0002 | 6,35 | 7,112* | 0,0194 | |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | |
| 4,31 | 2,950* | 0,004 | 4,20 | 3,90 | 0,3148 | 5,67 | 4,328* | 0,0004 | 5,21 | 5,07 | 0,6342 | |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | |
| 0,46 | 0,41 | 0,139 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou leve diminuição na progressão da etria vermelha do sorgo. | | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | | |
| Mutante não apresentou alterações fenotípicas em relação a estirpe selvagem. | | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor P < 5%.

5.2.7. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3993

O gene *Hrubri_3993* codifica para a proteína estrutural ImpJ do cluster-I do T6SS, T6SS com ampla homologia e presente na maioria das espécies do gênero

Herbaspirillum spp. Os genes *HRubri_3993*, *Hrubri_3994* e *Hrubri_3995* estão presentes no mesmo operon (3º, que vai do *Hrubri_3992* ao *Hrubri_3996*). Existem 2 TATA boxes na região promotora do gene *Hrubri_3992*, a primeira conta com sítios de ligação para os reguladores transcricionais NarL, GcvA e RpoD17, como mostrado a seguir.

Cctccgggctgggcttgattgggtattggcacacccccgccaacatcagtaccagcaaggctggaacaat
cagaccactttgaattgctcgcacgca**ttggaa**acc(NarL)actcc(GcvA)ttatat(RpoD)**ttttaacat**t
gaaaaaatctgcacggtcctcgcgcaagcaaatcagccgagaccggaaaaactccggaattcctgattttaag
cttcaatgagatgcgacggcagttttctggcgaaattgatgctttgaataaccgcacttttaactacccccacgttctaatt
acgactatcaggttgtgcccgacttaataagttttaagtaatttgaacttaagctcgtccaaatgtatcgcatagaccttgac
gagaaaacgcagttccgtaatccgtaagcact**ttccta**aaaaatttctggca**cgcgagaa**tctcgcgcatcaga
aatcaaacaacccgcacggggcagagttgaagaaccgactgatcgatctcctggca**atg**

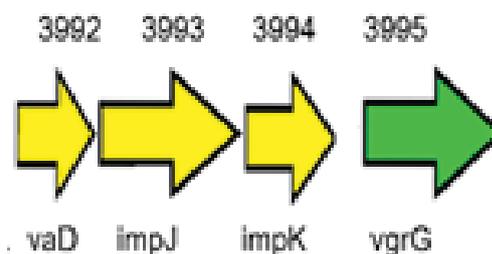


FIGURA 12: Configuração do operon 3 do T6SS-1 *HRubri_3992 HRubri_3993 HRubri_3994 HRubri_3995*.

Esse sistema parece transportar ácidos carboxílicos e taurina e estão envolvidos no catabolismo de ácido siálico (KAPATRAL *et al.*, 2002) que por sua vez estão envolvidos na externalização de carboidratos e formação de biofilme, explicando sua maior produção. É homólogo do gene *Hsero_4040* de *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 130S), fenótipo de formação de biofilme inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 131S). Fenótipo de motilidade inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 132S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples foi inalterado (figura 133S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo

foi afetado durante a competição epifítica, apresentando fenótipo diminuído nos dias 1, 3 e 7 após o inóculo, com aparente restituição do fenótipo. A competição endofítica foi afetada em todos os tempos gráficos, especialmente no dia 1 após o inóculo, onde o fenótipo se apresentou fortemente diminuído (figura 134S). Essa estirpe gerou menos sinais da doença durante o início da colonização do sorgo, porém após 14 dias esses sinais sobressaem a estirpe selvagem (figura 136S e figura 86).

TABELA 28: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3993.

| Resultados da estirpe Hrubri_3993 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,60 | 0,94* | 0,0044 | 1,77 | 2,33 | 0,064 | 2,32 | 3,33* | 0,0122 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 5,04 | 4,16 | 0,0396 | 5,25 | 5,10 | 0,2761 | 0,98 | 0,5913* | 0,00001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,70 | 6,39 | 0,2804 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,35 | 7,55* | 0,035 | 7,87 | 8,17 | 0,2314 | 8,98 | 9,21 | 0,4374 | 8,76 | 8,27 | 0,1106 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,20 | 4,86 | 0,2570 | 5,53 | 5,85 | 0,2848 | 5,58 | 4,31* | 0,0006 | 4,91 | 4,67 | 0,4182 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,08 | 5,63 | 0,1402 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 7,9 | 6,691* | 0,0008 | 8,46 | 7,534* | 0,006 | 9,44 | 7,618* | 0,00001 | 8,81 | 8,015* | 0,0158 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |

Continua na próxima página

| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
|--|---------|---------|----------------------------|---------|---------|------|---------|---------|-----|---------|---------|
| 5,50 | 3,243* | 0,00001 | 5,81 | 4,979* | 0,012 | 5,22 | 4,213* | 0,0034 | 4,6 | 3,869* | 0,0238 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,51 | 0,133 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou dificuldades de geração da estria vermelha do sorgo nos estágios iniciais da colonização porém sinais agravados a partir do dia 14 da colonização. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Não foi possível visualizar a amostra. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.2.8. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3994

O gene Hrubri_3994 codifica para a proteína estrutural ImpK do cluster-I do T6SS. A análise da região promotora está contida no item 7.4.7, figura 13 e item 7.5.

É homólogo do gene *Hsero_4041* de *H. seropedicae* SmR1. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 137S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou levemente aumentado em relação a estirpe selvagem principalmente no ponto de 96 horas (figura 138S). Fenótipo de motilidade foi levemente aumentado em relação a estirpe selvagem (figura 139S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples apresentou uma leve diminuição no dia 1 após o inóculo durante a colonização endofítica (figura 140S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi afetado durante a competição epifítica, apresentando fenótipo diminuído nos dias 1 e 3 após o inóculo, com aparente restituição do fenótipo. A competição endofítica foi afetada em todos os tempos gráficos, e o fenótipo de competição endofítica parece diminuir nos dias 7 e 10 após o inóculo (figura 141S). Essa estirpe gerou menos sinais da doença durante o início da colonização do sorgo, porém após 14 dias esses sinais sobressaem a estirpe selvagem (figura 143S e figura 86).

TABELA 29: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3994.

| Resultados da estirpe Hrubri_3994 | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---------|-------------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,60 | 0,77 | 0,1132 | 1,77 | 2,22 | 0,1250 | 2,32 | 2,38 | 0,8382 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 5,04 | 7,08 | 0,0004 | 5,25 | 5,10 | 0,2761 | 0,98 | 0,5913* | 0,00001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,70 | 6,27 | 0,1418 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,35 | 7,84 | 0,1554 | 7,87 | 8,01 | 0,4984 | 8,98 | 8,54 | 0,1486 | 8,76 | 8,36 | 0,1862 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,20 | 3,95* | 0,0006 | 5,53 | 5,86 | 0,2706 | 5,58 | 4,17* | 0,0002 | 4,91 | 4,47 | 0,1486 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,25 | 5,599* | 0,0404 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 7,67 | 6,311* | 0,0001 | 8,38 | 7,282* | 0,0018 | 9,37 | 8,653* | 0,0254 | 8,55 | 7,895* | 0,0434 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,39 | 4,399* | 0,004 | 5,18 | 4,276* | 0,0074 | 4,03 | 3,106* | 0,0064 | 5,40 | 3,963* | 0,00001 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,43 | 0,3992 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |

Continua na próxima página

| |
|--|
| Essa estirpe mutante apresentou dificuldades de geração da estria vermelha do sorgo nos estágios iniciais da colonização porém sinais agravados a partir do dia 14 da colonização. |
|--|

| |
|------------------------|
| Microestrutura: |
|------------------------|

| |
|--|
| Não foi possível visualizar a amostra. |
|--|

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.2.9. Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3995

O gene *Hrubri_3995* codifica para a proteína efetora e estrutural VgrG do cluster-I do T6SS. A análise da região promotora está contida no item 7.18.6. e figura 13.

H. seropedicae SmR1 não apresenta proteína VgrG dentro do cluster-I de seu genoma, a maior homologia acontece com o gene *Hsero_0748*. Podemos observar o fenótipo de crescimento inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 144S), fenótipo de formação de biofilme se apresentou aumentado em relação a estirpe selvagem em todos os pontos gráficos (figura 145S). Fenótipo de motilidade foi inalterado em relação a estirpe selvagem (figura 146S). O perfil de colonização das raízes do sorgo simples apresentou uma leve diminuição no dia 1 após o inóculo durante a colonização endofítica (figura 147S). O perfil de competição na colonização das raízes do sorgo foi afetado durante a competição epifítica, apresentando fenótipo diminuído nos dias 1, 3 e 7 após o inóculo, com aparente restituição do fenótipo. A competição endofítica foi afetada nos dias 1, 3 e 7 após o inóculo (figura 148S). Na ultraestrutura, podemos observar irregularidades na membrana, semelhante ao observado na estirpe Hrubri_2309, compatível com sua maior formação de biofilmes (figura 149S). Quanto a geração de sinais da estria vermelha no sorgo, essa estirpe também iniciou a colonização desenvolvendo menos sinais e passou a sobressair a estirpe selvagem após 14 dias (figura 150S e figura 86).

TABELA 30: Caracterização fenotípica da estirpe mutante Hrubri_3995.

| |
|--|
| Resultados da estirpe Hrubri_3995 |
|--|

| |
|----------------------------|
| Continua na próxima página |
|----------------------------|

| formação de biofilme (550 nm): | | | | | | | | | | | |
|--|---------|---------|-------------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------|---------|---------|
| 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 0,60 | 1,59* | 0,00001 | 1,77 | 3,04* | 0,0004 | 2,32 | 5,13* | 0,00001 | | | |
| Motilidade (halo, cm²): | | | | | | | | | | | |
| <i>"swarming"</i> | | | <i>"swimming"</i> | | | <i>"twitching"</i> | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | |
| 5,04 | 6,06 | 0,0396 | 5,25 | 5,10 | 0,2761 | 0,98 | 0,5913* | 0,00001 | | | |
| Colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 6,70 | 6,61 | 0,7494 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 8,35 | 7,98 | 0,2944 | 7,87 | 7,97 | 0,9456 | 8,98 | 8,73 | 0,3996 | 8,76 | 8,57 | 0,5198 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 5,20 | 4,35* | 0,0104 | 5,53 | 5,71 | 0,5418 | 5,58 | 4,25* | 0,0004 | 4,91 | 5,2 | 0,3306 |
| Competição durante a colonização (Log UFC.g⁻¹): | | | | | | | | | | | |
| Adesão | | | | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | | | | | | | | | |
| 5,79 | 5,39 | 0,1862 | | | | | | | | | |
| Colonização epifítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 7,57 | 6,286* | 0,0006 | 8,57 | 7,201* | 0,0004 | 9,54 | 8,193* | 0,0004 | 8,53 | 7,738* | 0,0158 |
| Colonização endofítica | | | | | | | | | | | |
| Dia 1 | | | Dia 3 | | | Dia 7 | | | Dia 10 | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P |
| 4,36 | 3,176* | 0,001 | 5,02 | 3,881* | 0,0014 | 4,31 | 3,216* | 0,002 | 6,14 | 5,295* | 0,0112 |
| Perfil de crescimento: | | | | | | | | | | | |
| Taxa de crescimento (h ⁻¹): | | | Taxa de duplicação (h): | | | | | | | | |
| M1 | Mutante | Valor P | M1 | Mutante | Valor P | | | | | | |
| 0,46 | 0,47 | 0,8078 | 0,6 | 0,48* | 0,00001 | | | | | | |
| Estria vermelha do sorgo: | | | | | | | | | | | |
| Essa estirpe mutante apresentou dificuldades de geração da estria vermelha do sorgo nos estágios iniciais da colonização porém sinais agravados a partir do dia 14 da colonização. | | | | | | | | | | | |
| Microestrutura: | | | | | | | | | | | |
| Mutante apresentou marcante produção de muco sobre a membrana externa. | | | | | | | | | | | |

Os valores assinalados como (*) representam significância estatística com valor $P < 5\%$.

5.3. EXPRESSÃO GÊNICA DO T6SS DE *H. rubrisubalbicans* M1

Para os ensaios de β -galactosidase, clonamos a região promotora na direção 5' -> 3' no vetor pPW452 e regiões promotoras 3' -> 5' no vetor pMP220, vetores que contem o gene *lacZ* à jusante da região promotora clonada, funcionando como reportador genético de expressão genica. O cluster-II do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 conta apenas com a região promotora do gene *Hrubri_2308*, representando um grande operon. Por outro lado, o cluster-I conta com 6 prováveis regiões promotoras em ambas as direções (figuras 14, 15 e 16). A seguir serão mostradas as análises das regiões promotoras referentes aos ensaios de expressão gênica, novamente a região TATA box será mostrada em caixa alta e os sítios de ligação de reguladores transcricionais estão destacados a frente da sequência.

Região promotora do gene *Hrubri_2308*:

Cgcgctgtagatatcgcgtgatctcgctt**ttggca**aattggtgtaatt**cgttatcca**tgccgacaggctg
actttagaaaaggcgcacatccaggtgagcaccgaagtaaaactccggccacatggcgtaccggagacagccgcag
attagcacaaggatcactgccacttcgctactttttacttctccacagtgggtattttctcgctccacaggggtgaattccta
ccccctcccgaaccgcatcggcctgaccgatggttccgcgaggccggttccaggggggaaatacaccatcc
cgggcaaag(ArgR)at(Fis)aaaaataataaatcgttgaat(Fnr)atcaataacttggtcatgaacatcgtgtggc
acgccaattgcaatactgtccgctgtacgaatccggcatcaggcgttgttggggcagacgatgcgggaagcagaac
gagcacacggcacatccaggggttatttaattcaatcggcgcacttcgaggcgaggctacgaaatg.

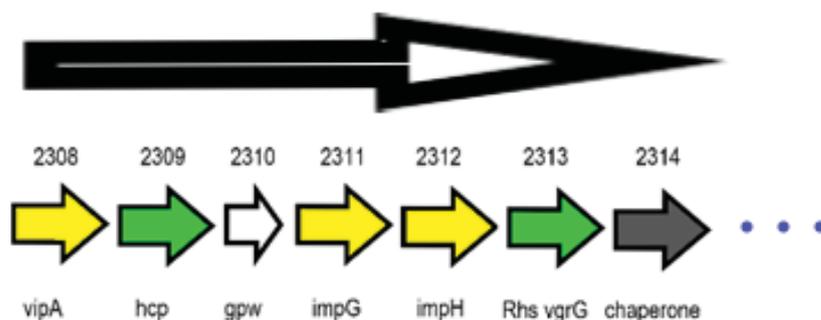


FIGURA 13: Configuração do operon único do cluster-II do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1.

Região promotora do gene *Hrubri_3976*:

Agaaggaacagcagcagcaatcccctttttattctggccggcgcacgtgaacctgggaggacgaacgccgca
cgtttctggagttggccggccggttg**tgccg**gacgggcaggaaa**cggtaa**(Fnr)**atc**(ArcA)a(ArgR)a
taaaaatcaacaact(Crp)tttgcaagttgaataacacaggagtagcgccttcgagcctccgaaccaagacaaa
cctgcgtccagaagaccgagcttgatg.

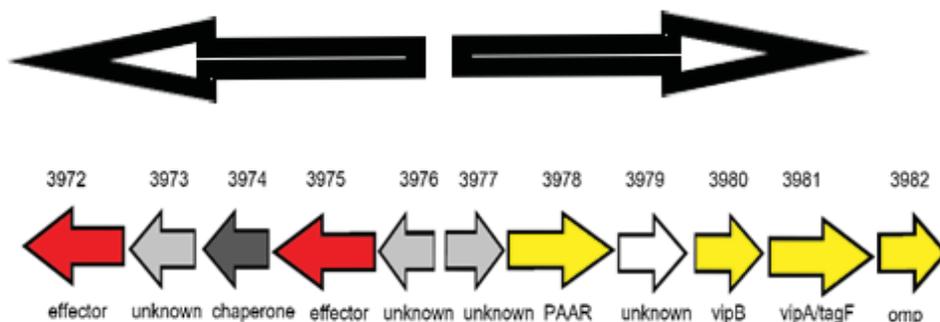


FIGURA 14: Configurações dos possíveis operons 1 e 2 do T6SS-1 de *H. rubrisubalbicans* M1

Região promotora do gene *Hrubri_3977*:

Ttgaggaaccgtagggtccgtaccctcccagatggaaaaagcaacaaccacatcgcggaagccggtggccag
caggtaggcagcaatgagaa**ggaac**agcagcagcaat(RpoD)cc(HipB)cc(ArgR2)**ttttattctgg**
ccggcg

Região promotora do gene *Hrubri_3991*:

Cctccgggctgggcttgattgggtattggcacacccccgccaacatcagtaccagcaaggctggaacaatcag
 acccacttgaatttgctcgcacgca**ttggaa**acc(NarL)actcc(GcvA)ttatat(RpoD)**tttaaca**tgaa
 aaaaatctgcacggctcctcgcgcaagcaaatcagccgagaccggaaaaactccggaattcctgattttaagcttc
 gaatgagatg

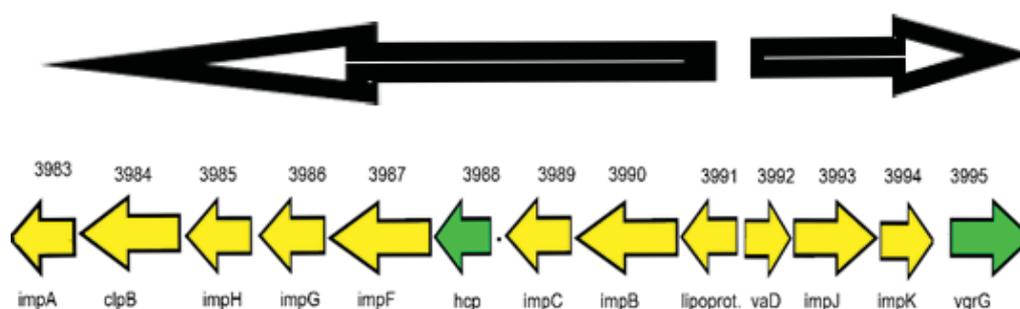


FIGURA 15: Configurações dos possíveis operons 3 e 4 do T6SS-1 de *H. rubrisubalbicans* M1

Região promotora do gene *Hrubri_3992*:

cttgacgagaaaacgcagttccgtaatccgtaagcact**ttccta**aaaaatttccggca**cgcgaga**aatctcg
 cgcacagaaatcaaacaaccgcacggggcagagttgaagaaccgactgatcgatctcctggcaatg

Região promotora do gene *Hrubri_3997*:

tcacgtcgaccaatcttctgtcgcaggtccaccacatcgtcgtctacgatcgccgtttttgatctctgctgaaggc
 cgctcatagggccacgggtcccgtgtagtga(RpoD18)ttgataggc**ttgCC**cgtttgagatcaa(RpoD1
 6)**tgatataaa**ccttagtaacgggtggagcgcctattcgagcttggtcaggctctggcccatatgattgcacggtc
 tctatg

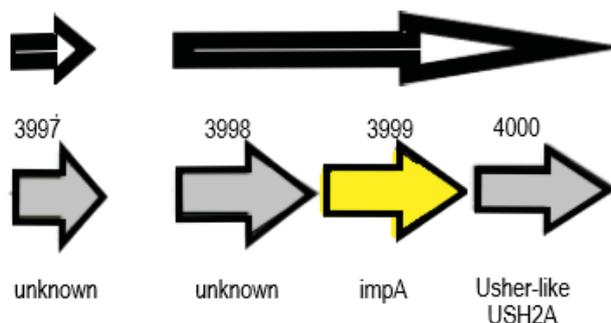


FIGURA 16: Configurações dos possíveis operons 5 e 6 do T6SS-1 de *H. rubrisubalbicans* M1

Região promotora do gene *Hrubri_3998*:

Tggtgccgcgggcacccttggtccactttcccacgtagaattttgcaccggaaggatgatcgcttaagacaaatc
 gccCaggatatttcttgaggatcatcgccggactggccaagtgaatgtgaatgttctcattcatcgcgaggttc
 cctgcgctgTTTTgttaccacagctaatacagcactgcggatcccatagcgatg

Os gráficos a seguir serão mostrados em duplas, uma delas sem a construção pMPHrurbi_3976 devido a atividade elevada em relação as outras construções, permitindo avaliar as diferenças sutis observadas nos Perfis para as condições testadas.

A seleção das condições testadas foi feita levando-se em consideração características chave no desenvolvimento dessa tese (competição e interação planta-bactéria) e condições relacionadas com os reguladores transcricionais presentes nas regiões promotoras dos operons (estresse oxidativo, fases de crescimento e estresse nutritivo). Estresse oxidativo (1 mM e 10 mM de peróxido de hidrogênio – figuras 26 e 27), está relacionado com os reguladores transcricionais Fnr e MarR. Tempos de crescimento (3, 6 e 24 horas – figuras 17, 18 e 19), associado com os reguladores MarR, ArcA e ArgG. Estresse nutricional (utilização do meio mínimo plant-medium – figura 21), relacionado com os reguladores MarR, ArcA e Crp. Influência vegetal (raiz de *Sorghum bicolor* inteira, extrato das raízes de *Sorghum bicolor* 0,1 e 1 g e extrato de *Saccharum officinarum* susceptível a estria mosqueada – figuras 22, 23, 24 e 25). Efeito de metais divalentes (EDTA – figura 20) e competição (*E. coli*, devido as características competitivas do T6SS – figura 28) (ALEKSHUN *et al.*, 2001; KRIN *et*

al., 2003; MARTINEZ-ANTONIO *et al.*, 2003; JERVIS *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2013; GAMA-CASTRO *et al.*, 2016 & LV *et al.*, 2018).

A expressão da construção pMPHrubri3976::*lacZ* (reguladores transcricionais ArcA, ArgG e Crp) foi significativamente mais alta em todas as condições testadas com exceção em presença de EDTA 500 mM, onde a expressão de todas as regiões promotoras foi perdida, mostrando envolvimento de metal divalente na expressão de ambos os clusters do T6SS. As construções pMP2308fw1rv2::*lacZ* (reguladores transcricionais ArgR, Fis e Fnr), pMP3991::*lacZ* (reguladores transcricionais NarL, GcvA e RpoD) e pPW3998::*lacZ* (reguladores transcricionais não conhecidos pelo algoritmo SoftBerry) embora tenham apresentado atividades baixas, apresentaram perfil de expressão genica mais altos do que as demais construções nas condições testadas. As construções pMP2308fw1rv1::*lacZ* (reguladores transcricionais ArgR e Fis, sem Fnr) e pPW3997::*lacZ* (reguladores transcricionais RpoD16 e RpoD18) apresentaram expressão genica em condições específicas (pMP2308fw1rv1::*lacZ* – baixa expressão nas fases de crescimento e sob estresse oxidativo e pPW3997::*lacZ* início da fase de crescimento, extrato de raiz de *Sorghum bicolor* 1 g e estresse oxidativo). A construção pPW3998::*lacZ* perdeu sua expressão sob estresse nutricional.

Mais detalhes sobre a expressão genica serão mostrados na sessão de discussão. De maneira geral, esse experimento mostra que o cluster-I está sendo constitutivamente expresso, característica evidenciada pela construção pMPHrubri_3976::*lacZ*, e que o perfil de expressão está diretamente relacionado com a curva de crescimento, tendo todas as condições testadas diminuído a expressão desse cluster, indicando que o grau de atividade da cultura é a principal característica que regula o cluster-I, indo de acordo com as funções de competição inter-específica e supressão do crescimento intra-específica. Já no cluster-II, pode ser observado que nenhuma dessas condições ativou a expressão significativa das construções, porém observamos pequenas ativações na presença de raiz ou extratos vegetais, evidenciando sua importância para a colonização, porém ensaios de β -galactosidase parecem não ser apropriados para avaliar ativação de genes dependentes de hospedeiros.

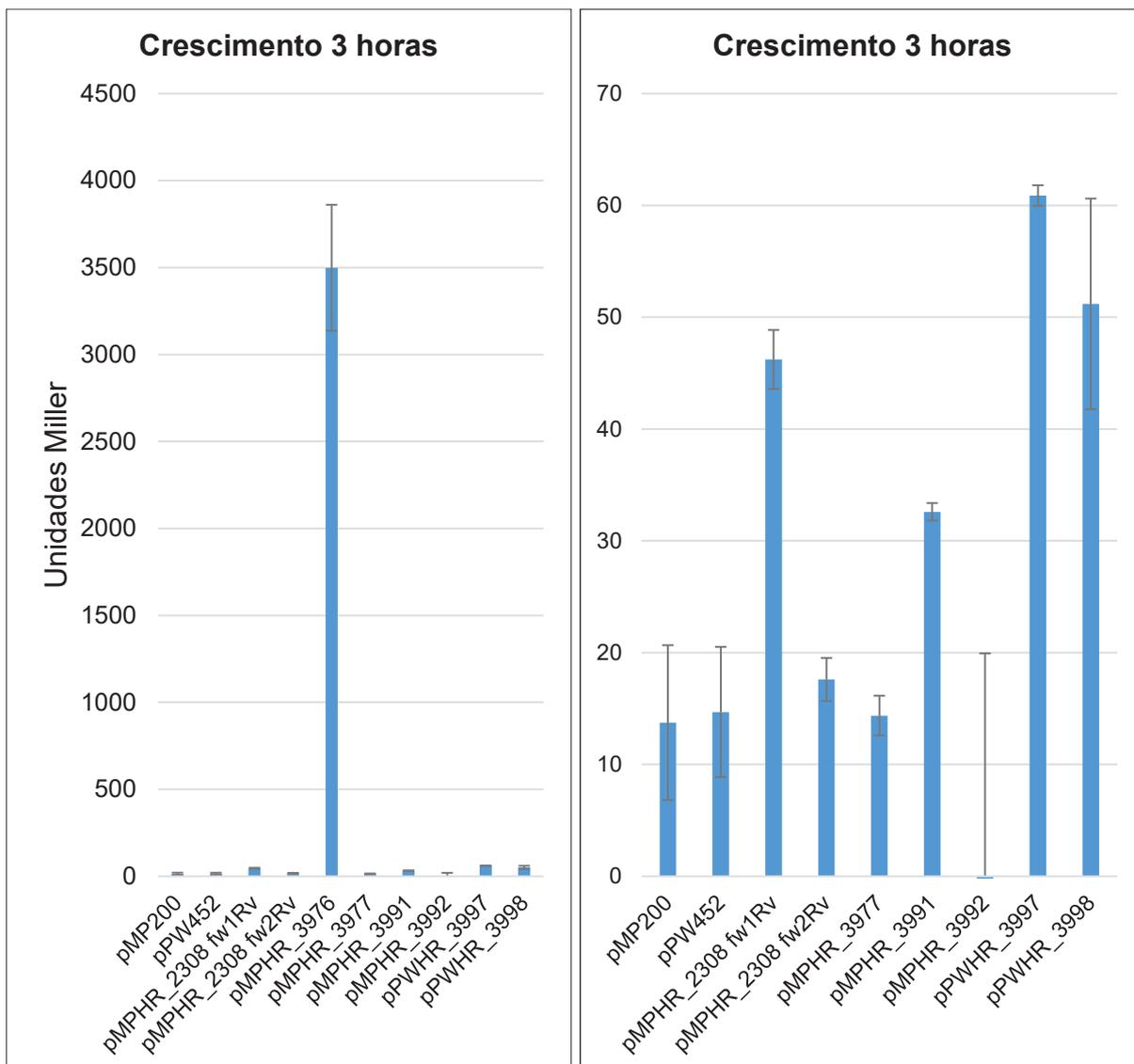


FIGURA 17: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS em 3 horas de crescimento. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP200 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

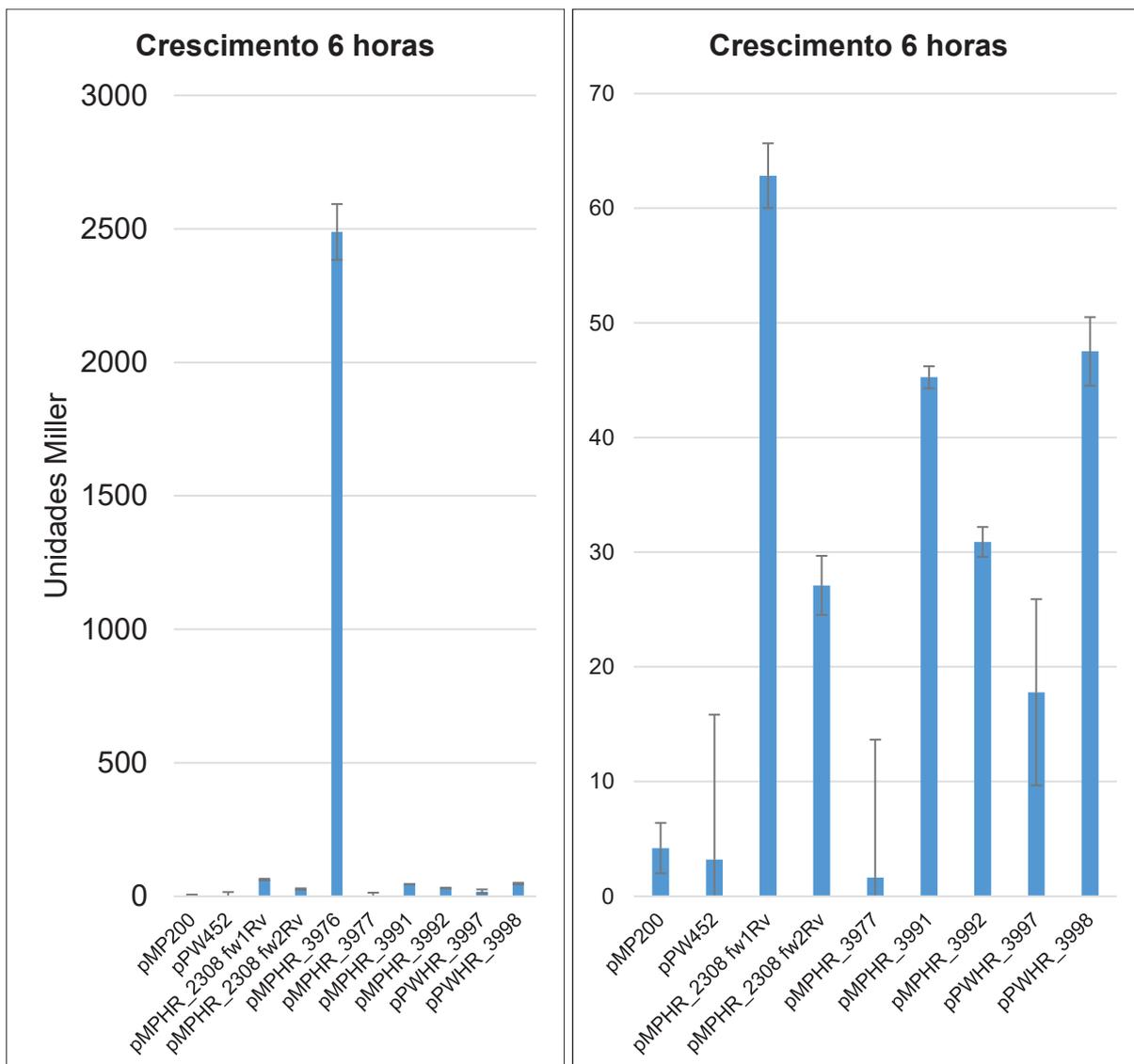


FIGURA 18: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS em 6 horas de crescimento. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

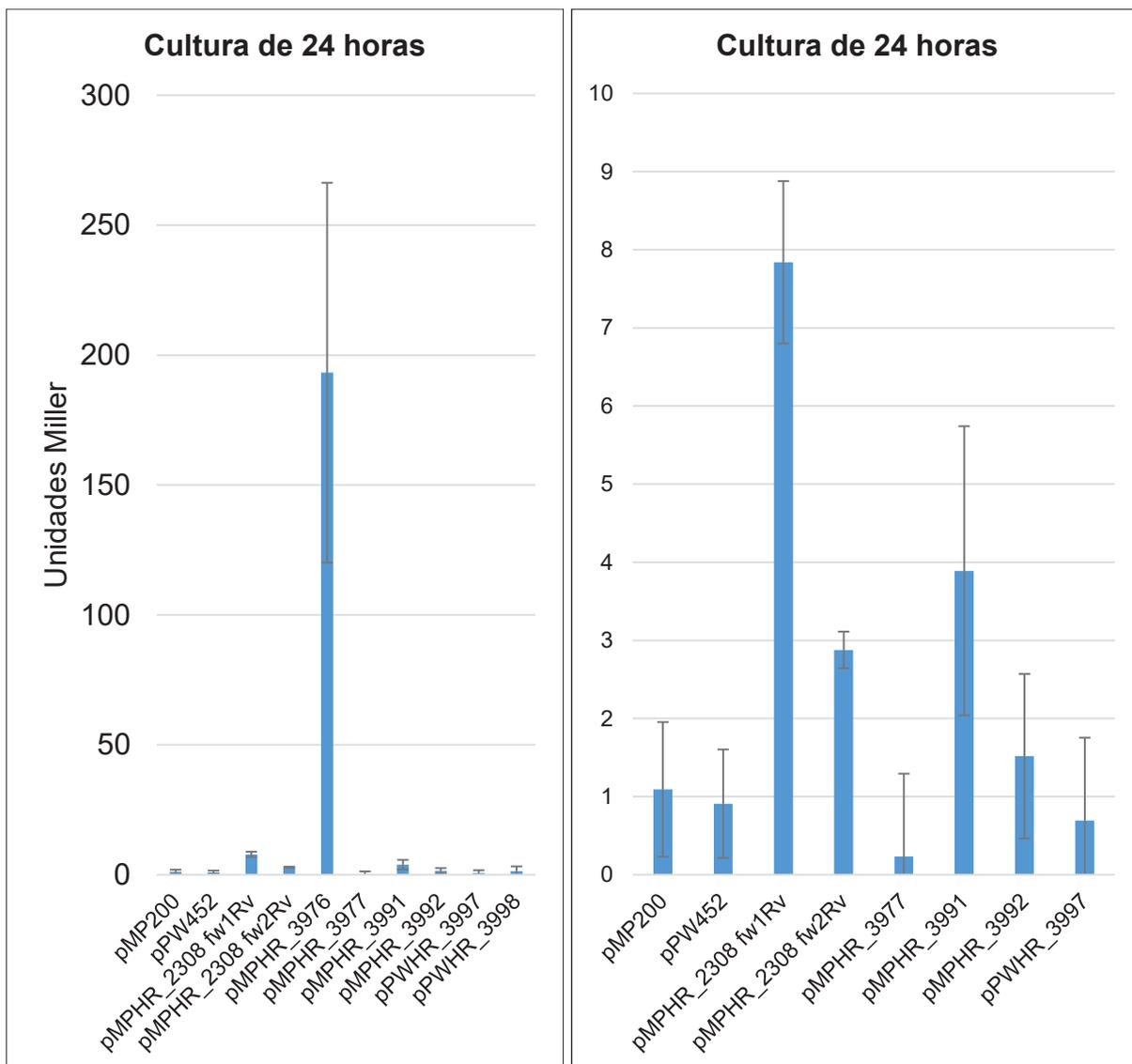


FIGURA 19: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS em 12 horas de crescimento. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

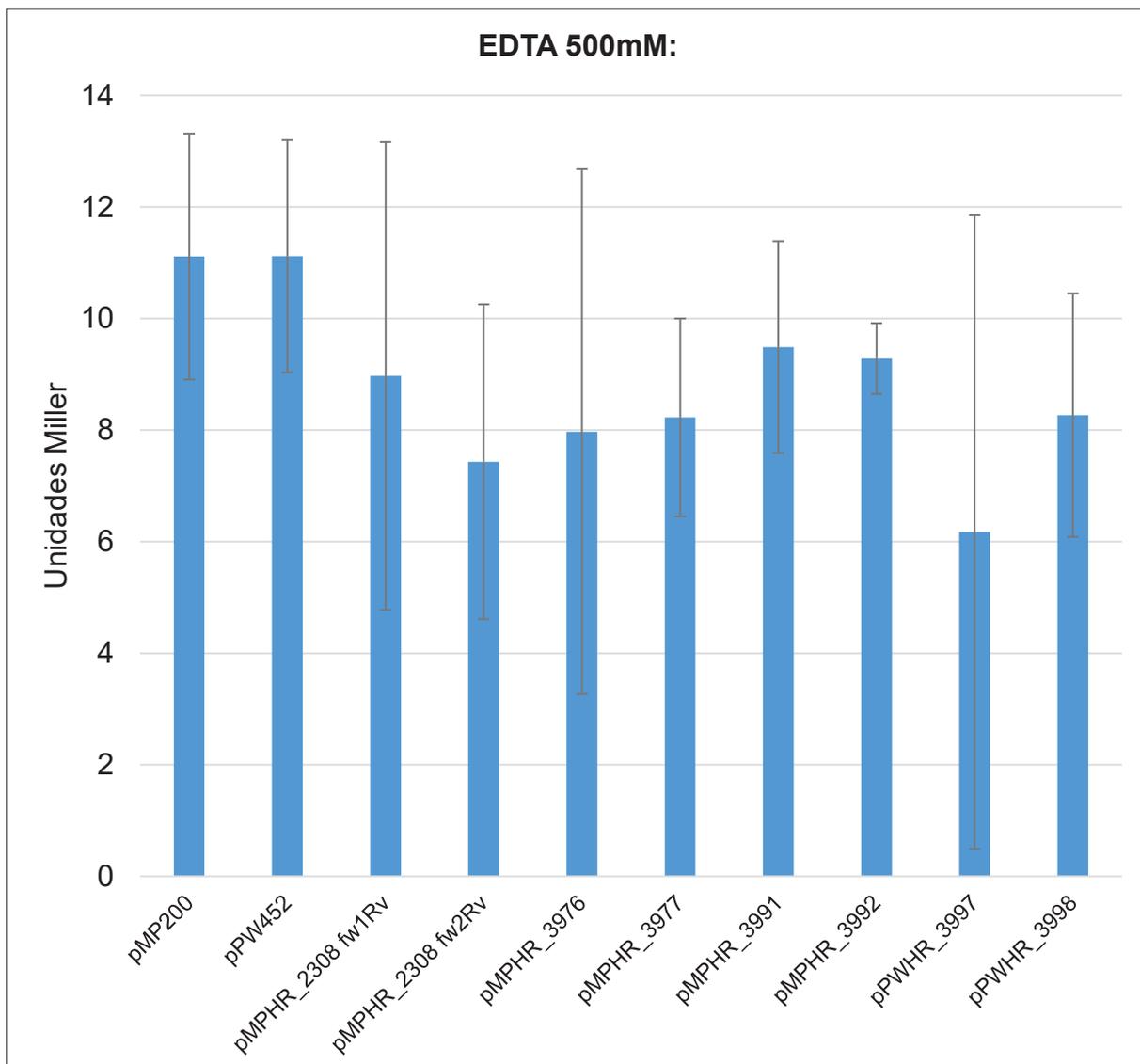


FIGURA 20: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de EDTA. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

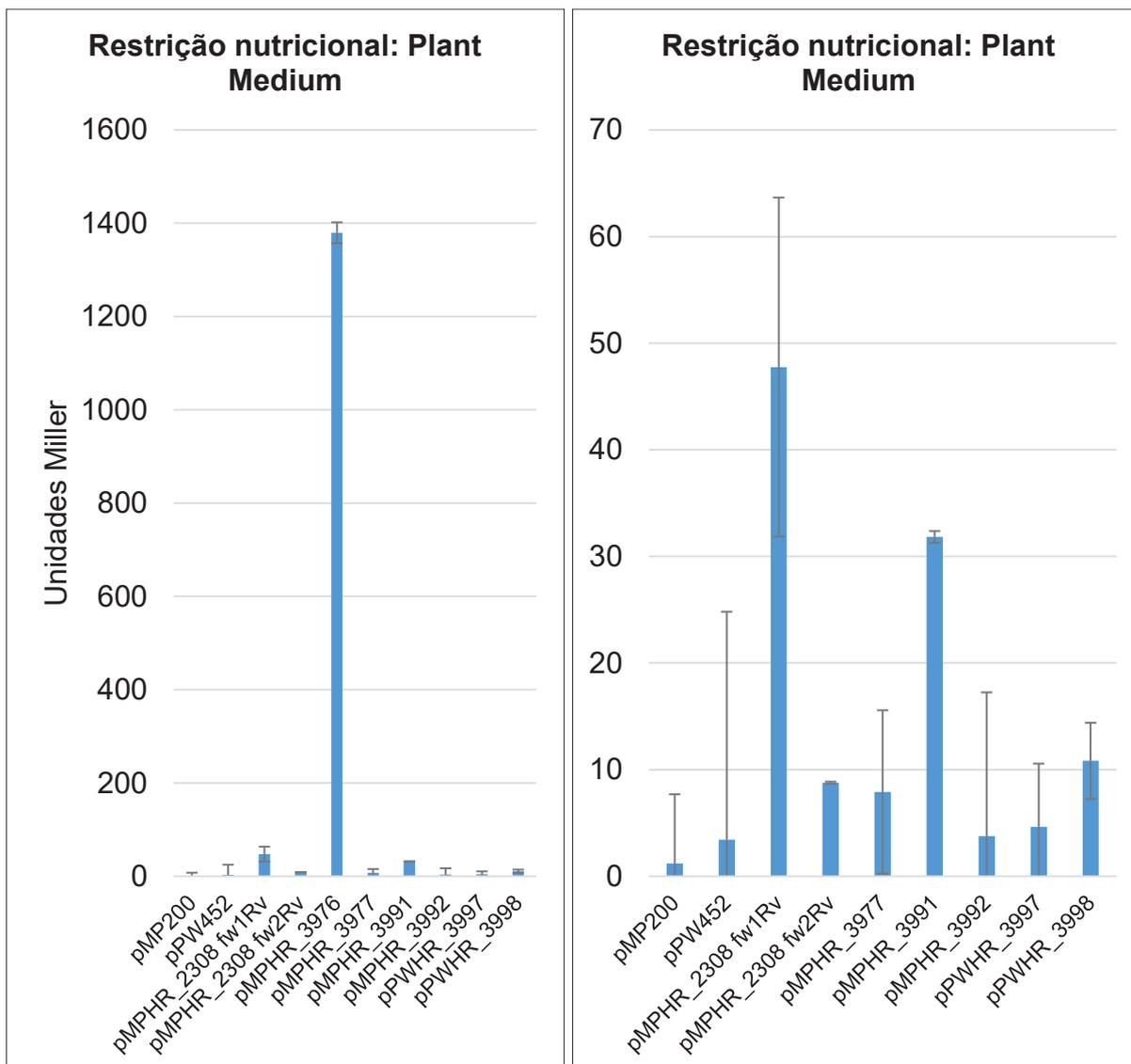


FIGURA 21: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS em meio mínimo. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

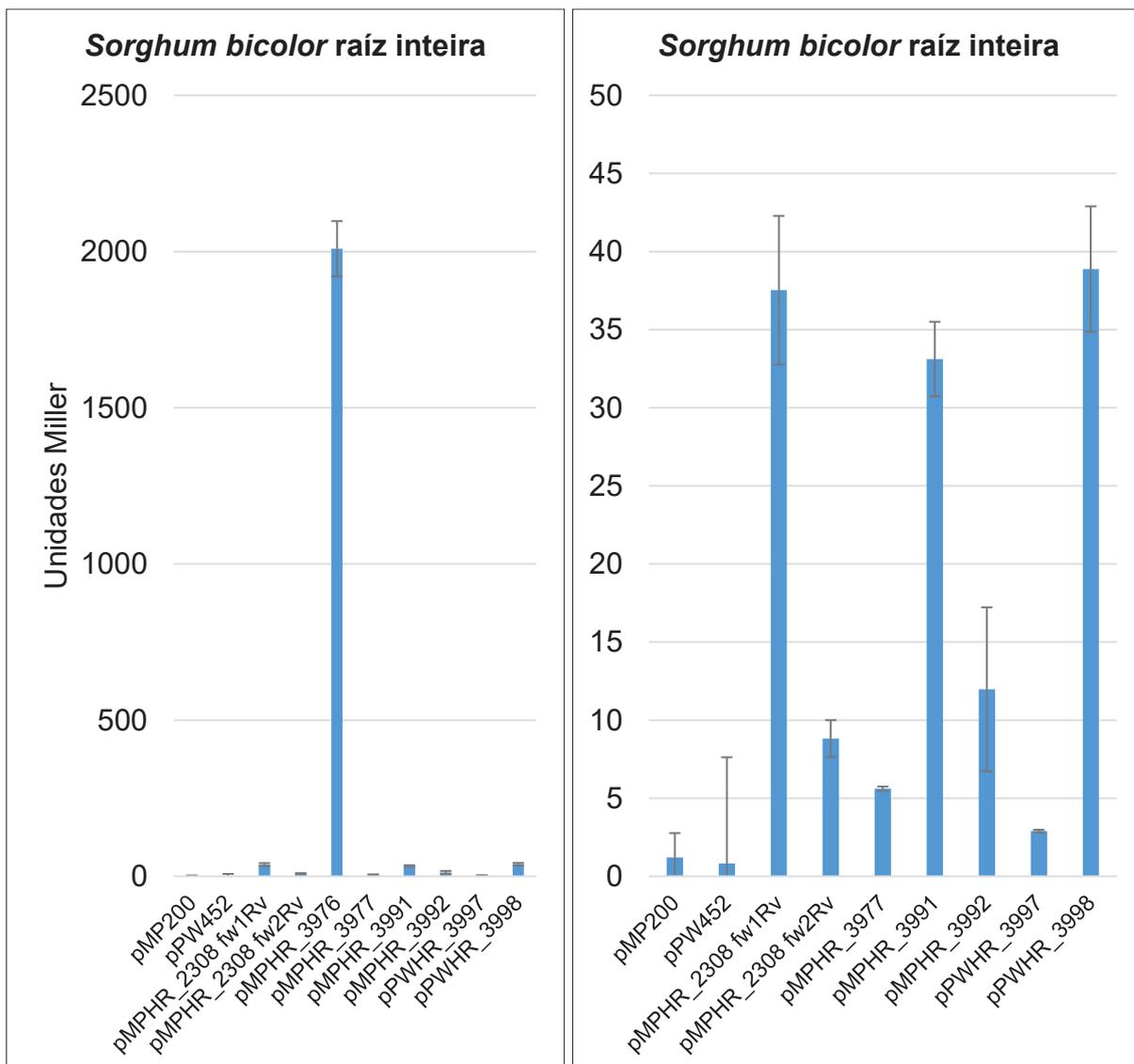


FIGURA 22: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de raiz inteira. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

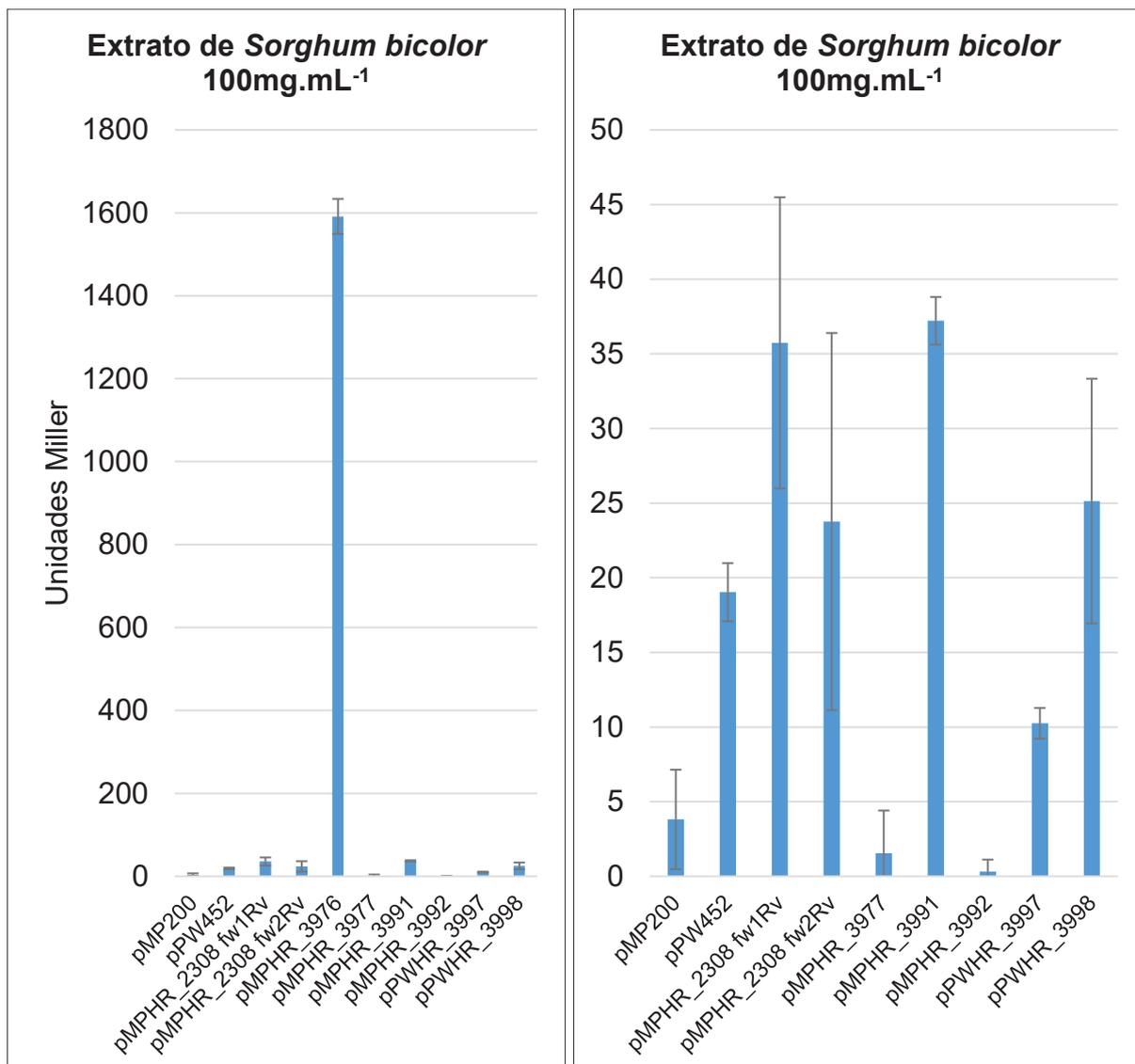


FIGURA 23: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de 100mg de extrato de raízes de *Sorghum bicolor*. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

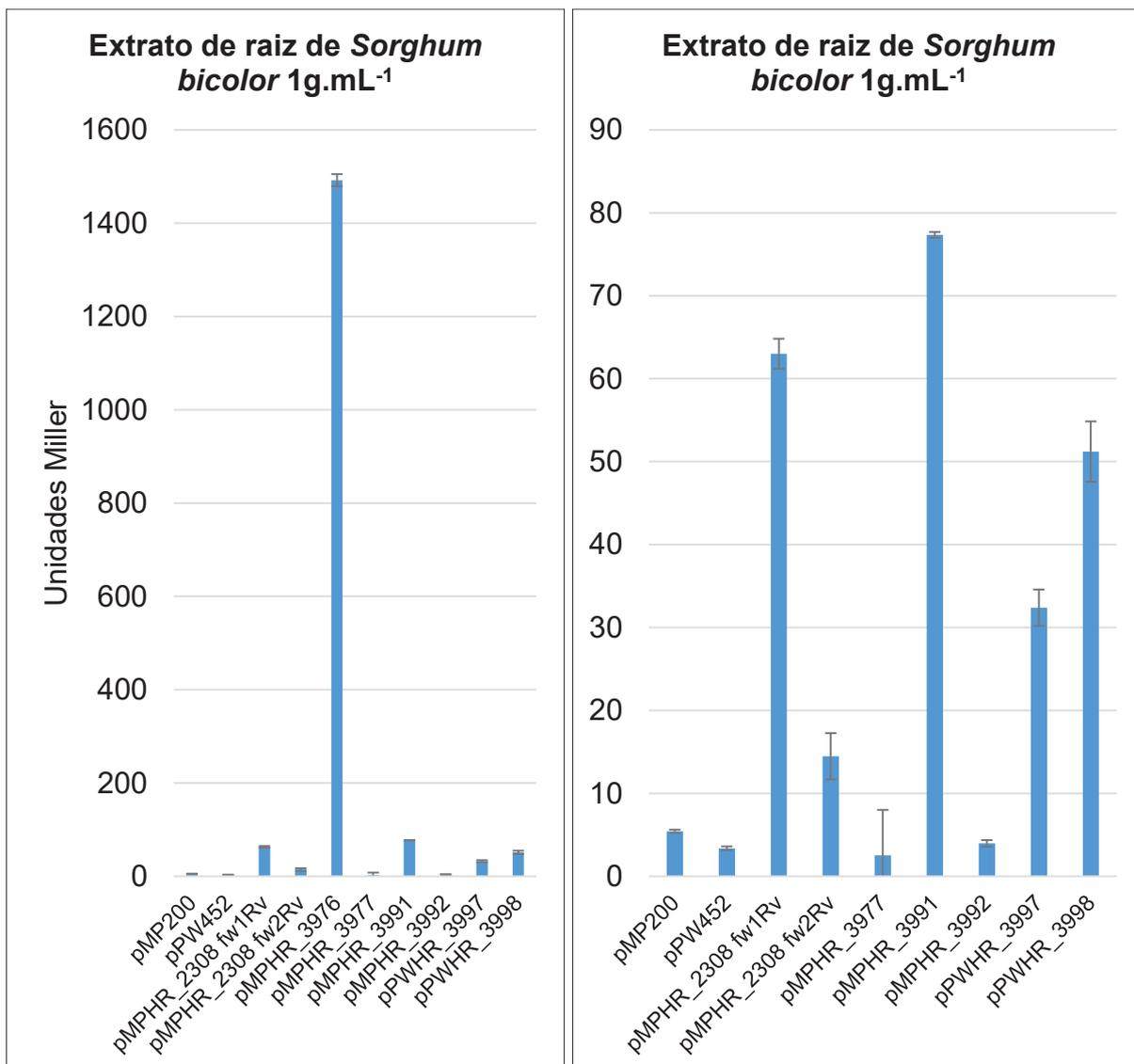


FIGURA 24: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de 1000 mg de extrato de raízes de *Sorghum bicolor*. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP200 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

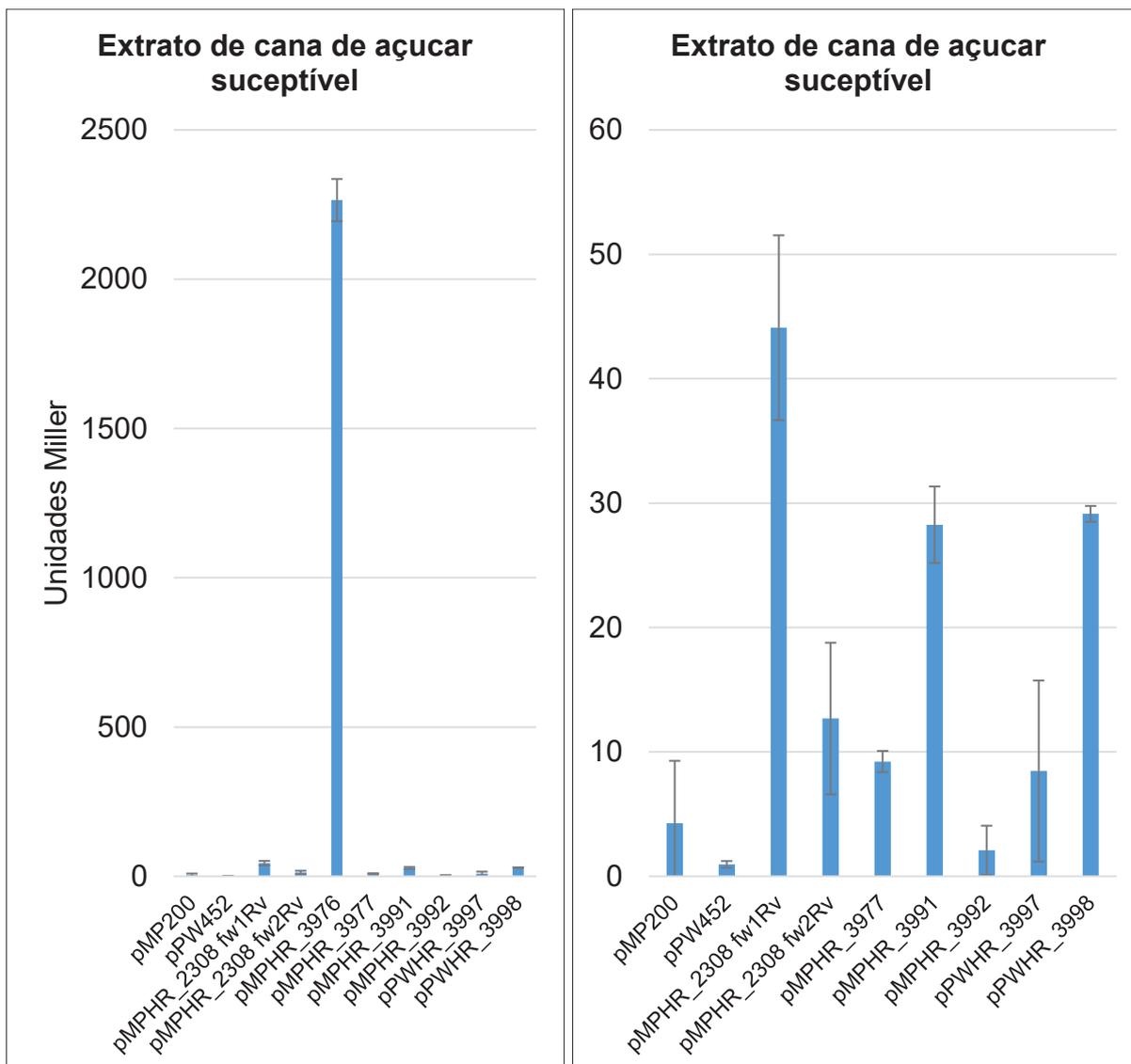


FIGURA 25: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de extrato de cana-de-açúcar susceptível a estria mosqueada. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP200 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

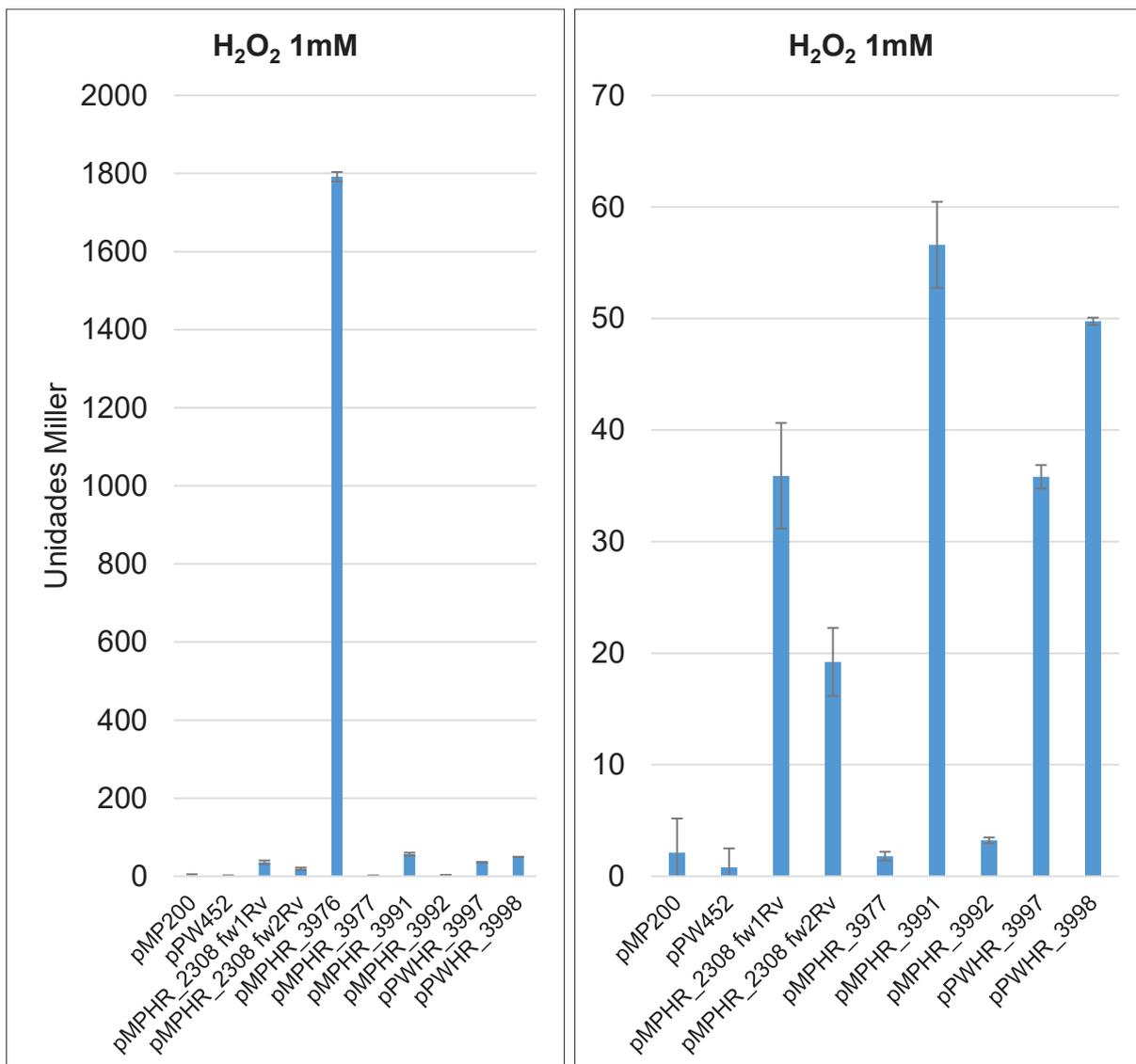


FIGURA 26: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de estresse oxidativo. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

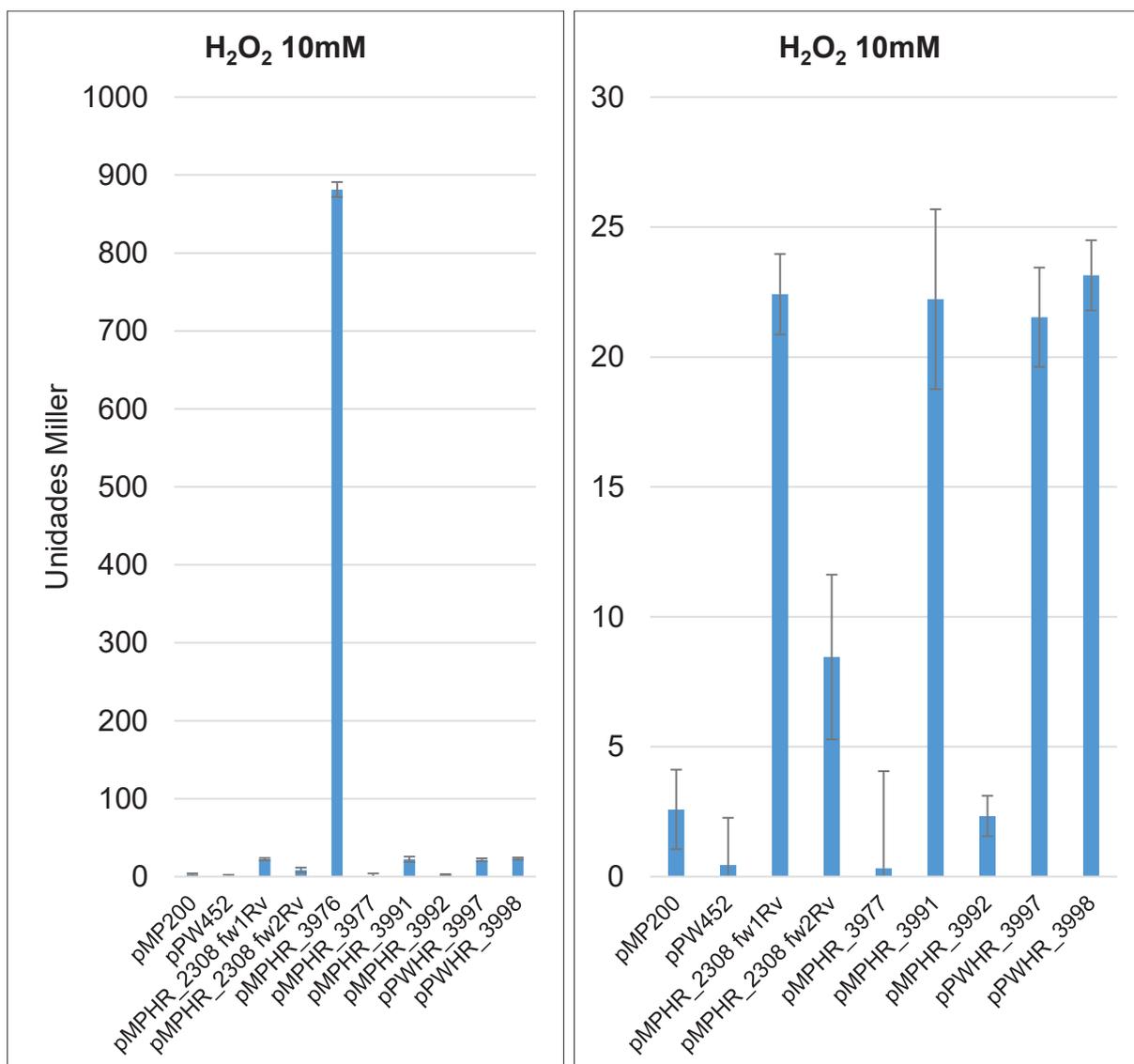


FIGURA 27: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de forte estresse oxidativo. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

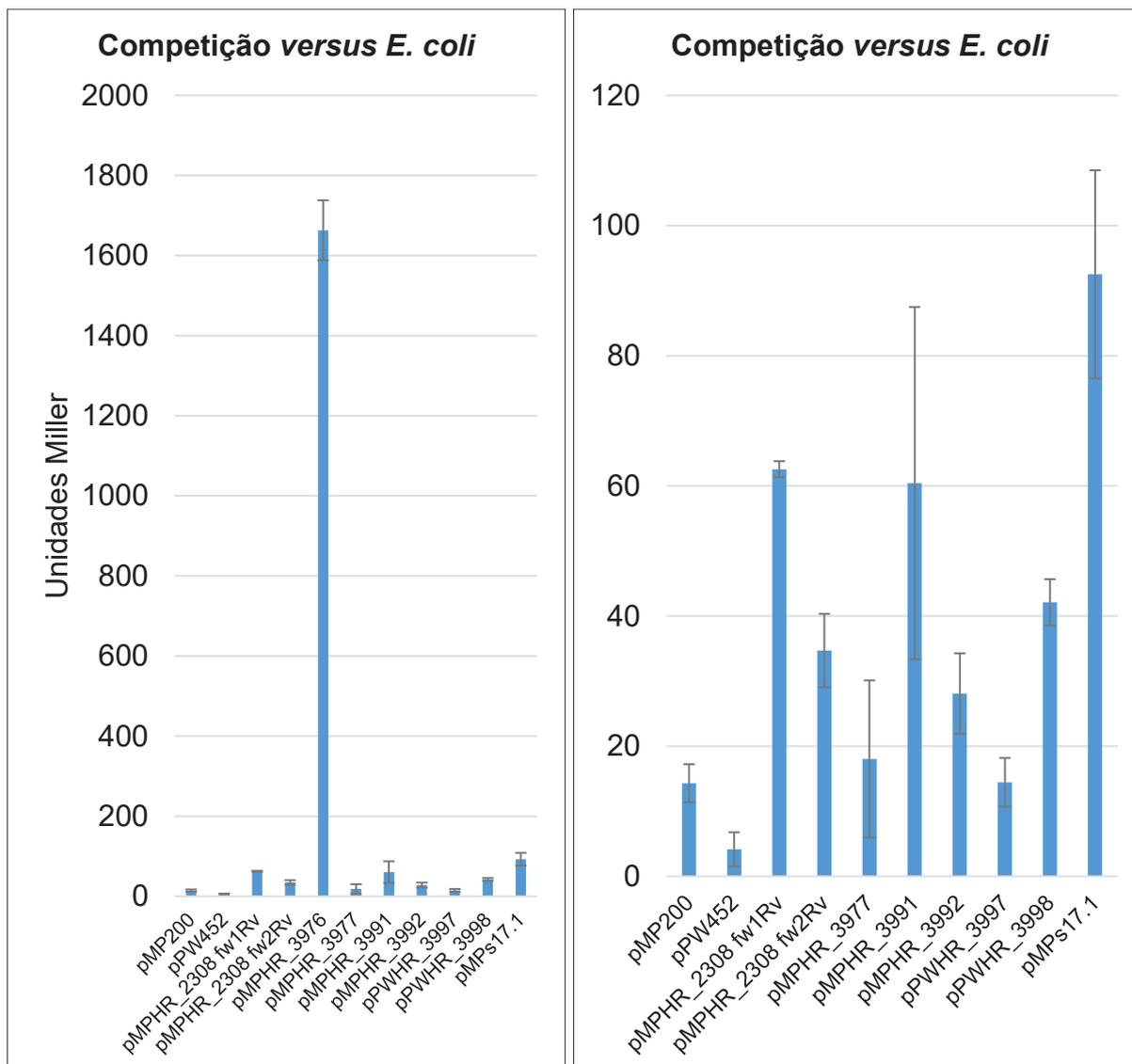


FIGURA 28: Ensaio de expressão gênica dos promotores do T6SS na presença de competição com bactéria não relacionada com o gênero *Herbaspirillum*. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de NfB malato suplementado estéril. Os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão. Devido à alta atividade de β -galactosidase, não foi necessário empregar controle positivo ao ensaio. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

A seguir serão mostrados os resultados referentes às competições diretas entre as estirpes mutantes dos genes que codificam para os T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 e estirpes selvagens de *H. rubrisubalbicans* M1, *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Sp7.

5.4. COMPETIÇÕES DIRETAS ENTRE AS ESTIRPES MUTANTES DO T6SS DE *H. rubrisubalbicans* M1 CONTRA OUTRAS ESTIRPES SELVAGENS.

As estirpes selvagens utilizadas nas competições diretas foram escolhidas levando-se em consideração a presença de proteínas de imunidade (presente em *H. rubrisubalbicans* M1 e ausentes em *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Sp7) e a ativação do sistema T6SS de contra-ataque, presente em *Azospirillum brasilense* Sp7 visto a presença da proteína quinase PpkA que inibe seu T6SS sem que haja estímulo, ao contrario do observado nas espécies do gênero *Herbaspirillum spp.* que estão constitutivamente ativos. Foram feitos os testes: 1 – contra a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1, onde todas as contam com as proteínas de imunidade para as proteínas efetoras, assim testando os efeitos competitivos não tóxicos do T6SS; 2 – contra *H. seropedicae* SmR1, que não conta com proteínas de imunidade contra as estirpes mutantes, avaliando os efeitos de contato e tóxicos da proteínas efetora e 3 – contra *A. brasilense* Sp7, para verificar a ativação do seu T6SS, que sob ataque, passa a ativar esse sistema, possibilitando a verificação funcional dos clusters I e II de *H. rubrisubalbicans* M1 separadamente.

O experimento de competição entre as estirpes selvagens, mostrado nas figuras 29 e 30, servem como controle do fenótipo competitivo, feito contra as estirpes selvagens de *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Sp7, serve como reforço de confirmação de que *H. rubrisubalbicans* M1 é mais competitivo do que *H. seropedicae* SmR1 e para demonstrar tanto que os T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 não contam com formas adicionais de ativação, como observado em *A. brasilense* Sp7. Foi possível demonstrar que *H. rubrisubalbicans* M1 desloca competitivamente *H. seropedicae* SmR1 e é deslocado competitivamente por *A. brasilense* Sp7. Para a competição contra *A. brasilense* Sp7 pode ser observado que a competidora inicia perdendo a competição contra *H. rubrisubalbicans* M1, porém entre 1 e 3 horas, o T6SS de *A. brasilense* passa a ser ativado pela competição e *A. brasilense* Sp7 passa a deslocar competitivamente *H. rubrisubalbicans* M1, evidenciando seu caráter de contra-ataque, característica essencial para caracterizar a função do cluster-I do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1, relacionado com a competição direta de contato e com a supressão do crescimento colonial.

Os experimentos de competição geraram resultados conclusivos para o T6SS-I, sendo possível observar 2 fenótipos importantes: competitividade e a auto-regulação do crescimento da colônia, além de reforçar a ativação do T6SS em *A. brasilense* Sp7 (figuras 41 a 49). Aqui é possível observar que as mutantes Hrubri_3993, 3994 e 3995 não levaram a ativação do T6SS de *A. brasilense* Sp7, devido a falta da estrutura de punção que estimula o processo, reforçando o mecanismo. É possível observar que as estirpes mutantes iniciam sendo deslocadas competitivamente pela estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1, porém apresentam maior contagem no final do experimento, característica que quando associada aos experimentos de geração de sintomas da estria vermelha no sorgo, reforça a hipótese de envolvimento do cluster-II na supressão do crescimento colonial. Por último, a falta da proteína VgrG levou a perda do fenótipo competitivo em relação a estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1, mostrando que a falta da estrutura ponteaguda impossibilita a injeção de proteínas efetoras reacionadas com a competitividade.

Já o para o cluster-II (figuras 31 a 40), as alterações não foram significativas como as observadas nas estirpes mutantes do cluster-I, porém foi possível observar alterações no fenótipo competitivo principalmente na mutante da proteína VgrG (Hrubri_2313), que passou a não deslocar competitivamente a estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1 e passou a ser deslocada pela estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1. Dessa forma, embora esse cluster pareça estar diretamente relacionada com a facilitação da invasão do hospedeiro e no processo-doença, não é possível excluir envolvimento sinérgico de proteínas efetoras associadas a esse VgrG-Rh na competitividade contra outras bactérias

5.4.1. *H. rubrisubalbicans* M1 versus *H. seropedicae* SmR1

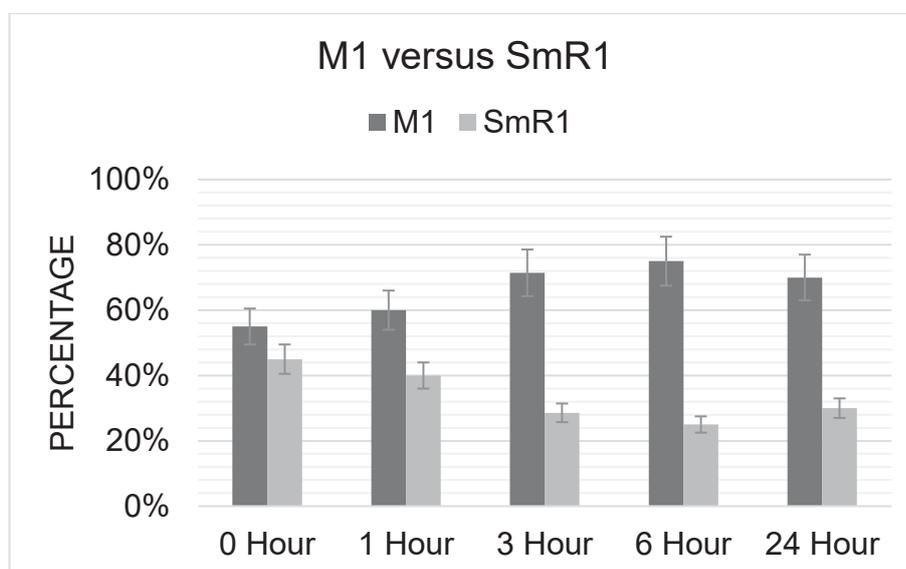


FIGURA 29: Competição direta entre as estirpes selvagens de *H. rubrisubalbicans* M1 e *H. seropedicae* SmR1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. Esse experimento foi feito como controle para os experimentos de competição utilizando as estirpes mutantes do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

5.4.2. *H. rubrisubalbicans* M1 versus *A. brasilense* SP7

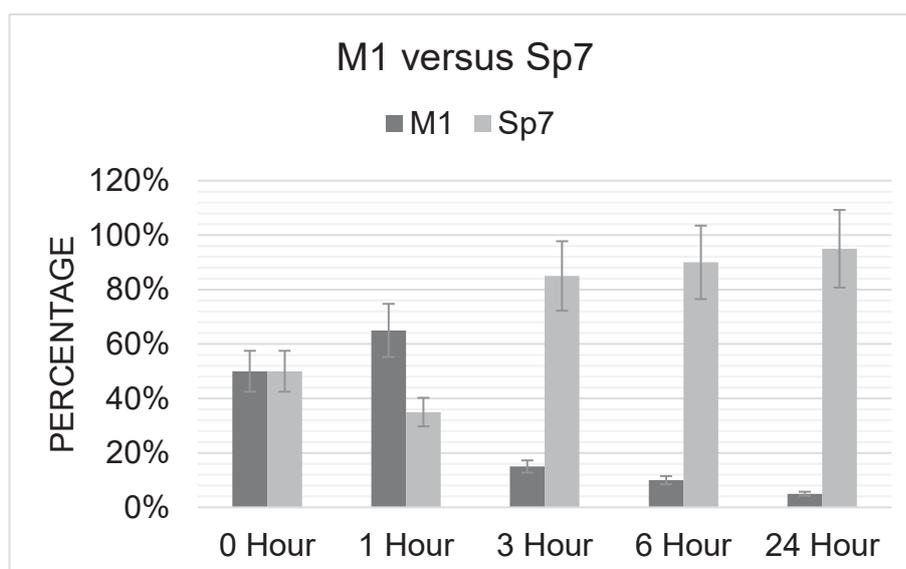


FIGURA 30: Competição direta entre as estirpes selvagens de *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* Sp7. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

5.4.3. Mutante Hrubri_2309 versus estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* Sp7

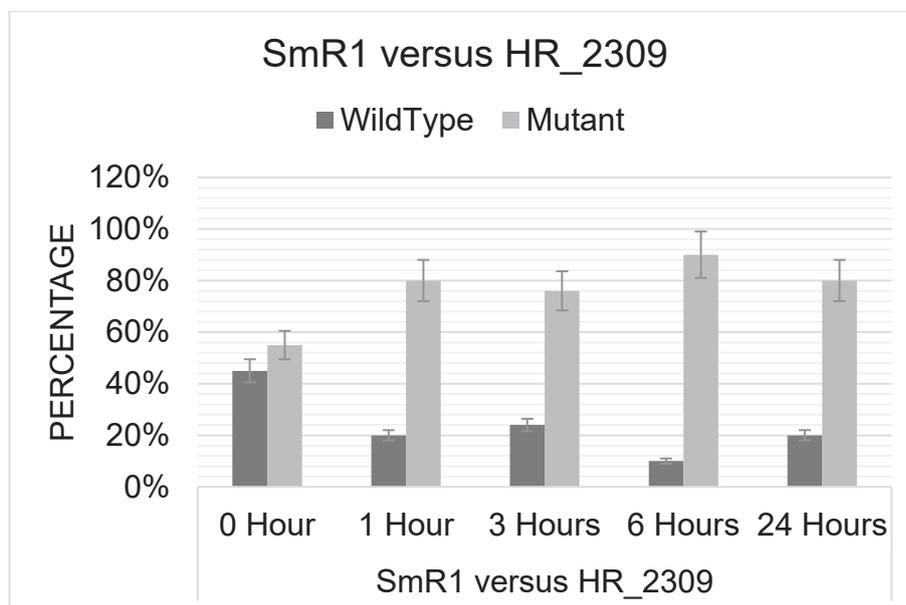


FIGURA 31: Competição entre *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe Hrubri_2309 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

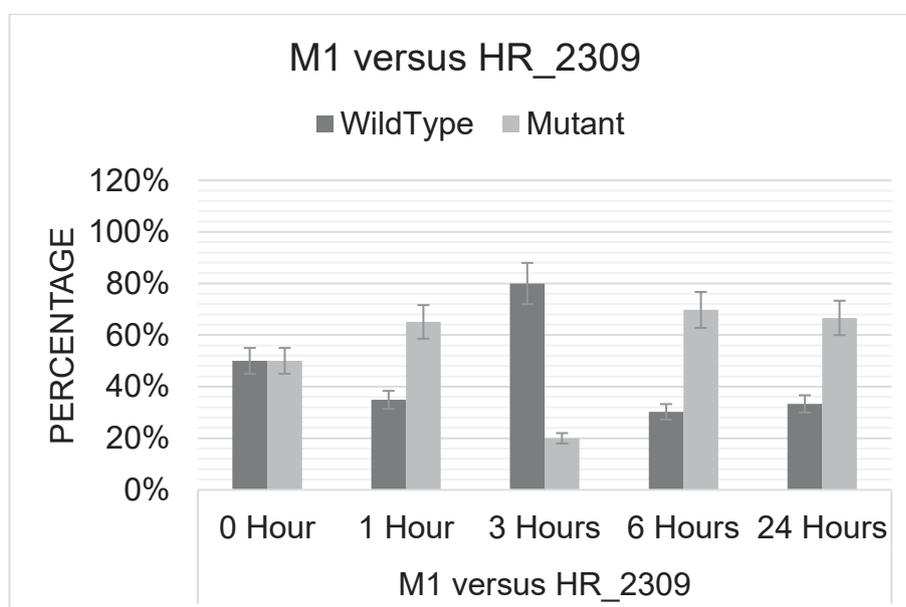


FIGURA 32: Competição entre *H. rubrisubalbicans* M1 e a estirpe Hrubri_2309 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

5.4.4. Mutante Hrubri_2312 versus estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* Sp7

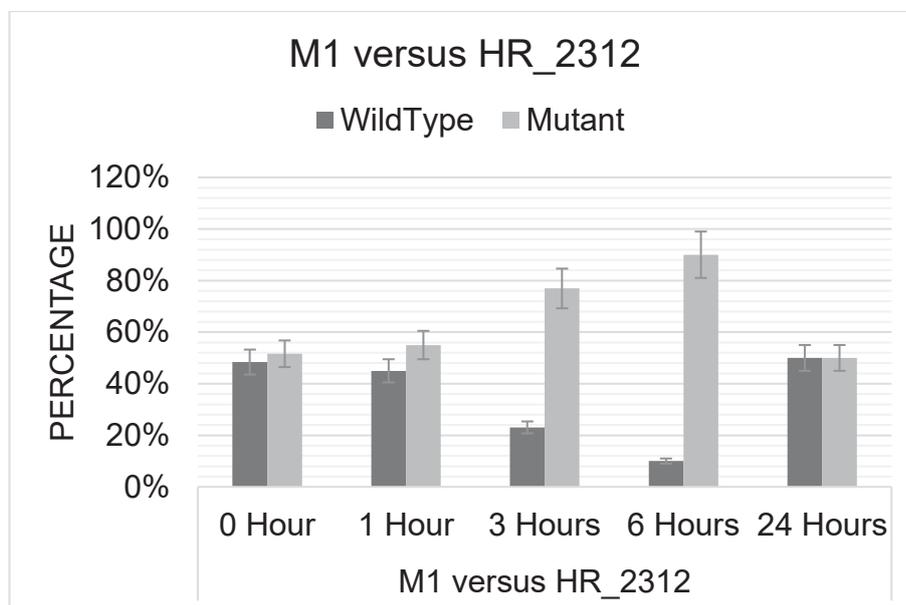


FIGURA 33: Competição entre *H. rubrisubalbicans* M1 e a estirpe Hrubri_2312 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

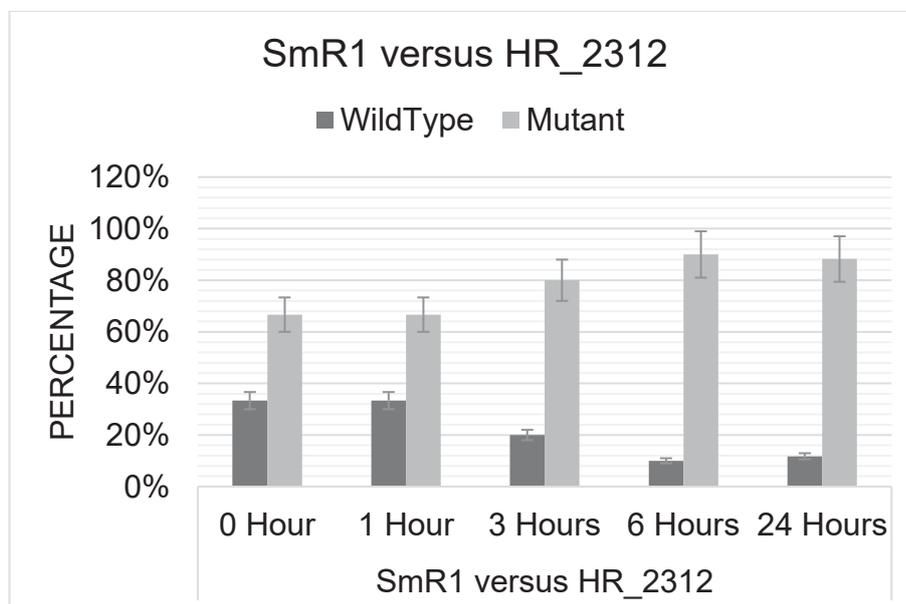


FIGURA 34: Competição entre *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe Hrubri_2312 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

5.4.5. Mutante Hrubri_2313 versus estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* Sp7

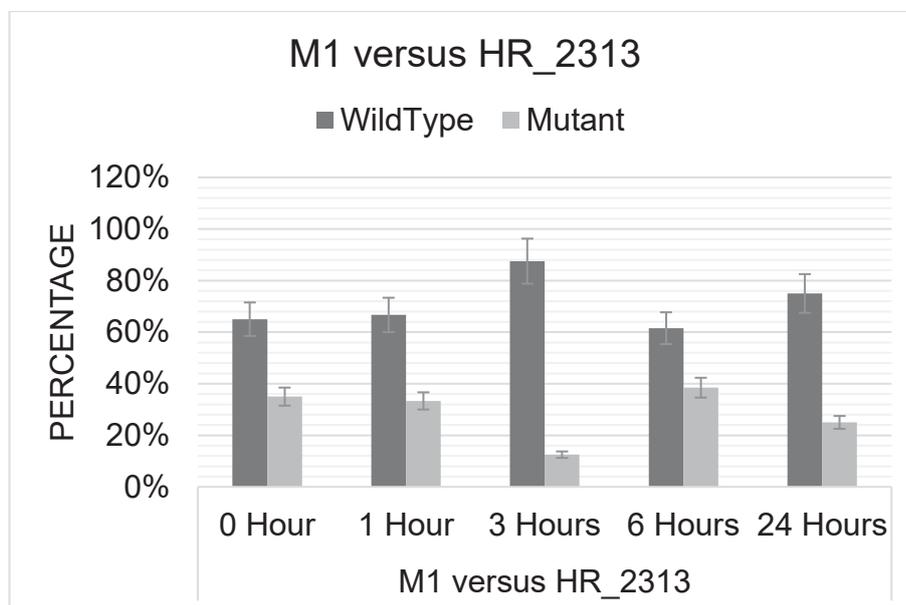


FIGURA 35: Competição entre *H. rubrisubalbicans* M1 e a estirpe Hrubri_2313 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

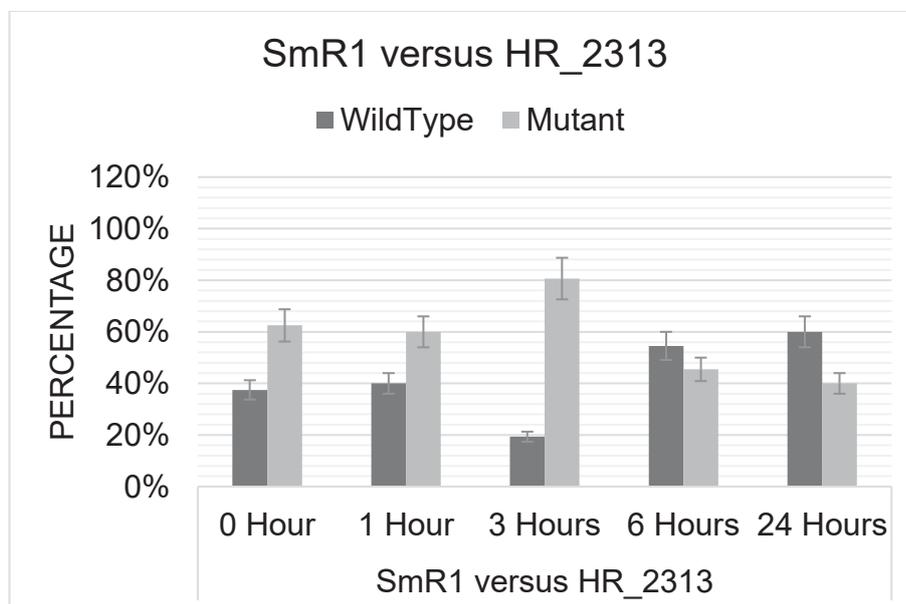


FIGURA 36: Competição entre *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe Hrubri_2313 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

5.4.6. Mutante Hrubri_2319 versus estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* Sp7

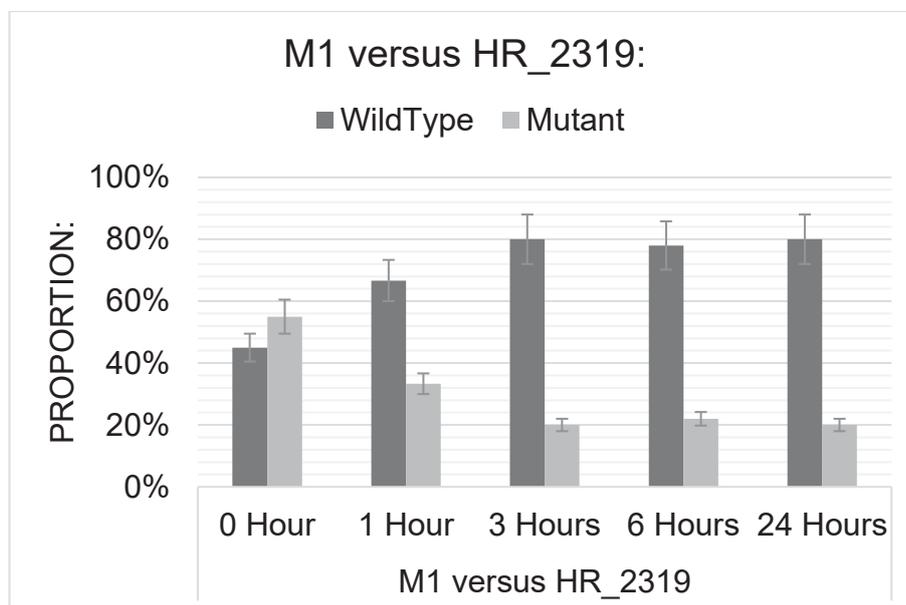


FIGURA 37: Competição entre *H. rubrisubalbicans* M1 e a estirpe Hrubri_2319 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

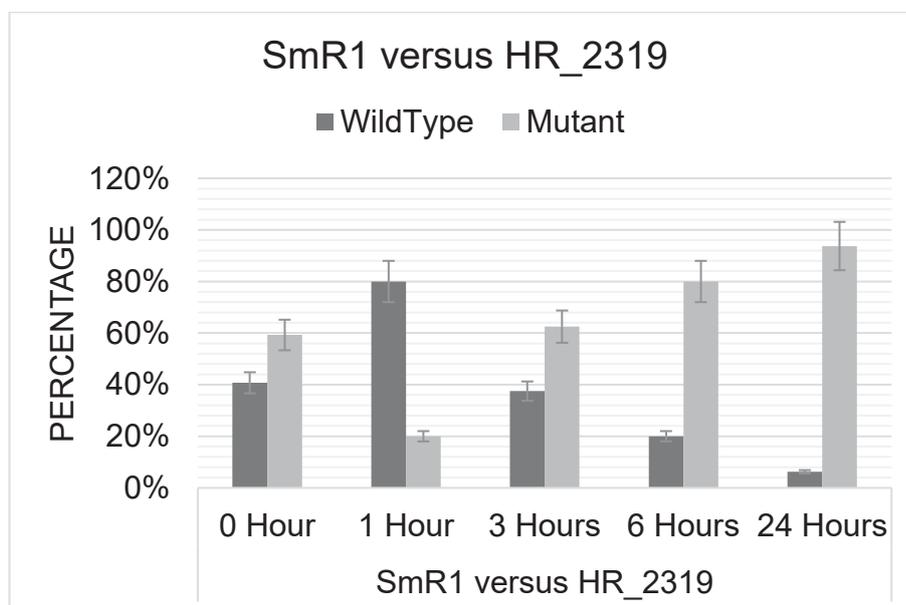


FIGURA 38: Competição entre *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe Hrubri_2319 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

5.4.7. Mutante Hrubri_2320 versus estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* Sp7

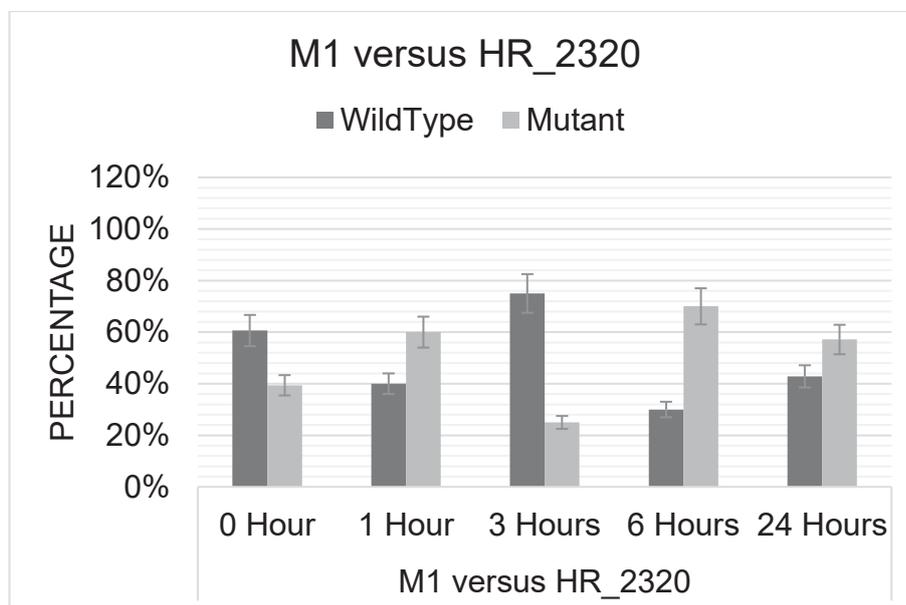


FIGURA 39: Competição entre *H. rubrisubalbicans* M1 e a estirpe Hrubri_2320 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

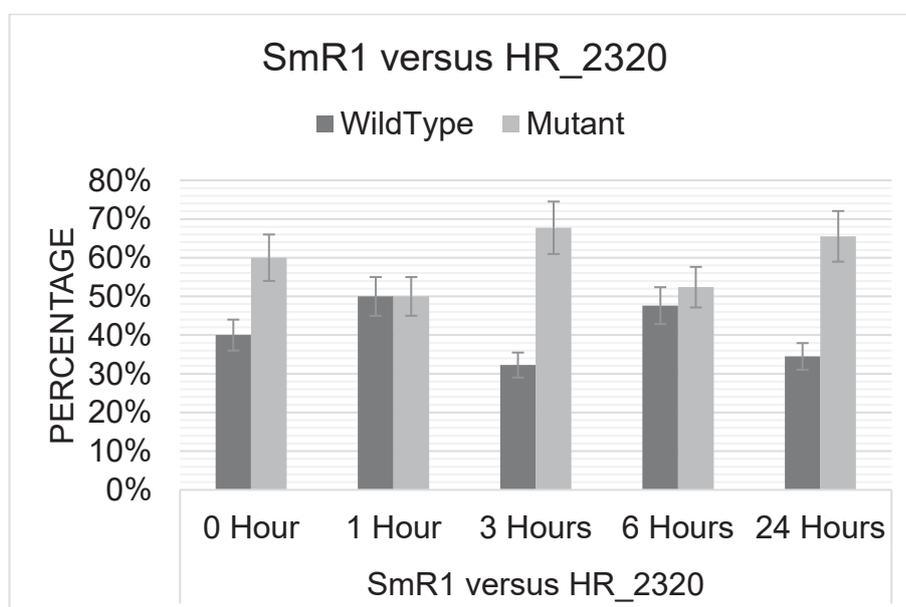


FIGURA 40: Competição entre *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe Hrubri_2320 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

5.4.8. Mutante Hrubri_3993 versus estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* Sp7

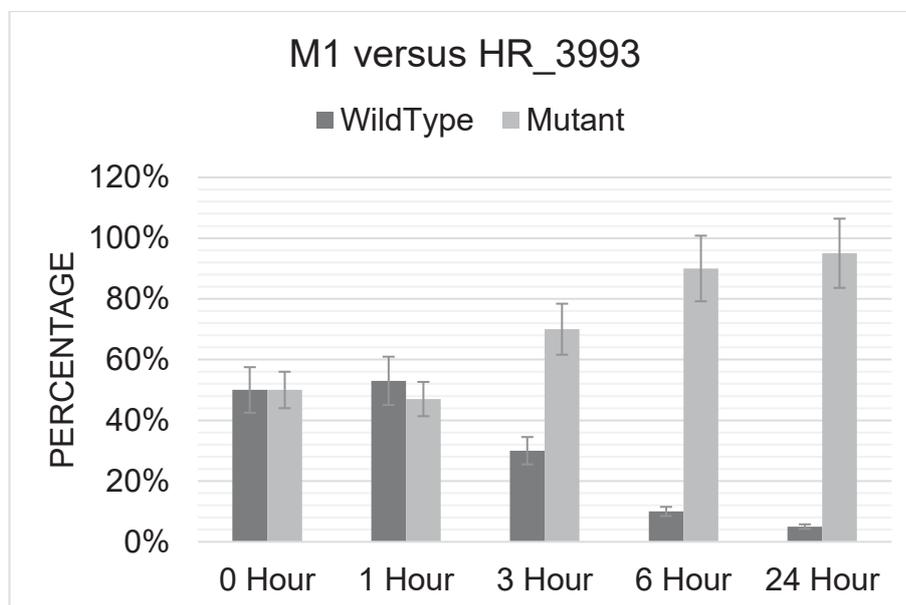


FIGURA 41: Competição entre *H. rubrisubalbicans* M1 e a estirpe Hrubri_3993 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

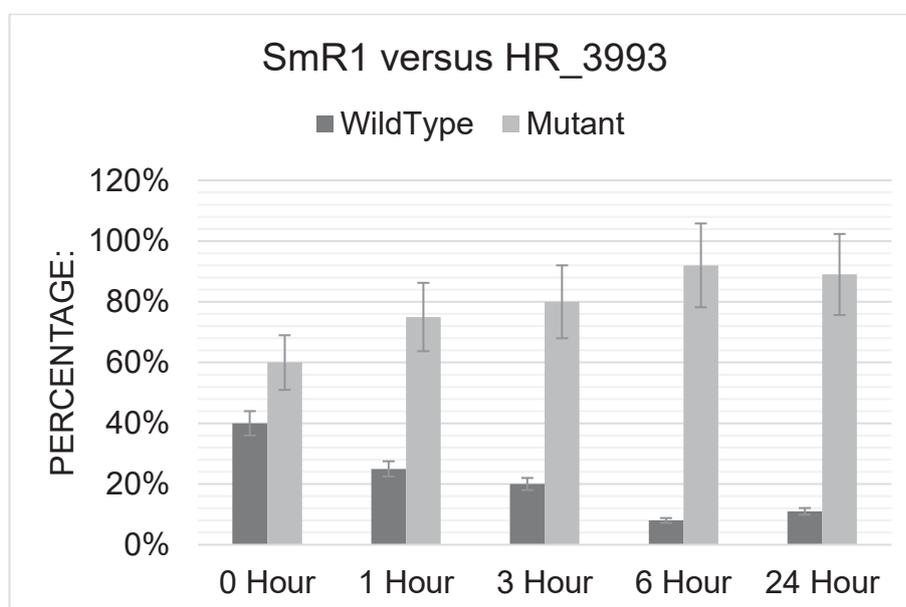


FIGURA 42: Competição entre *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe Hrubri_3993 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

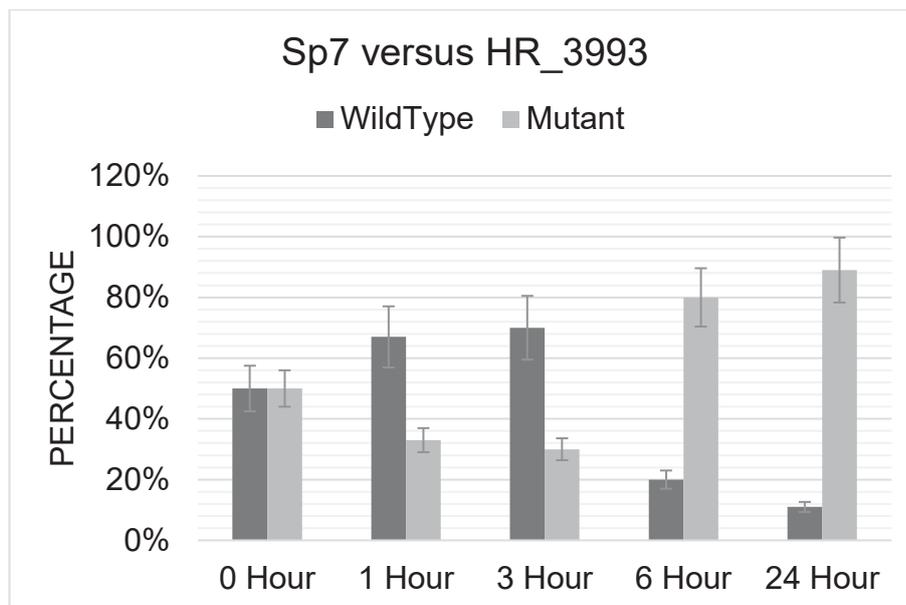


FIGURA 43: Competição entre *A. brasilense* FP2 e a estirpe Hrubri_3993 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

4.20.9. Mutante Hrubri_3994 versus estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* SP7

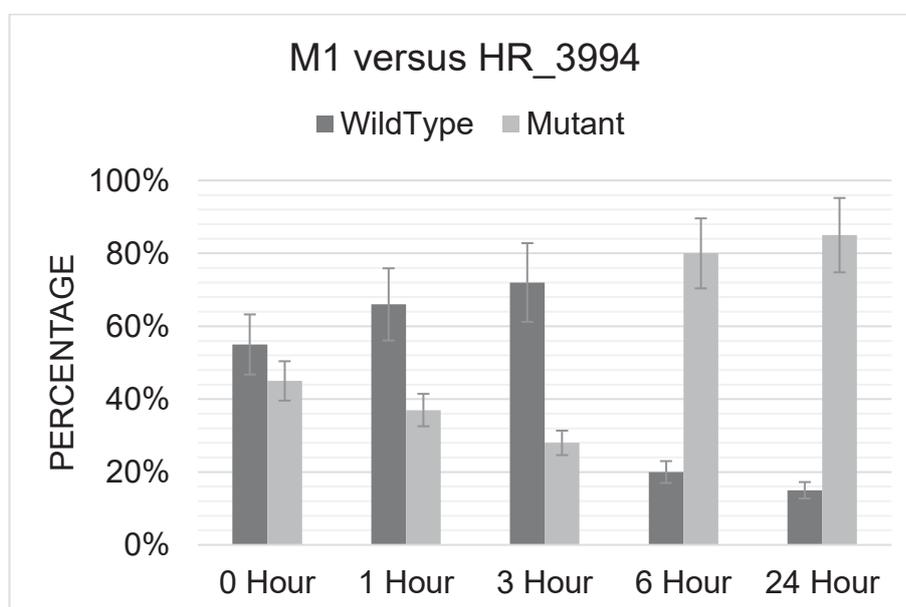


FIGURA 44: Competição entre *H. rubrisubalbicans* M1 e a estirpe Hrubri_3994 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

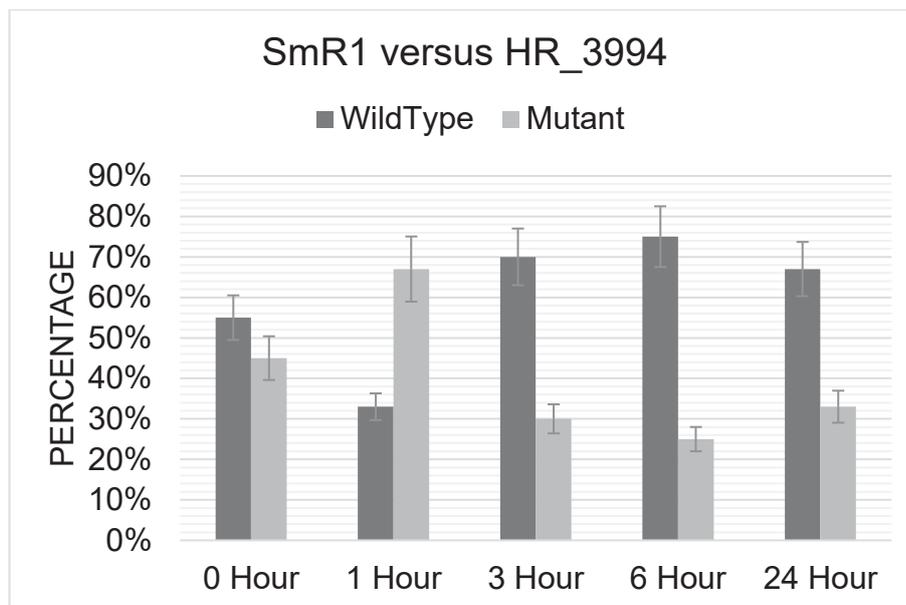


FIGURA 45: Competição entre *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe Hrubri_3994 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

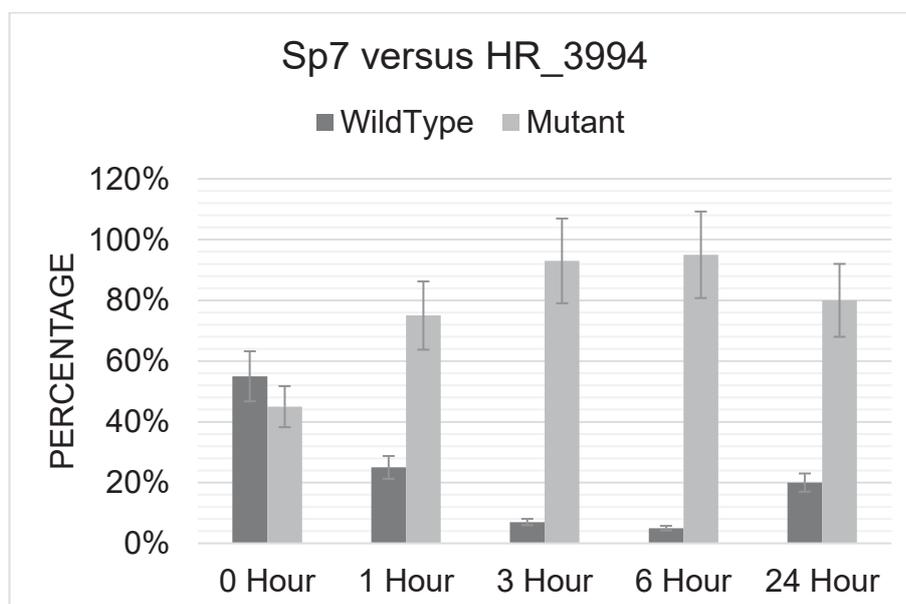


FIGURA 46: Competição entre *A. brasilense* FP2 e a estirpe Hrubri_3994 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

4.20.10. Mutante Hrubri_3995 versus estirpes mutantes de *H. seropedicae* SmR1, *H. rubrisubalbicans* M1 e *A. brasilense* Sp7

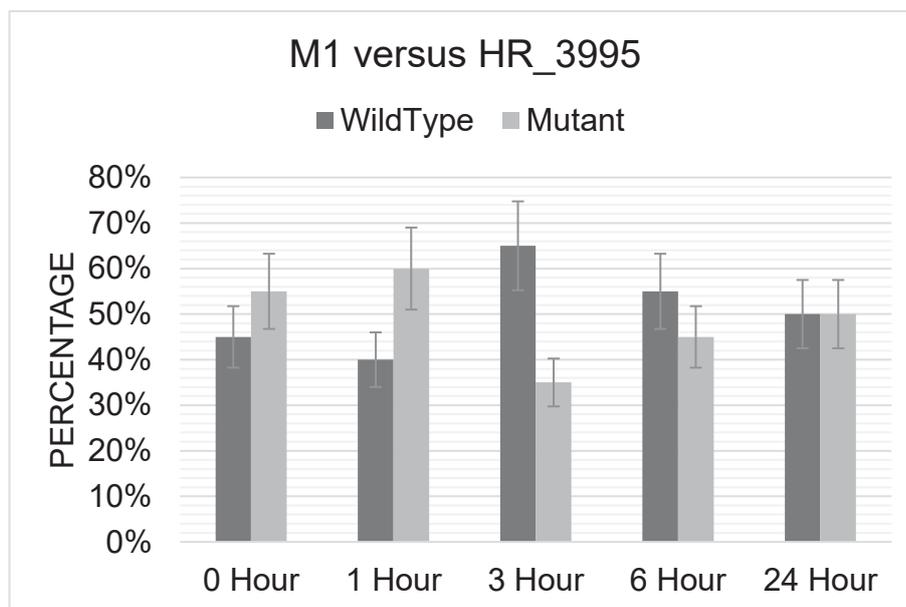


FIGURA 47: Competição entre *H. rubrisubalbicans* M1 e a estirpe Hrubri_3995 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

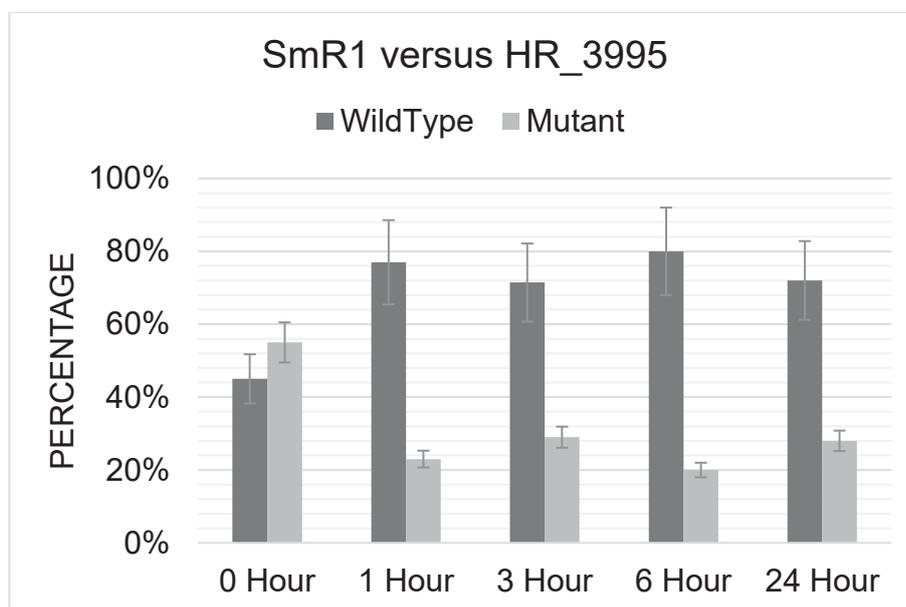


FIGURA 48: Competição entre *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe Hrubri_3995 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

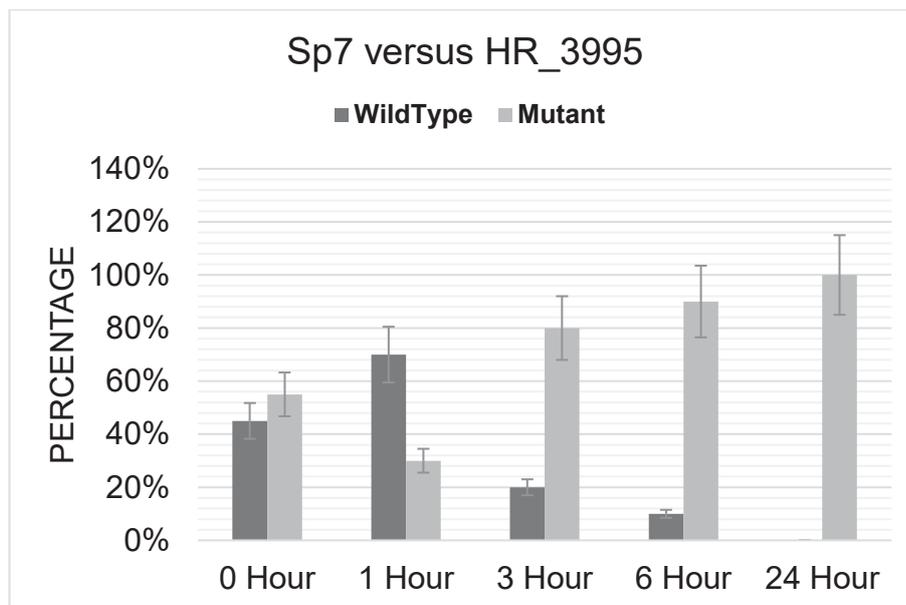


FIGURA 49: Competição entre *A. brasilense* FP2 e a estirpe Hrubri_3995 do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Experimento realizado em 3 octuplicatas em cultivo estático em placa de 96 poços. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

5.5. ESTUDOS REALIZADOS NO INSTITUTO JAMES HUTTON DURANTE O DOUTORADO SANDUÍCHE

Durante o doutorado sanduíche realizado no instituto James Hutton (Invergowrie, Escócia/ Reino Unido) sob supervisão do professor Euan K. James. Avaliamos diversas estirpes por microscopia eletrônica de transmissão e auxiliiei James na caracterização da ultraestrutura e no fenótipo de motilidade de 4 estirpes endofíticas, sendo 3 isoladas pelo grupo de pesquisa na Escócia (*Herbaspirillum seropedicae* 322 isolado de *Miscanthus spp.*; *Herbaspirillum frisingense* 970 e *Azoarcus indigenes* TTM91) mais a estirpe selvagem de *Azoarcus indigenes* VB32-T isolado pelo grupo de pesquisa da professora Barbara Hurek.

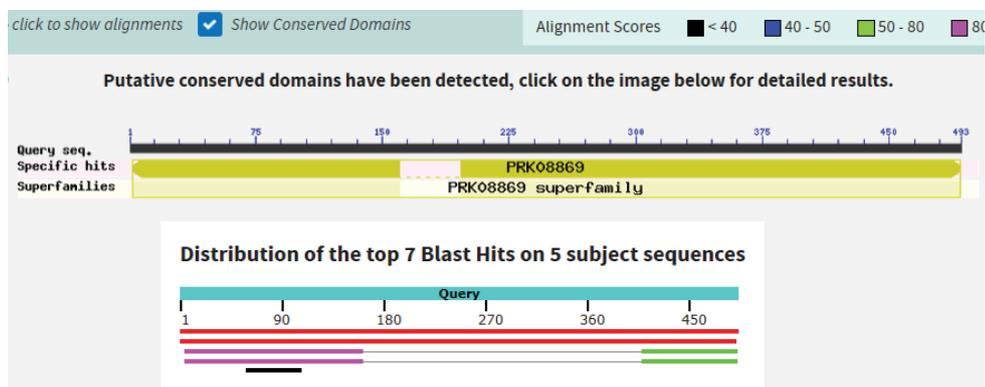
Dessas estirpes apenas *Azoarcus indigenes* VB32-T e TTM91 contavam com genomas sequenciados. A estirpe TTM91 conta com apenas 71% de cobertura do genoma.

5.5.1. Análise “*in silico*” de genes envolvidos na motilidade em *Azoarcus indigenes* VB32T e *Azoarcus indigenes* TTM91.

5.5.1.1. *Azoarcus indigenes* VB32-T

A estirpe padrão VB32-T pode não apresentar genes *fliC* em seu genoma. Dos quatro genes que apresentam homologia, os 4 parecem estar relacionados com ancoragem proteína, sendo 2 presentes a família *flg*.

| Sequences producing significant alignments | | | | | | | Download | Manage Columns | Show | 100 | ? |
|---|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|--------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> select all 5 sequences selected | | | | | | | GenPept | Graphics | Distance tree of results | Multiple alignment | |
| | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | flagellin [Azoarcus indigenes] | 524 | 524 | 100% | 0.0 | 57.64% | WP_133593504.1 | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | flagellin [Azoarcus indigenes] | 521 | 521 | 99% | 0.0 | 56.75% | WP_133593508.1 | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Lateral flagellin [Azoarcus indigenes] | 119 | 119 | 32% | 4e-31 | 41.82% | WP_133587986.1 | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Lateral flagellin [Azoarcus indigenes] | 115 | 115 | 32% | 7e-30 | 41.67% | WP_133587988.1 | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | methyl-accepting chemotaxis protein [Azoarcus indigenes] | 28.1 | 28.1 | 9% | 2.5 | 38.46% | WP_133588379.1 | | | | |



Function Alignment

COG KOG Pfam

Filter column: COG ID Filter text: Apply

Export Page 1 of 1 << first < prev 1 next > last >> All

Column Selector

| Gene ID | COG ID | COG Name | Consensus Sequence Length | Percent Identity | Query Start | Query End | Alignment On Query Gene | Bit Score | Genome |
|----------------------------|-------------------------|----------|---------------------------|------------------|-------------|-----------|-------------------------|-----------|--|
| 2756648025 | COG1344 | | | 29.55 | 2 | 284 | | 110 | Azoarcus indigenes DSM 12121 |
| 2756648026 | COG1344 | | | 30.58 | 2 | 285 | | 110 | Azoarcus indigenes DSM 12121 |
| 2756650839 | COG1344 | | | 36.61 | 3 | 256 | | 128 | Azoarcus indigenes DSM 12121 |
| 2756650837 | COG1344 | | | 39.03 | 5 | 271 | | 127 | Azoarcus indigenes DSM 12121 |

FIGURA 50: Alinhamento de seqüências de *Azoarcus indigenes* TT-132

5.5.1.2. *Azoarcus indigenes* TTM91

Foram encontrados 2 genes *fliC*, ambos codificam flagelinas tipo B. o gene AI_01143, codifica fliC1 uma flagelina tipo B, de sequência:

```
"MAQTINTNIQSLNAQRNLNNSNSLQTSLQRLSSGLRINSAKDDAAGLAISERFTSQIRGLD
QATRNANDGISLSQTAEAAALQSSGDILQRIRELSVQSANATNSAGDRAALNSEVQQLTQELQ
RIATTTFFNGQKLLDGSFTAATFQVGANANQTITATSGNFQTNAYGNYRVGGLTVSAKTQT
GTGDLVRGSNADGQLTTATTGASSAITGDTITISSSLGSKDISYSSGASAEIEIAAKINQAQAG
VTASANTTFVLGAGDASSGAFTQGQSYTFLLATDTTAGADPSSYTTVSFSIGGSSTGTAAAN
ASQLASAVQAFNDVSGKTGFVAKIVEADDGSFGLQITSEAGKDLRITNASVDSSGAGVDVSL
NDIRVIDGDTANDGSAIAGGTIAGVTDASTWSSTSAAWITGQVILDSDRSFSLKTNKAEITTT
SGTFGGQLQSVDKMDVSTVEAANRTLAMVDSALSAVNAQRARYGALQSRFESTISNLQAS
SENLSASRSRIRDADFAAETANLTRAQILQQAGTAMLSQANALPQNVLSLLG"
```

E o gene AI_01145, codifica fliC2, de sequência:

```
"MAQVISTNIQSLNAQRNLNNSANSLSLQTSLQRLSSGLRINSAKDDAAGLAISERFTSQIRGLD
QAARNANDGISLAQTAEAAALQSSGDILQRIRELSIQSANATNSAGDRAALNAEVQQLTQELQ
RIATNTEFNGQKLLDGSFTAATFQVGANANQTITATSGNFQVDAYGNYRVGGLATSTNTPN
GVGDLVVGSAVQAGQLSTAVAGSSSGIAGDTITLSSSLGSKEITYSAGASAESIAAKINQAGTG
VRASANTTFVLGAGSTGSFTQGQSYTFMLANDTTSGVDPSSYTTVSFTIGGAATGQGASNA
SQLSSAVQAFNDVAGKTGFVAKIVEADDGTLGVMLTSEVGKDLRITNTSVDSSGAGVDVSL
NDIRVMDGDTTNDGAAAMNGGSIVGVTNAAWSSGSSAWITGQLILDSDRSFSLTTTTDDTLI
SSGTFGGQLQATGRMDISTVEAANRTLSIVDSALAAINNQRARYGALQSRFENTISNLQSTS
ENLSASRSRIRDADFAAETANLTRAQILQQAGTAMLAQANQIPQQVLQLLQG"
```

5.5.2. Micrografias das estirpes estudadas no instituto James Hutton

5.5.2.1. *Herbaspirillum seropedicae* 322

Estirpe isolada das raízes de *Miscanthus spp.* pelo grupo do professor Euan K. James. A FIGURA 51 mostra a estrutura dessa estirpe, onde "B" mostra flagelos e "C" mostra os grânulos de reserva energética.

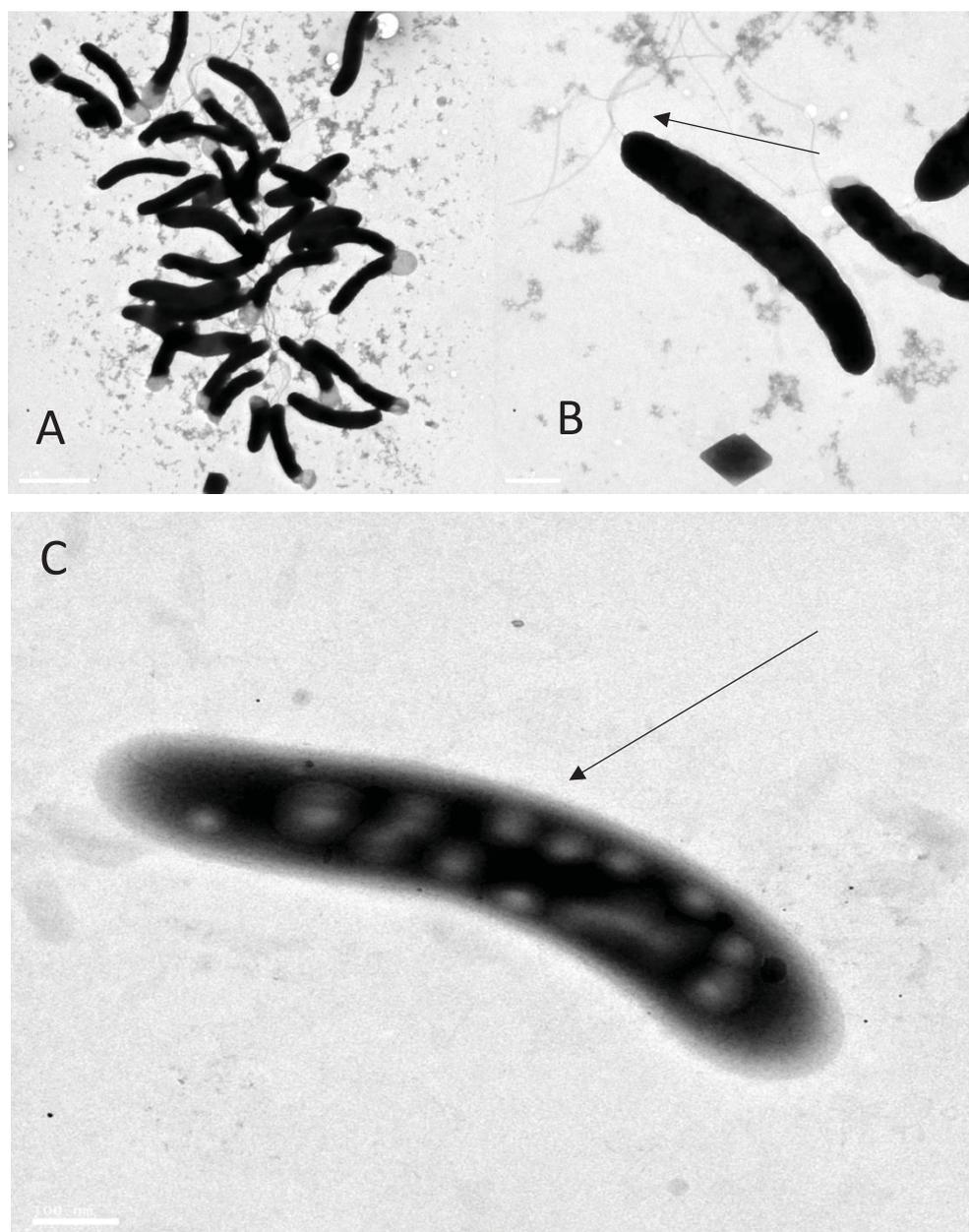


FIGURA 51: Micrografia feita via TEM de *Herbaspirillum seropedicae* 322. A amostra estava fixada em tampão cacodilato 0,2M contendo 2,5% de glutaraldeído. Foi corada com 0,5% de acetato de molibdênio. “A” mostra um agregado, “B” mostra flagelos e “C” mostra grânulos de PHB.

A estirpe 322 apresentou grânulos maiores do que os observados em *H. seropedicae* SmR1, nas mesmas condições de cultivo. Uma característica curiosa é que flagelos não foram observados em bactérias isoladas. Essa estirpe contou com notável fenótipo de motilidade envolvida com a estrutura flagelar (principalmente “swimming” e “swarming” mostradas nas FIGURAS 198, 199 e 200).

5.5.2.2. *H. frisingense* 970

Herbaspirillum frisingense 970, estirpe da coleção do professor Euan K. James é um bacilo mais comprido do que *H. seropedicae* SmR1/322 e *H. rubrisubalbicans* M1. A FIGURA 52 (A) mostra um bacilo com aproximadamente 5 μM (a barra de referência representa 1 μM). Essa bactéria forma agregados coesos, como mostrado na FIGURA 52 (B), com aparente muco e não foi possível observar flagelos em TEM, podendo explicar o perfil de motilidade reduzido em relação as estirpes de *H. seropedicae*.

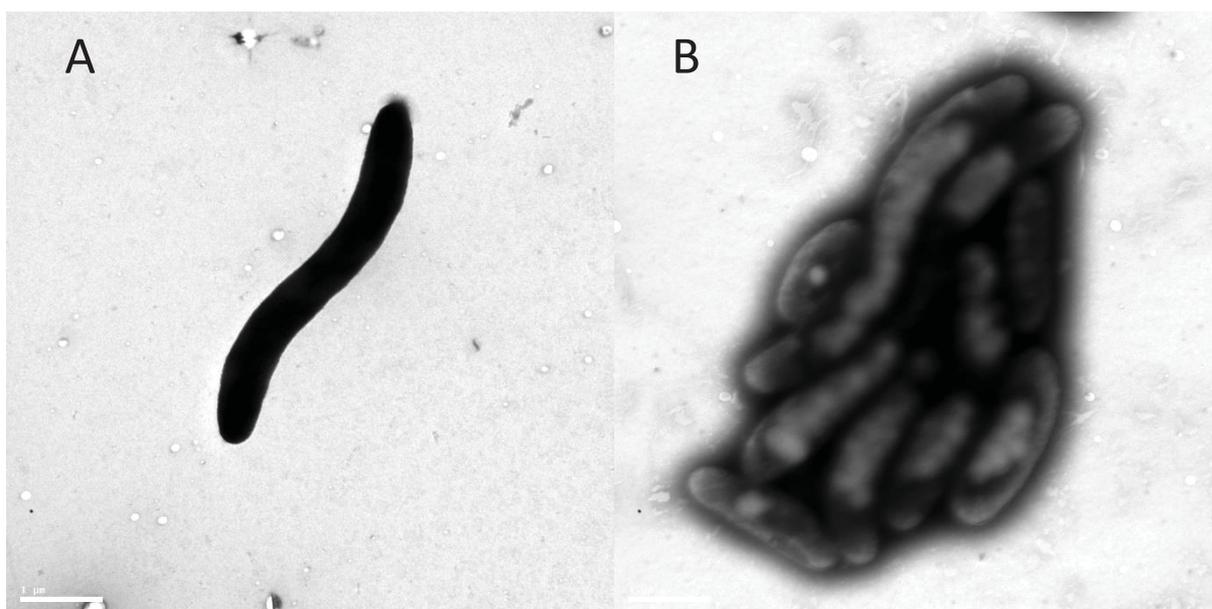


FIGURA 52: Micrografia feita via TEM de *Herbaspirillum frisingense* 970. A amostra não fixada. Foi corada com 0,5% de acetato de molibdênio. “A” mostra o comprimento do bacilo e “B” mostra agregados. Analisado em JEOL 1400 sob 80kV de tensão. A barra de referência representa 1 μm

A característica mais marcante dessa estirpe diz respeito aos granulo de acumulo energético, mostrados na FIGURA 53.



FIGURA 53: Micrografia feita via TEM de *Herbaspirillum frisingense* 970. A amostra não foi fixada. Foi corada com 0,5% de acetato de molibdênio. As setas mostram os grânulos de acumulo de energia. Analisado em JEOL 1400 sob 80kV de tensão. A barra de referência representa 1 μ m.

5.5.2.3. *Azoarcus indigenes* VB32-T

Azoarcus indigenes VB32T (REINHOLD-HUREK *et al.*, 1993) é a estirpe selvagem dessa espécie e assim como *H. seropedicae* é uma Betaproteobacteria endofítica fixadora de nitrogênio. São bacilos delicados, comumente observados em duplas (FIGURA 54-B), ligados uma a outra por um dos polos. É uma bactéria curta que dificilmente ultrapassa 2 μ m. Foi a única estirpe onde foi possível observar pilus (FIGURA 54-A), estrutura delicada, com espessura de poucos nanômetros e comprimento de até 1 μ m. Essa bactéria não apresentou flagelos, na FIGURA 54-C, porém é possível observar forte adesão a película e grande produção de muco. A seta vermelha mostra uma deformidade na película de piroxilina.

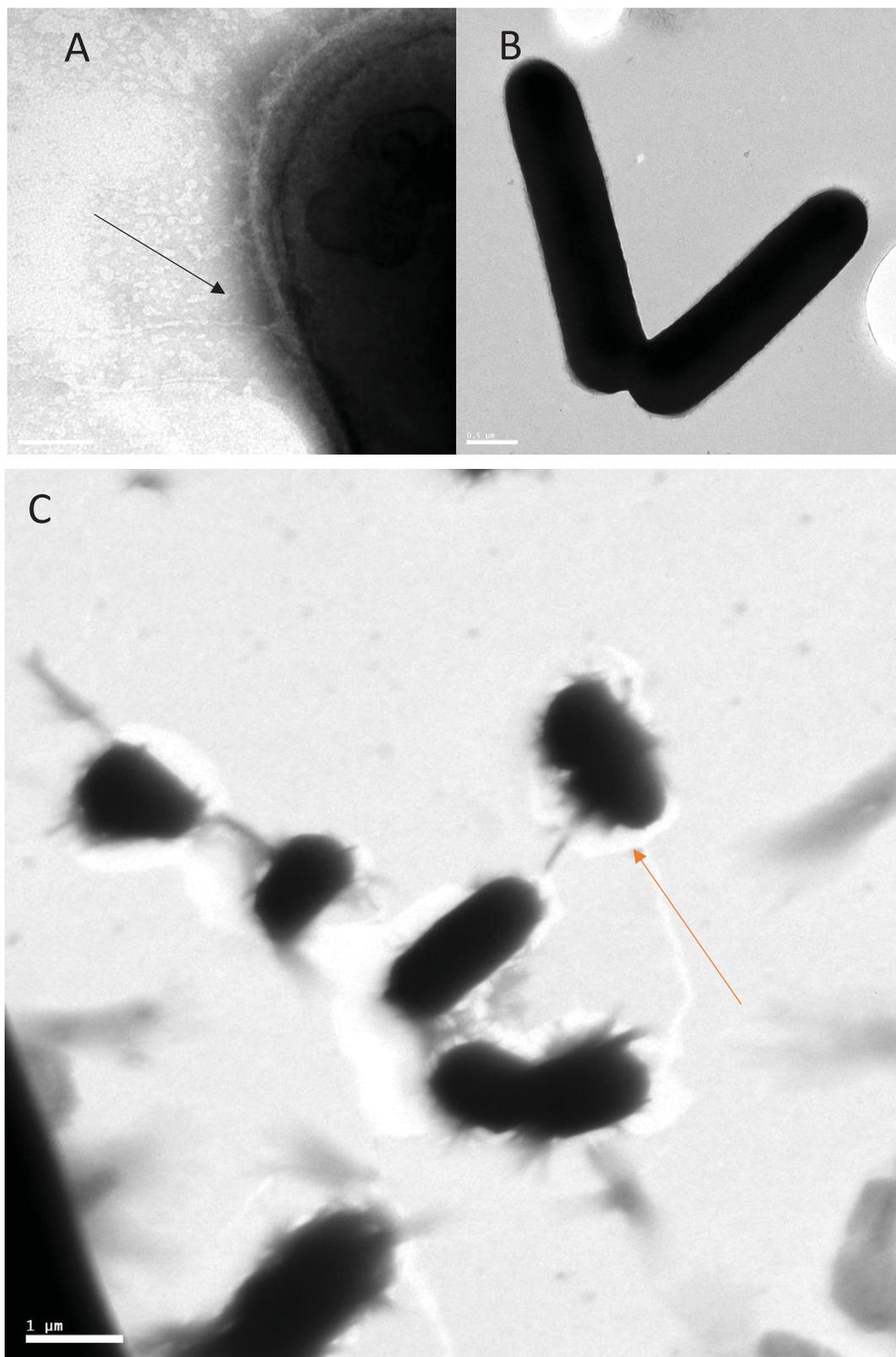


FIGURA 54: Micrografia feita via TEM de *Azoarcus indigenus* VB32T. A amostra não foi fixada. Foi corada com 0,5% de acetato de molibdênio. “A” mostra pili tipo IV, “B” mostra arranjo em duas bactérias comumente observado e “C” mostra uma bactéria típica. A barra de referência em “C” representa 1μm.

5.5.2.4. *Azoarcus indigens* TT-142

Bacilo delicado, dificilmente ultrapassa 1 μm de comprimento. Assim como *Azoarcus indigens* VB32T, é comumente observado formando duplas através do contato dos polos celulares. Ao contrário da estirpe selvagem, apresenta flagelos, podendo apresentar mais de um. Não foi possível observar pilus, embora conte com o cluster completo. Ambas estirpes de *Azoarcus indigens* produzem grandes quantidades de muco, observadas nas FIGURAS 55-C e 55-A.

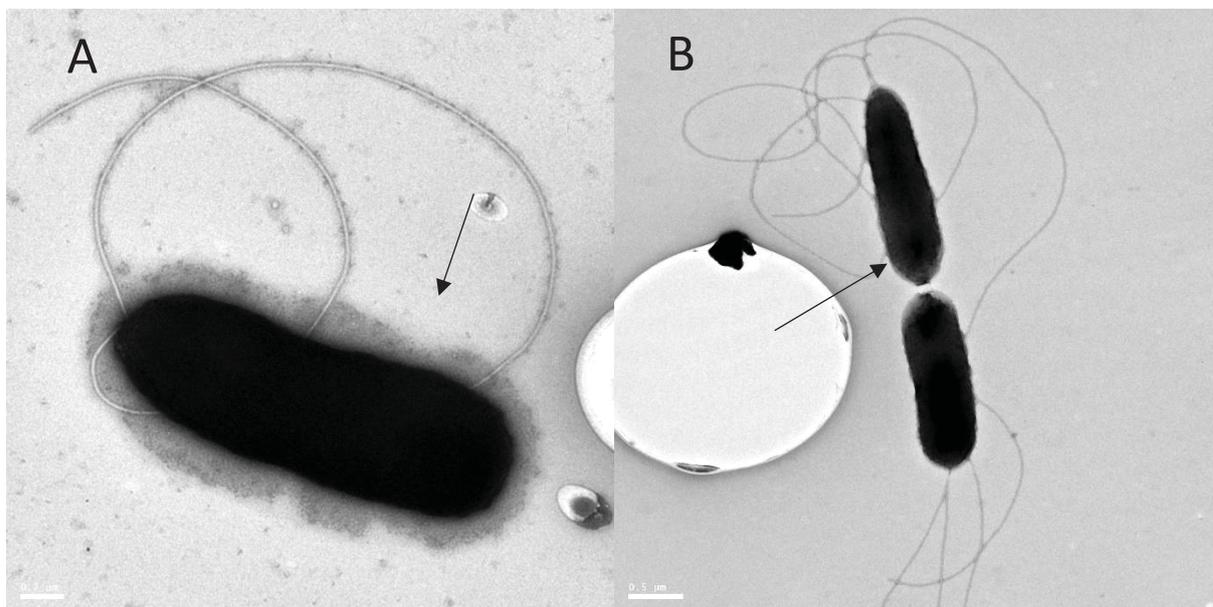


FIGURA 55: Micrografia feita via TEM de *Azoarcus indigens* TT-142. A amostra não foi fixada. Foi corada com 0,5% de acetato de molibdênio. “A” mostra camada de muco, “B” mostra arranjo em duas bactérias comumente observado. A barra de referência em “b” representa 0,3 μm .

5.5.3. ENSAIOS DE MOTILIDADE

Fizemos análise dos genomas das estirpes de *Azoarcus indigens*. Elas foram condizentes com os resultados de motilidade obtidos.

Azoarcus indigenus VB32T conta com 23 genes que codificam para as estruturas de pilus, completas para pilus tipo IV e pilus tipo T. Nas micrografias, exibiu pili (figura 55-A) e apresentou motilidade tipo “*Twitch*” (figura 58), realizada pela contração e relaxamento dos pili, gerando força na direção contrária de uma superfície. Esse movimento é realizado pela polimerização e despolimerização dos pili, realizadas pelo produto dos genes *pilT* (Azo3468).

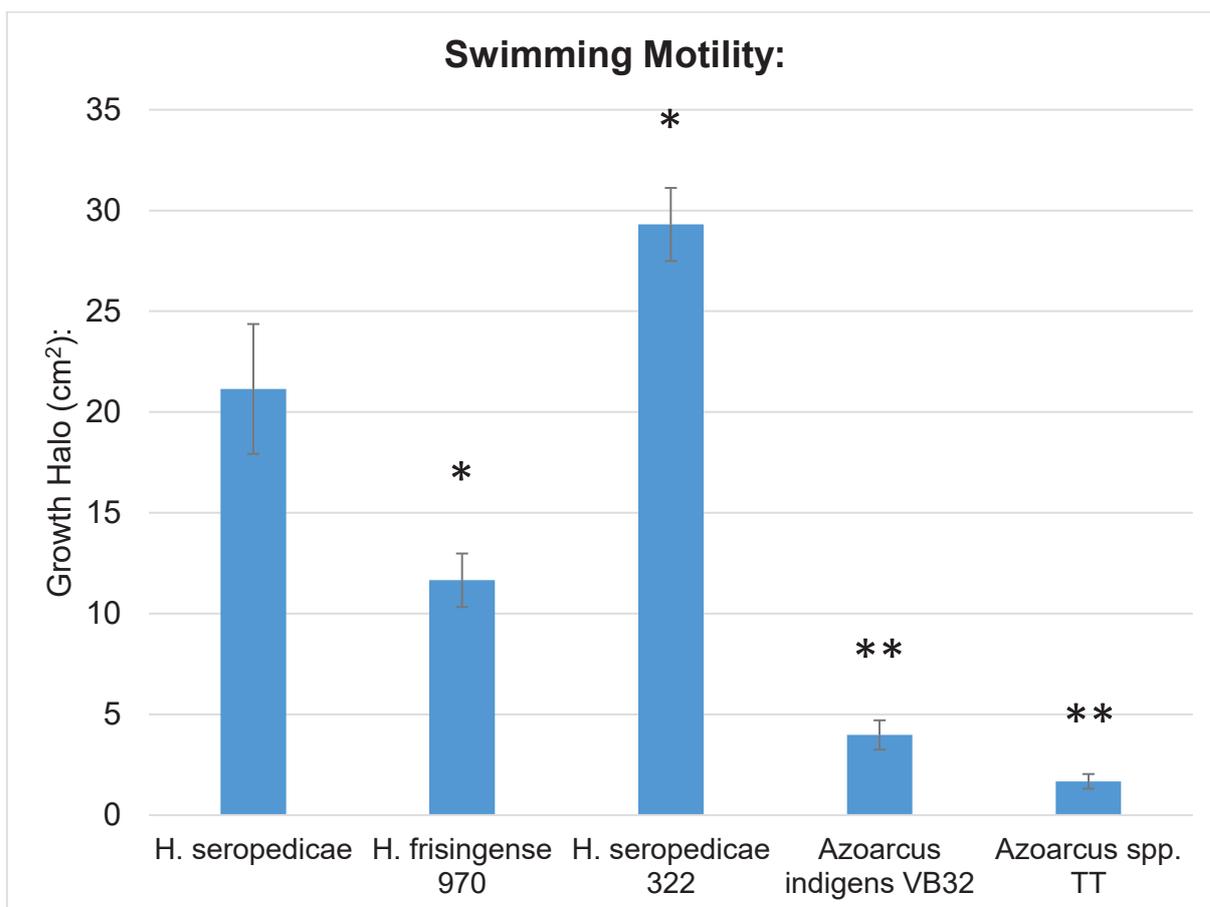


FIGURA 56: Motilidade tipo “*Swimming*” em ágar semissólido 0,15% das estirpes do instituto James Hutton. *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 foi utilizado como controle. Experimento realizado em três triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0,05$ são assinaladas com (*)

Quanto a biossíntese de flagelos, essa estirpe conta com todos os genes necessários para sua biossíntese, porém, embora tenha apresentado 4 genes que codificam flagelinas (*Azo2704*, *Azo2705*, *Azo2533* e *Azo2693*), essas flagelinas fazem parte do sistema *flg* e não do sistema *fli*, e muitas vezes esses genes não participam na formação do flagelo, estando associados a sistemas de adesão representando ganchos proteicos associados a proteínas. Essa análise poderia explicar a ausência

de flagelos nas micrografias (FIGURAS 54) e motilidades tipo “*swimming* e *Swarming*” comprometidas em relação às outras estirpes flageladas, com exceção da estirpe TT142 de *Azoarcus indigenis*, que embora tenha apresentado flagelos nas micrografias (figuras 55), apresentou todos os tipos de motilidade comprometidas (figuras 57, 58 e 59).

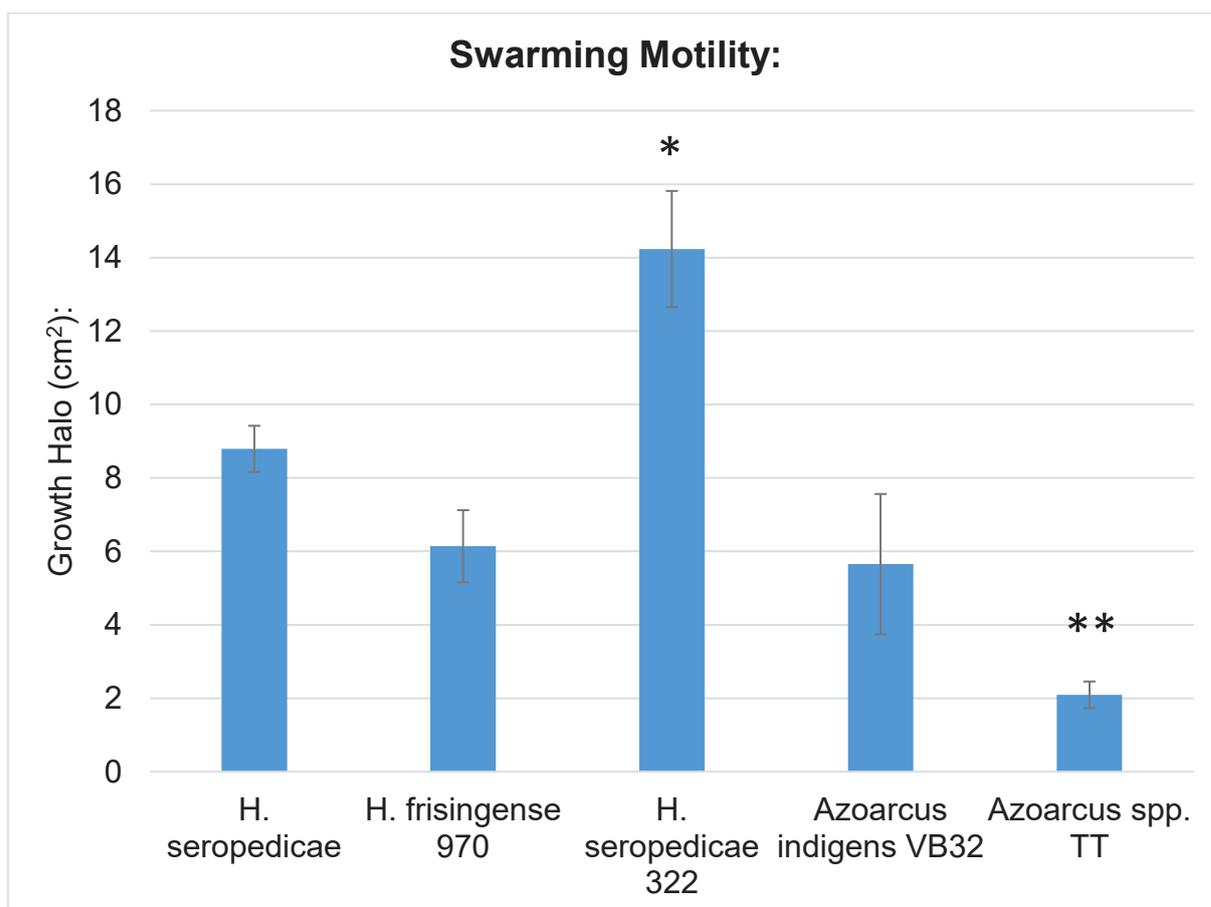


FIGURA 57: Motilidade tipo “*Swarming*” em ágar semissólido 0,3% das estirpes do instituto James Hutton. *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 foi utilizado como controle. Experimento realizado em três triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0,05$ são assinaladas com (*)

A análise “*in silico*” de *Azoarcus indigenis* TT142 foi feito sob um genoma incompleto, com apenas 75% de cobertura. A falta de informações pode comprometer a análise final. Analisando esse genoma, encontramos dois genes que codificam para flagelinas: *fliC1* (*AzoInd_01143*) e *fliC2* (*Azoind_01145*). Nesse genoma incompleto não foi possível encontrar o gene *flaG*, envolvido no controle do comprimento do flagelo e no seu movimento, e não foram encontrados genes que compõem o motor flagelar, comumente *motA* e *motB*. Esses dados poderiam explicar a motilidade

comprometida dessa estirpe em relação as outras, mesmo apresentando flagelos nas micrografias (figura 55). Outra explicação para a ausência de flagelos em *Azoarcus indigenes* VB32T e ausência de motilidade em *Azoarcus indigenes* TT142 seria a regulação e condição do ensaio, devido ao regresso antecipado não foi possível otimizar o ensaio.

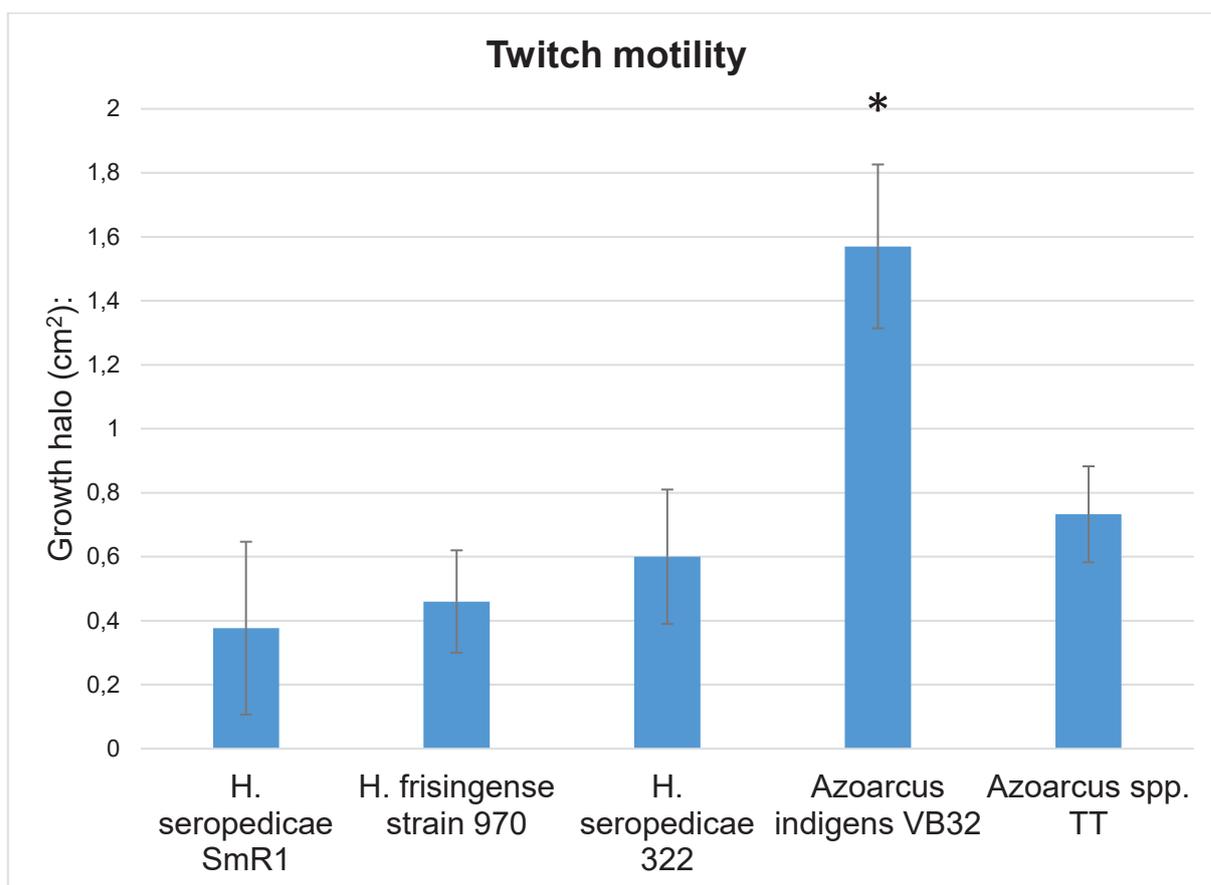


FIGURA 58: Motilidade tipo “*Twitching*” em ágar semissólido 0,75% das estirpes do instituto James Hutton. *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 foi utilizado como controle. Experimento realizado em três triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0,05$ são assinaladas com (*)

O sistema de motilidade é controlado pelo sistema de dois componentes *CheXY* (e acessórias *CheWZ*). Esse sistema é capaz de captar estímulos de carboidratos e dipeptídeos com certa especificidade dependente da bactéria. O meio de cultivo utilizado pode não conter o estímulo necessário para que o flagelo seja ativado e a motilidade seja direcional e eficiente (MATTICK, 2002; WELSH, 1993). O flagelo no estado frouxo realiza movimento errático e suave, o que poderia explicar a presença dos flagelos e falta de motilidade em *Azoarcus indigenes* TT142.

O experimento clássico da motilidade (ADLER, 1966) mostrou que uma determinada estirpe de *Escherichia coli*, dependia não só de determinados nutrientes para expressar os flagelos, como também de condições de temperatura estressantes (10°C para mais ou para menos em relação a temperatura ótima de crescimento), mostrando a estrutura do flagelo apenas sob tensão. Esse poderia ser o caso do *Azoarcus indigenes* VB32T.

Quanto a biossíntese dos pili em *Azoarcus indigenes* TT142. Foram encontrados apenas 9 genes que codificam para ele. Considerando que não foram observados nas micrografias (figura 54), é possível que a ausência de parte do genoma não tenha afetado a análise. A visualização dos pili é complexa, uma das formas de facilitar esse processo é através da deleção do gene que codifica a pilus depolimerase, mesma estratégia utilizada por Chicora (2015) no *H. rubrisubalbicans* M1, que leva a hiperpiliação – facilitando a visualização da estrutura.

Infelizmente *H. frisingense* 970 e *H. seropedicae* 322 não contam com genomas sequenciados. *H. frisingense* 970 apresentou fenótipos de motilidade comprometidos. Em nossas micrografias (figuras 51, 52 e 53) não observamos flagelos e nem pilus. Assim como discutido para *Azoarcus indigenes* VB32T, esse fenótipo poderia estar relacionado com as condições de cultivo. *H. seropedicae* 322 por sua vez apresentou fenótipos motilidades tipo “swimming” e “swarming” (figura 51) maiores do que a estirpe controle, *H. seropedicae* SmR1. Ambas as estirpes de *H. seropedicae* não apresentaram pili, podendo explicar fenótipo de motilidade tipo “twitch” mínimo.

O maior problema a ser contornado nesses experimentos de motilidade tem a ver com as condições de cultivo. Infelizmente no instituto James Hutton não tinham experiência em otimização de condições de cultivo. Minha intenção era ajuda-los nesse processo e analisar diversos fenótipos relacionados com a interação planta-bactéria com as estirpes em posse do professor Euan K. James. Infelizmente com as suspensões das atividades e eminente fechamento dos aeroportos devido a pandemia viral, as atividades desse projeto foram suspensas, não foi possível realizar os experimentos de infiltração das raízes para analisá-las em TEM ou mesmo levar as estirpes em posse do instituto James Hutton para a UFPR e auxiliar na otimização das condições de cultivo e caracterização das mesmas em parceria com o professor Euan K. James.

6. DISCUSSÃO

Nessa sessão serão discutidos os resultados obtidos a partir das 23 estirpes apresentadas nesse trabalho. A discussão separa os mutantes referentes ao transcriptoma de interação entre *H. rubrisubalbicans* M1 com o *Sorghum bicolor* dos mutantes referentes aos clusters do T6SS. Os fenótipos de crescimento, colonização simples e competição durante a colonização das raízes de sorgo, formação de biofilme, motilidade e formação da estria vermelha do sorgo estão apresentados separadamente para facilitar a visualização dos dados.

6.1. CURVAS DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. rubrisubalbicans* M1

Observamos que das 23 estirpes mutantes avaliadas, 6 mostraram alteração do fenótipo de crescimento significativas, sendo 5 estirpes referentes ao transcriptoma de interação (Hrubri_0065 – ausência de uma proteína presente no cluster *pilT*, Hrubri_1953 – ausência da proteína FliC, Hrubri_2585 – ausência da proteína transmembrana citrato/tricarbalilato, Hrubri_1197 – ausência da proteína do operon GlcG e Hrubri_3948 – ausência da proteína vanilato-o-demetilase) e 1 estirpe do T6SS cluster-II (Hrubri_2312 – ausência da proteína estrutural ImpH). As Tabelas 13 e 14 resumizam as taxas de crescimento e tempos de duplicação verificados para essas estirpes, onde: HR_0065 (taxa = 0,39 h⁻¹), Hrubri_1953 (taxa = 0,37 h⁻¹), Hrubri_2585 (taxa = 0,33 h⁻¹), Hrubri_1197 (taxa=0,32 h⁻¹), Hrubri_3948 (taxa = 0,36 h⁻¹) e Hrubri_2312 (taxa = 0,35 h⁻¹) apresentaram alteração na taxa de crescimento superiores a 10% em relação a estirpe selvagem (taxa = 0,46).

Para as estirpes mutantes referentes ao transcriptoma de interação, temos aquelas estirpes com mutações importantes para o metabolismo, como Hrubri_1197 (regula todo metabolismo de glucose), Hrubri_2585 (ciclo de Krebs) e Hrubri_0839 (metabolismo de D-xilose), não necessitando de explicações adicionais (LEWES et

al., 2004; STEPHENS *et al.*, 2007 & KEBEISH *et al.*, 2007). Aquelas com problemas de motilidade, como Hrubri_0065 e Hrubri_1953, visto que deficiências de motilidade já foram mostradas afetando o crescimento bacteriano (Ni *et al.*, 2019). E Hrubri_3948, sem informações na literatura.

As estirpes Hrubri_0762 e Hrubri_0935 apresentaram diferenças na curva de crescimento em relação a estirpe selvagem, essa alteração ocorreu próximo da fase estacionária, dessa forma a taxa de crescimento não é alterada, devido ao cálculo da mesma. Essas estirpes mutantes são interessantes por apresentarem mutações que as tornaram mais suscetíveis a metabólitos secundários, a álcool desidrogenase é importante no detox celular e alterações no perfil de crescimento de Hrubri_0762 e Hrubri_0935 parece estar envolvida com um transportador ABC de peptídeos, possivelmente responsável em expulsar substâncias tóxicas para o competitivas da célula.

TABELA 31: Taxas e tempos de duplicação das estirpes mutantes de interação planta-bactéria.

| Estirpe | taxa de crescimento exponencial (h⁻¹) | tempo de duplicação |
|------------------|---|----------------------------|
| Estirpe selvagem | 0,4626 | 0,55 |
| Hrubri_0065* | 0,3964 | 0,48 |
| Hrubri_0505 | 0,4601 | 0,54 |
| Hrubri_0763 | 0,4753 | 0,56 |
| Hrubri_0842 | 0,413 | 0,5 |
| Hrubri_1953* | 0,3713 | 0,45 |
| Hrubri_2391 | 0,4632 | 0,54 |
| Hrubri_2937 | 0,4239 | 0,51 |
| Hrubri_2585* | 0,33 | 0,42 |
| Hrubri_0835 | 0,4177 | 0,5 |
| Hrubri_0935 | 0,492 | 0,57 |
| Hrubri_1197* | 0,3208 | 0,4 |
| Hrubri_0839 | 0,5383 | 0,62 |
| Hrubri_2483 | 0,4238 | 0,51 |
| Hrubri_3948* | 0,3638 | 0,44 |
| Hrubri_3783 | 0,4129 | 0,5 |

Taxas de crescimento das estirpes desenvolvidas a partir do transcriptoma de interação *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 – *Sorghum bicolor*. (*) representa diferença estatisticamente significativa (valor $p > 5\%$). As estirpes foram grifadas em vermelho para facilitar a visualização.

Em relação as estirpes mutantes do T6SS, modificações no cluster-I levaram a leve aumento na taxa de crescimento enquanto que alterações no cluster-II levaram a leve diminuição nas taxas de crescimento. A hipótese do cluster-I representar um T6SS importante na competição bacteriana pode explicar o aumento na taxa de crescimento, a incapacidade de realizar a injeção contato-dependente diminui a competição/ comunicação entre as subpopulações, resultando em fenótipo de crescimento aumentado.

TABELA 32: Taxas e tempos de duplicação das estirpes mutantes do T6SS.

| Estirpe | taxa de crescimento exponencial (h⁻¹) | tempo de duplicação |
|----------------|---|----------------------------|
| Hrubri_3993 | 0,5134 | 0,59 |
| Hrubri_3994 | 0,4349 | 0,52 |
| Hrubri_3995 | 0,4705 | 0,54 |
| Hrubri_2309 | 0,4531 | 0,54 |
| Hrubri_2312* | 0,3553 | 0,44 |
| Hrubri_2313 | 0,4496 | 0,54 |
| Hrubri_2319 | 0,4133 | 0,49 |
| Hrubri_2320 | 0,4122 | 0,5 |

Taxas de crescimento das estirpes mutantes do T6SS de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. (*) representa diferença estatisticamente significativa (valor $p > 5\%$). As estirpes foram grifadas em vermelho para facilitar a visualização.

6.2. DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE COLONIZAÇÃO EPIFÍTICA E ENDOFÍTICA DAS RAÍZES DE *Sorghum bicolor* PELAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. rubrisubalbicans*

A seguir serão mostrados os resultados de colonização epifítica e endofítica das estirpes referentes ao transcriptoma de interação com o sorgo. Esses resultados são agrupados em 3 figuras (59, 60 e 61) por terem sido conduzidas em três experimentos exclusivos com seus respectivos controles. A TABELA 33 mostra em números absolutos quantas vezes a estirpe selvagem é mais competente no perfil de colonização em relação as médias comparadas. Pode ser observado para o perfil de adesão (dia 0) que embora tenhamos algumas diferenças significativas estatisticamente, foram diferenças pequenas e irrelevantes biologicamente.

No perfil de colonização epifítica, observamos que as estirpes Hrubri_0935 e Hrubri_3783 apresentaram diferenças significativas, chegando a 257 vezes no 1º dia de colonização para a estirpe Hrubri_3783. O fenótipo de colonização epifítico é restabelecido lentamente nos dias seguintes, mostrando que esses genes são importantes no início da colonização epifítica.

No perfil de colonização endofítico, as estirpes mutantes apresentaram grandes alterações fenotípicas, principalmente Hrubri_0835, Hrubri_0935, Hrubri_2391 e Hrubri_3783, sendo comprometidas entre 10 vezes e 164 vezes em relação a estirpe selvagem para a estirpe Hrubri_3783. No perfil endofítico, estirpes como Hrubri_2391 e Hrubri_3783 não restabeleceram o fenótipo com o passar dos dias.

Infelizmente, desses genes apenas as álcool desidrogenases (Hrubri_0762 e Hrubri_2483) já foram mostrados na literatura envolvidos na colonização, em estudos de Hurek com *Azoarcus indigenus*. É sabido que álcool desidrogenases, especialmente aquelas que contem ferro (Hrubri_2483), são ferramentas importantes na sobrevivência frente aparecimento de metabólitos secundários de defesa do vegetal em questão.

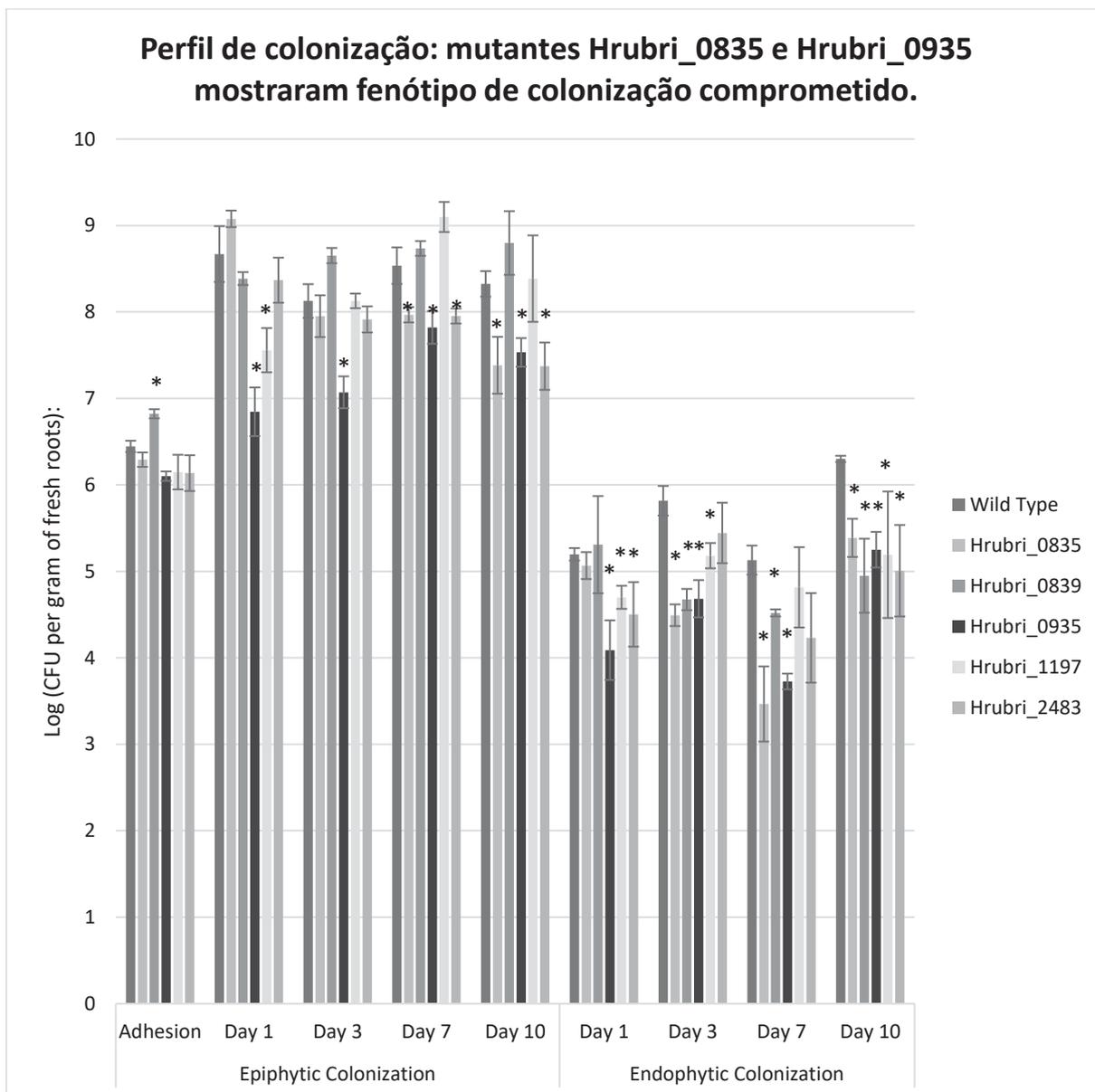


FIGURA 60: Ensaio de colonização. Adesão, colonização epifítica e colonização endofítica de raízes de *Sorghum bicolor* por *H. rubrisubalbicans* e seus mutantes. Experimento realizado no período de 10 dias onde o dia 0 representa o experimento de adesão e os dias 1, 3, 7 e 10 representam colonização epifítica e endofítica. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0,05$ são assinaladas com (*)

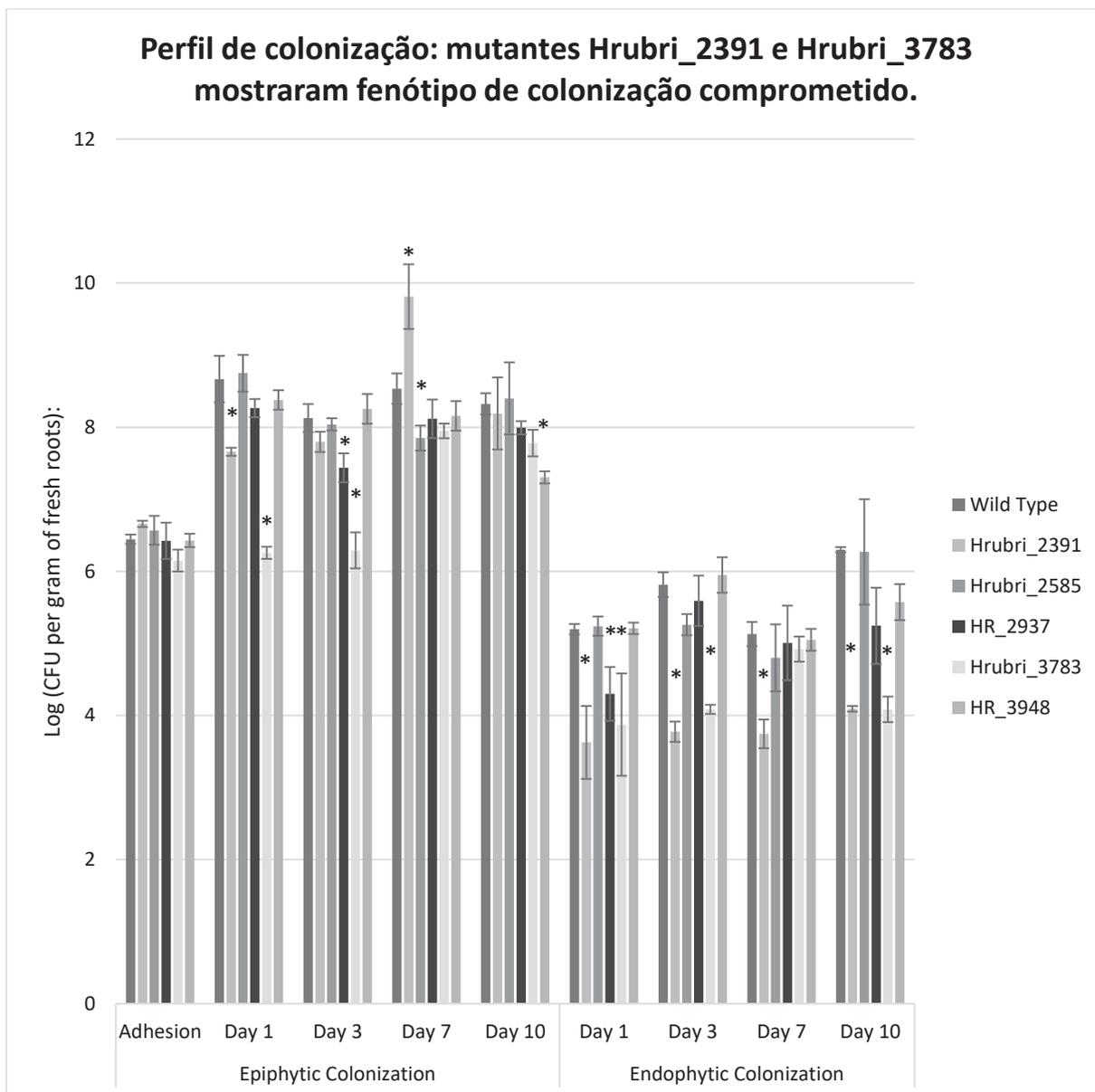


FIGURA 61: Ensaios de colonização. Adesão, colonização epifítica e colonização endofítica de raízes de *Sorghum bicolor* por *H. rubrisubalbicans* e seus mutantes. Experimento realizado no período de 10 dias onde o dia 0 representa o experimento de adesão e os dias 1, 3, 7 e 10 representam colonização epifítica e endofítica. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

TABELA 33: Dados comparativos em números absolutos entre as estirpes mutantes da interação planta-bactéria em relação a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

| Estirpe: | Adesão | Dia 1 | Dia 3 | Dia 7 | Dia 10 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 7 | Dia 10 |
|-------------|-----------|-------|-------|-------|--------|------------|-------|-------|--------|
| | Epifítico | | | | | Endofítico | | | |
| Hrubri_0065 | 1,1 | 1,0 | 1,9 | 1,7 | 0,8 | 0,4 | 1,6 | 0,3 | 4,1 |
| Hrubri_0505 | 1,2 | 1,4 | 0,8 | 0,4 | 0,7 | 0,2 | 1,7 | 0,4 | 5,5 |
| Hrubri_0762 | 1,5 | 4,7 | 1,3 | 1,9 | 6,7 | 0,5 | 1,6 | 1,4 | 2,0 |
| Hrubri_0842 | 0,2 | 1,9 | 0,7 | 2,7 | 0,8 | 1,3 | 0,7 | 0,4 | 1,3 |
| Hrubri_1953 | 4,4 | 0,5 | 0,9 | 0,7 | 0,4 | 1,2 | 0,8 | 1,2 | 7,0 |
| Hrubri_0835 | 1,4 | 0,4 | 1,5 | 3,7 | 8,7 | 1,4 | 21,1 | 46,2 | 8,2 |
| Hrubri_0839 | 0,4 | 1,9 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 0,8 | 13,9 | 4,1 | 22,4 |
| Hrubri_0935 | 2,2 | 66,6 | 11,4 | 5,2 | 6,2 | 12,9 | 13,6 | 25,4 | 11,2 |
| Hrubri_1197 | 2,0 | 12,9 | 1,0 | 0,3 | 0,9 | 3,1 | 4,3 | 2,1 | 12,8 |
| Hrubri_2391 | 0,6 | 10,2 | 2,1 | 0,1 | 1,4 | 37,3 | 110,2 | 24,3 | 161,8 |
| Hrubri_2483 | 2,0 | 2,0 | 1,6 | 3,8 | 8,9 | 5,0 | 2,4 | 7,9 | 19,7 |
| Hrubri_2585 | 0,8 | 0,8 | 1,2 | 4,8 | 0,8 | 0,9 | 3,6 | 2,1 | 1,1 |
| Hrubri_2937 | 1,1 | 2,5 | 4,9 | 2,6 | 2,1 | 7,9 | 1,7 | 1,3 | 11,4 |
| Hrubri_3783 | 2,0 | 257,9 | 68,4 | 3,9 | 3,5 | 21,1 | 53,9 | 1,6 | 164,3 |
| Hrubri_3948 | 1,0 | 2,0 | 0,7 | 2,4 | 10,5 | 1,0 | 0,7 | 1,2 | 5,3 |

Numeros absolutos da competência na competição durante a colonização da estirpe selvagem em relação a estirpe mutante.

As figuras 62 e 63 mostram os resultados obtidos com as 8 estirpes dos 2 T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1. Os resultados de colonização para o cluster I, apresentado na figura 62 e tabela 34, mostram que esse T6SS afeta minimamente a colonização sem a presença de outros competidores. As estirpes Hrubri_3993 e Hrubri_3994 apresentaram diminuição em relação a estirpes selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 no dia 1 da colonização endofítica 17 e 7 vezes respectivamente, com restabelecimento do fenótipo nos dias seguintes. Já no cluster-II, as estirpes mutantes HR_2309 (codifica para a proteína efetora Hcp) e Hrubri_2313 apresentaram fenótipos de colonização epifítica e endofítica comprometidos em várias ocasiões, mostrando maior possibilidade de envolvimento na interação planta-bactéria do que foi observado no cluster-I, característica que será reforçada na discussão dos experimentos de competição e geração de sintomas da estria vermelha no sorgo.

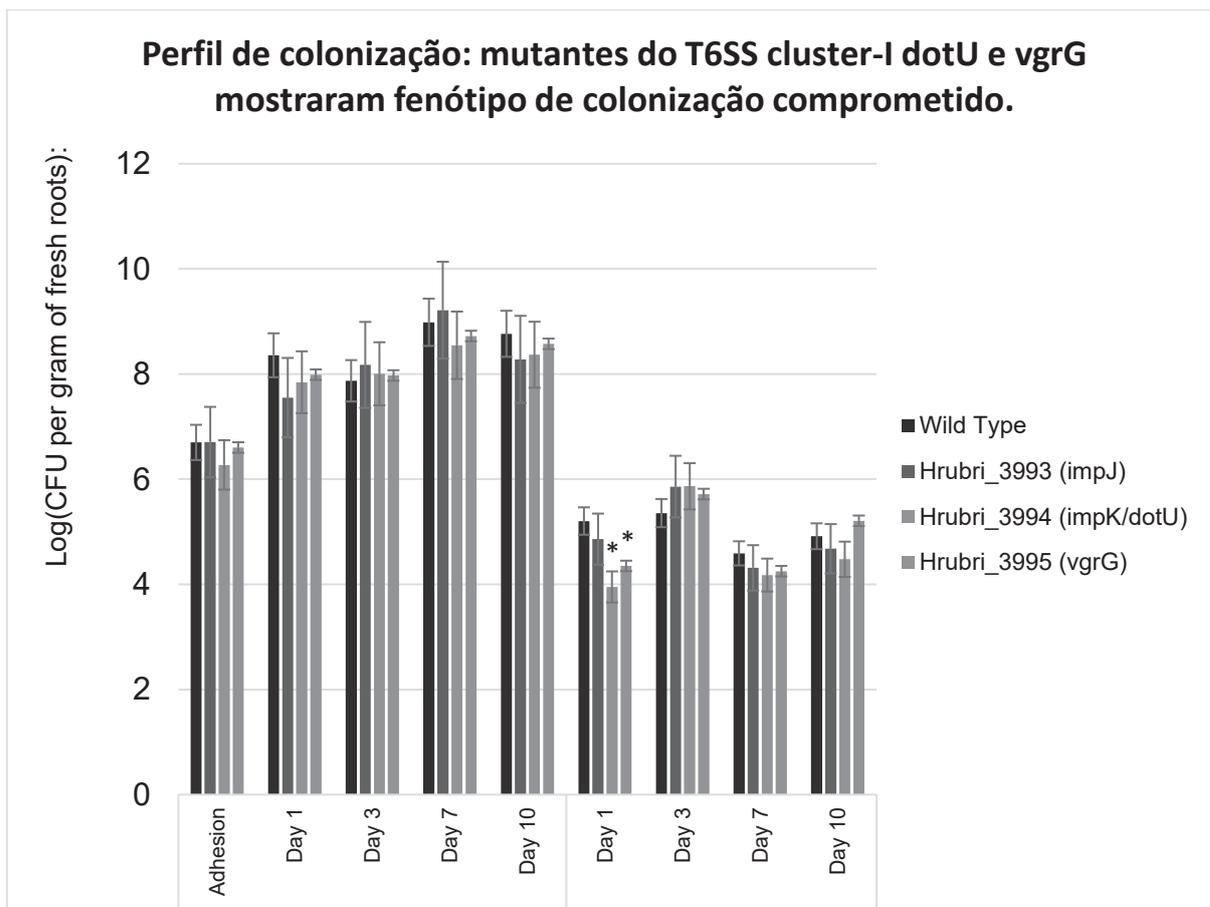


FIGURA 62: T6SS cluster-I. Experimento realizado no período de 10 dias onde o dia 0 representa o experimento de adesão e os dias 1, 3, 7 e 10 representam colonização epifítica e endofítica. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

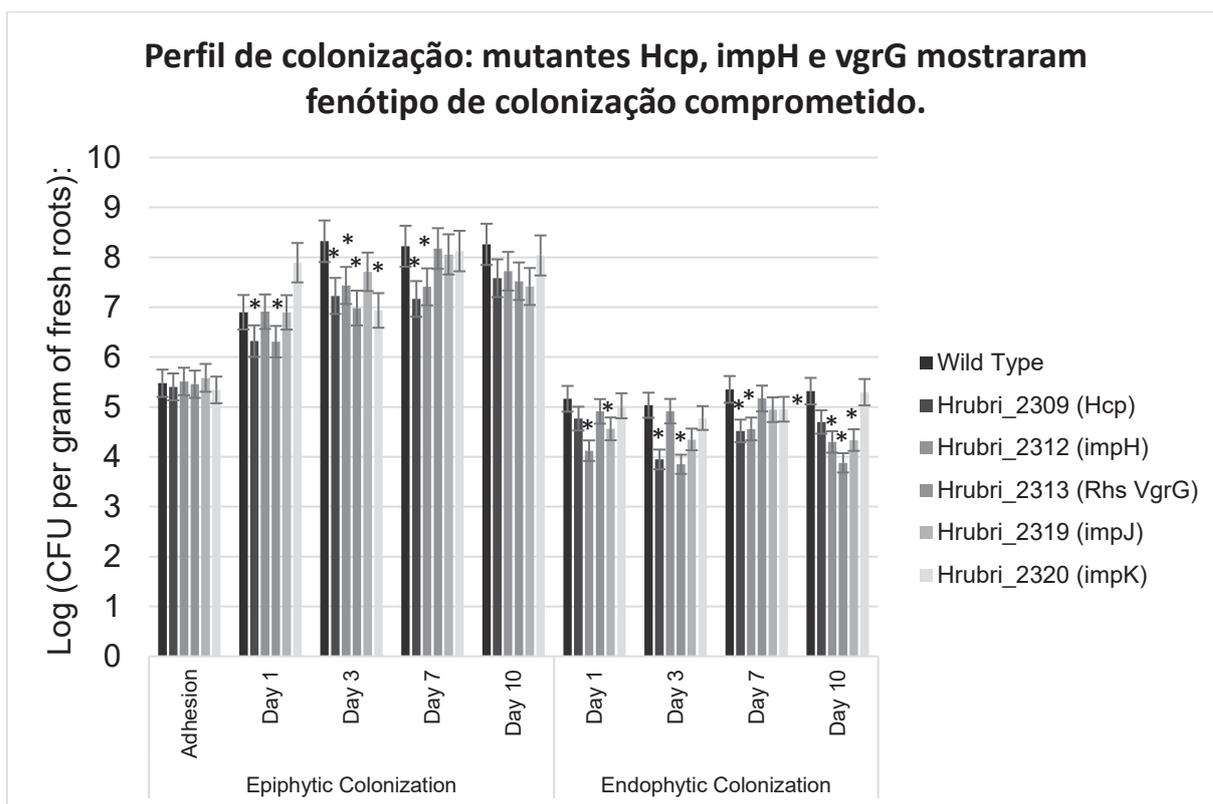


FIGURA 63: Perfil de colonização T6SS cluster-II. Experimento realizado no período de 10 dias onde o dia 0 representa o experimento de adesão e os dias 1, 3, 7 e 10 representam colonização epifítica e endofítica. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0,05$ são assinaladas com (*)

TABELA 34: Dados comparativos em números absolutos entre as estirpes mutantes dos T6SS em relação a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

| Estirpe | Adesão | Dia 1 | Dia 3 | Dia 7 | Dia 10 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 7 | Dia 10 |
|------------------|--------|-------|-------|-------|-------------------|-------|-------|-------|--------|
| Epifítico | | | | | Endofítico | | | | |
| T6SS-II | | | | | | | | | |
| Hrubri_2309 | 1,18 | 3,80 | 12,50 | 11,40 | 4,77 | 2,49 | 12,23 | 6,80 | 4,15 |
| Hrubri_2312 | 0,92 | 0,98 | 7,71 | 6,51 | 3,45 | 10,96 | 1,32 | 6,20 | 10,46 |
| Hrubri_2313 | 1,04 | 3,90 | 21,84 | 1,11 | 5,49 | 1,79 | 15,28 | 1,52 | 27,38 |
| Hrubri_2319 | 0,78 | 1,01 | 4,10 | 1,46 | 7,00 | 4,00 | 4,86 | 2,56 | 9,58 |
| Hrubri_2320 | 1,36 | 0,10 | 24,40 | 1,25 | 1,67 | 1,38 | 1,81 | 2,50 | 1,05 |
| T6SS-II | | | | | | | | | |
| Hrubri_3993 | 0,99 | 6,39 | 0,50 | 0,59 | 3,06 | 2,21 | 0,31 | 1,89 | 1,72 |
| Hrubri_3994 | 2,68 | 3,26 | 0,74 | 2,74 | 2,50 | 17,95 | 0,31 | 2,59 | 2,74 |
| Hrubri_3995 | 1,25 | 2,34 | 0,79 | 1,82 | 1,55 | 7,15 | 0,43 | 2,18 | 0,51 |

Competência na competição durante a colonização da estirpe selvagem em relação a estirpe mutante.

A hipótese do envolvimento do T6SS-II na interação planta-bactéria de *H. rubrisubalbicans* M1 será reforçado nos ensaios de competição durante a colonização das raízes de sorgo, formação de biofilme e na geração da estria vermelha.

6.3. COMPETIÇÃO ENTRE A ESTIRPE SELVAGEM E AS ESTIRPES MUTANTES DE *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 DURANTE A COLONIZAÇÃO DO *Sorghum bicolor*:

Como os experimentos de colonização simples com as primeiras 5 estirpes mutantes nos renderam resultados pouco expressivos, foram utilizados experimentos de competição durante a colonização do sorgo para avaliar se esses genes diferencialmente expressos durante a interação representavam vantagem competitiva durante a colonização. Das 15 estirpes mutantes testadas contra a estirpe selvagem *H. rubrisubalbicans* M1 (figuras 64 a 68 e tabela 35) pudemos observar que a grande maioria das estirpes mutantes apresentou fenótipo competitivo diminuído em relação a estirpe selvagem durante a colonização do sorgo, ressaltando as estirpes Hrubri_0835, Hrubri_0839, Hrubri_0935, Hrubri_2483, Hrubri_2937 e Hrubri_3783, que acumularão diversos fenótipos da interação planta-bactéria afetados no decorrer da discussão, sendo apresentados como genes importantes na interação planta-bactéria. Entre os resultados mais expressivos, temos a estirpe Hrubri_0835 que foi menos competitiva em todos os períodos testados. Estirpes como Hrubri_0935, Hrubri_2391 e Hrubri_2585 apresentaram fenótipo competitivo fortemente alterado, chegando a ser mais de 1000 vezes menos competitivo do que a estirpe selvagem na colonização epifítica para a estirpe Hrubri_2391. As demais estirpes apresentaram fenótipo competitivo diminuído em diversas ocasiões, porém com menos consistência em relação as estirpes comentadas acima.

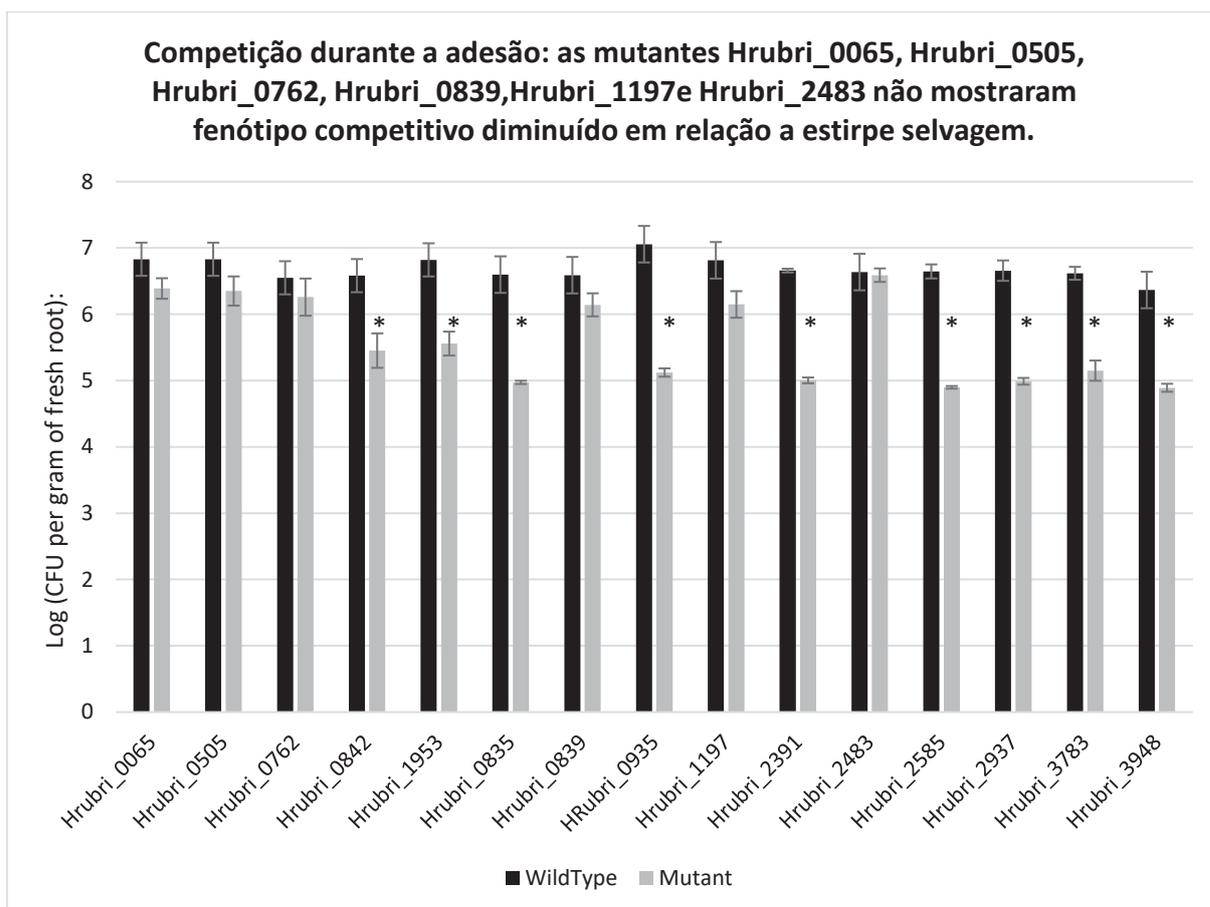


FIGURA 64: Perfil de competição durante a adesão às raízes de sorgo contra estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

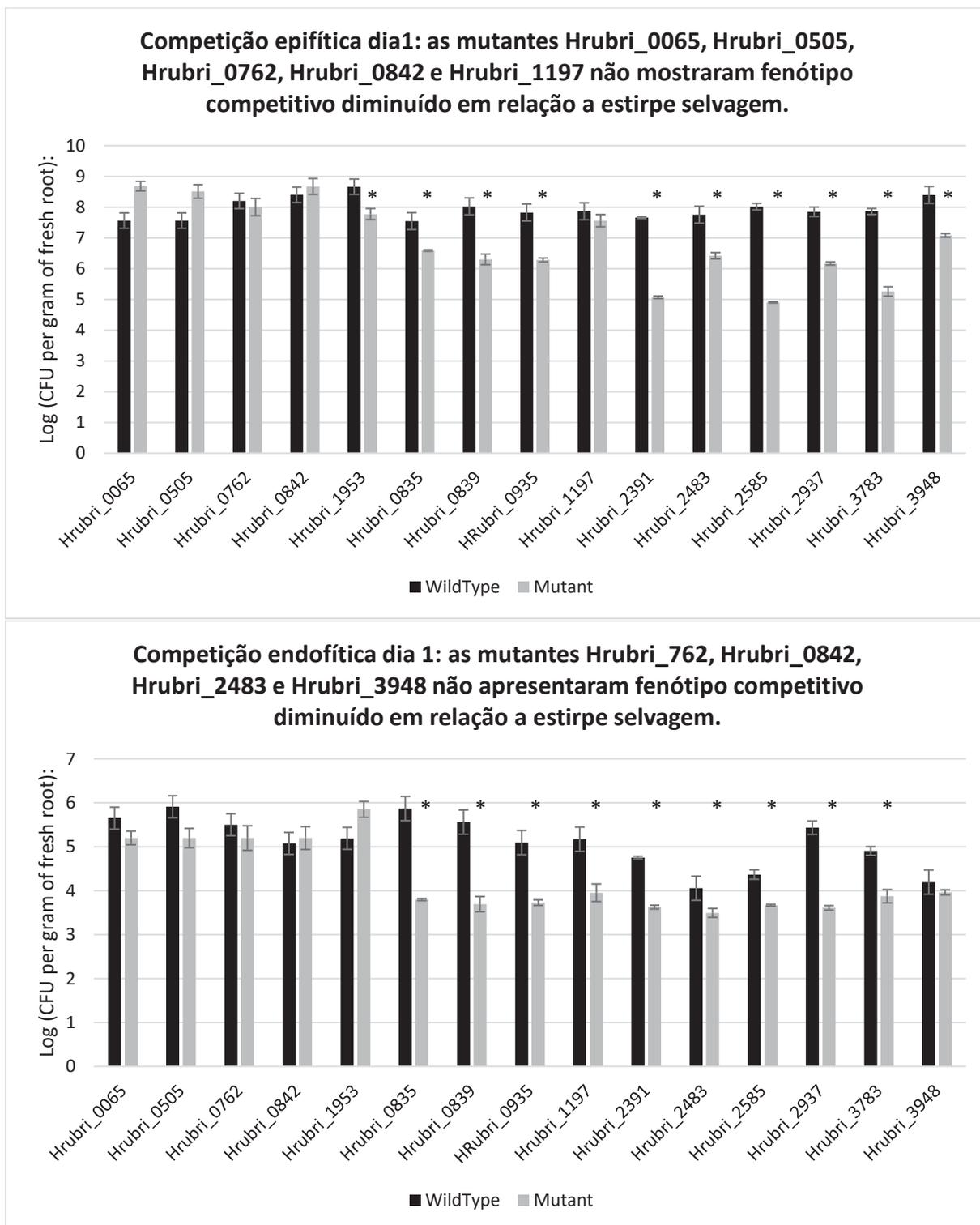


FIGURA 65: Perfil de competição durante a colonização endofítica no dia 10 após inoculo, contra estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 dia 1 após inoculação. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

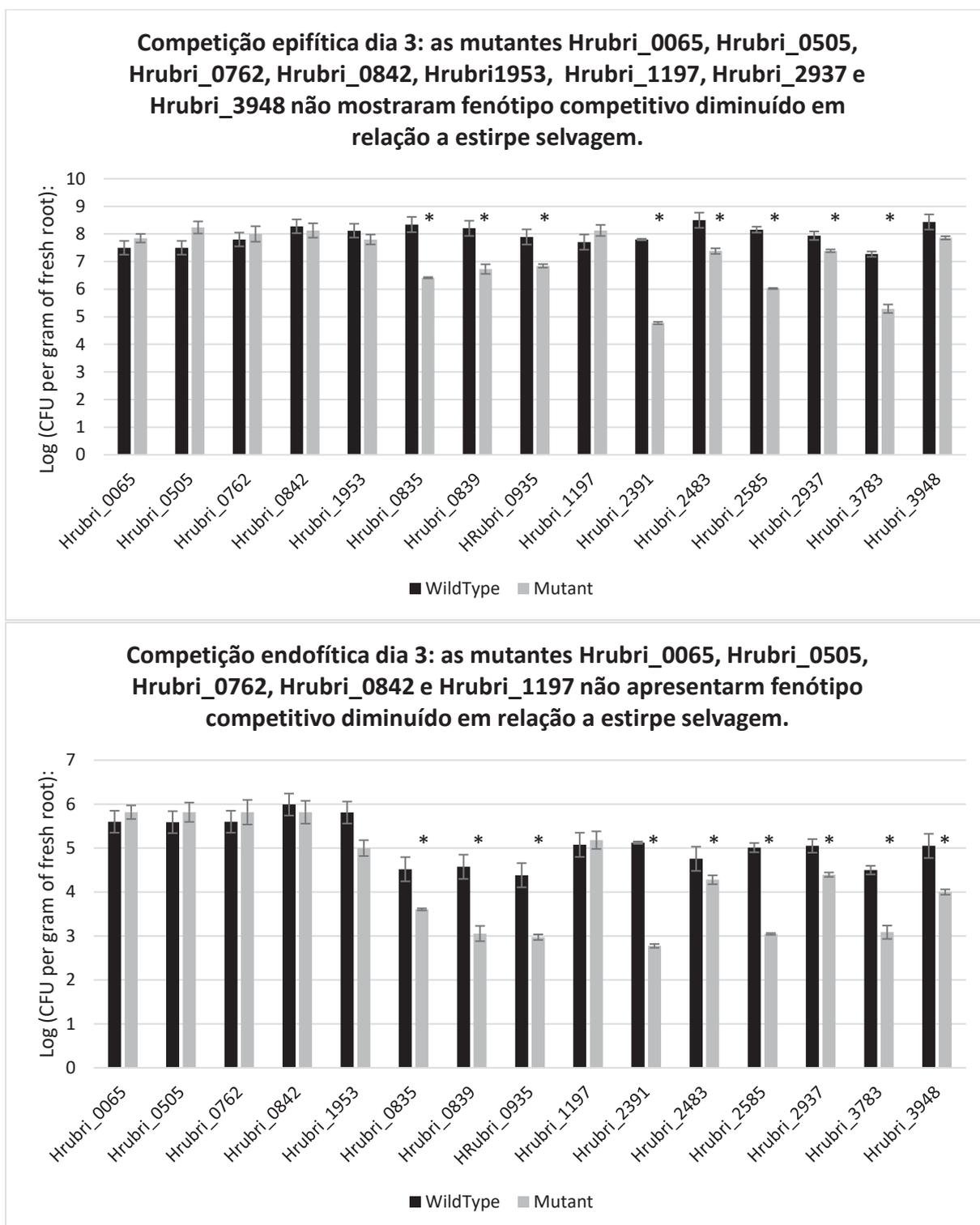


FIGURA 66: Perfil de competição durante a colonização endofítica contra estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 dia 3 após inoculação. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

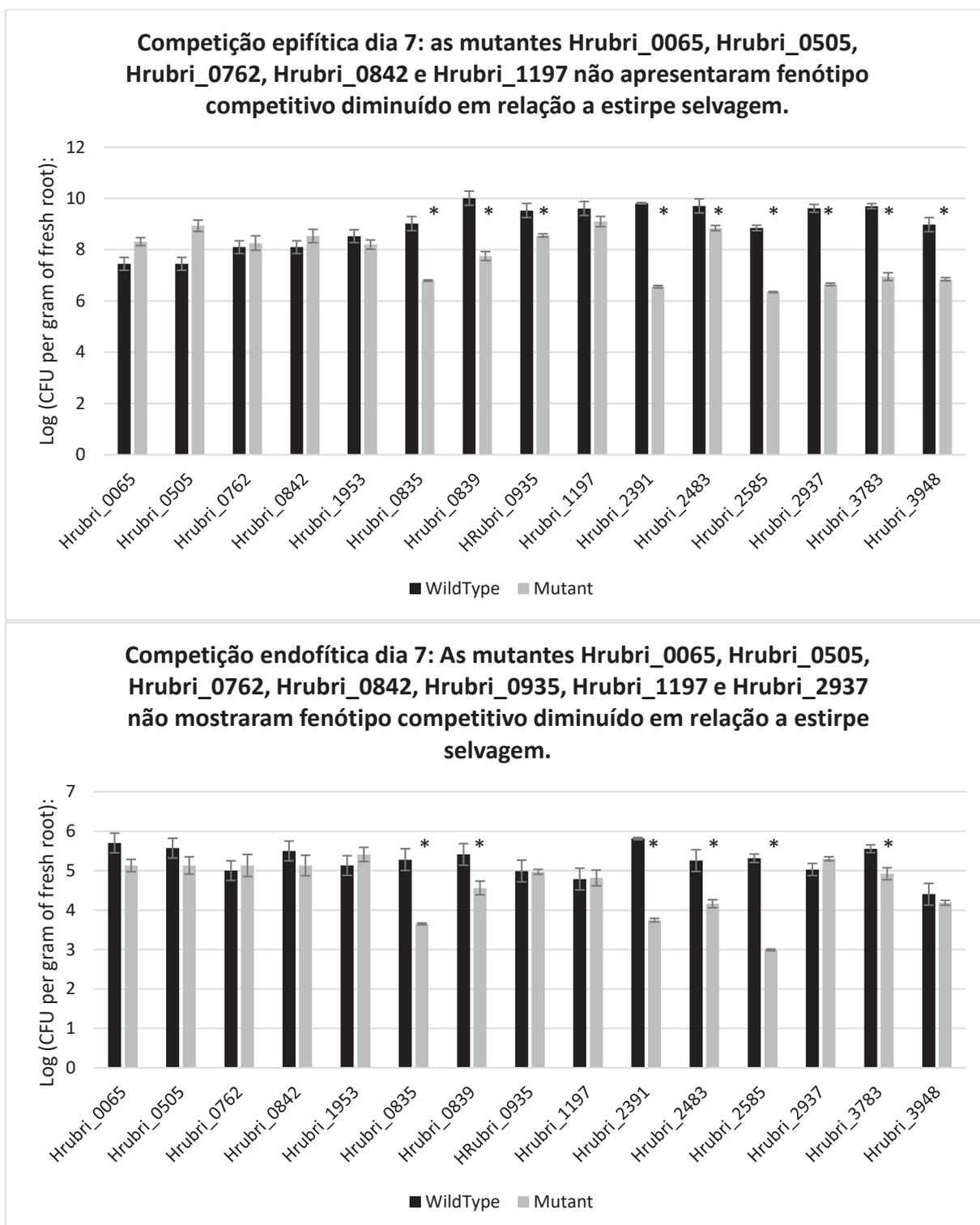


FIGURA 67: Perfil de competição durante a colonização endofítica no dia 10 após inoculo, contra estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 dia 7 após inoculação. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

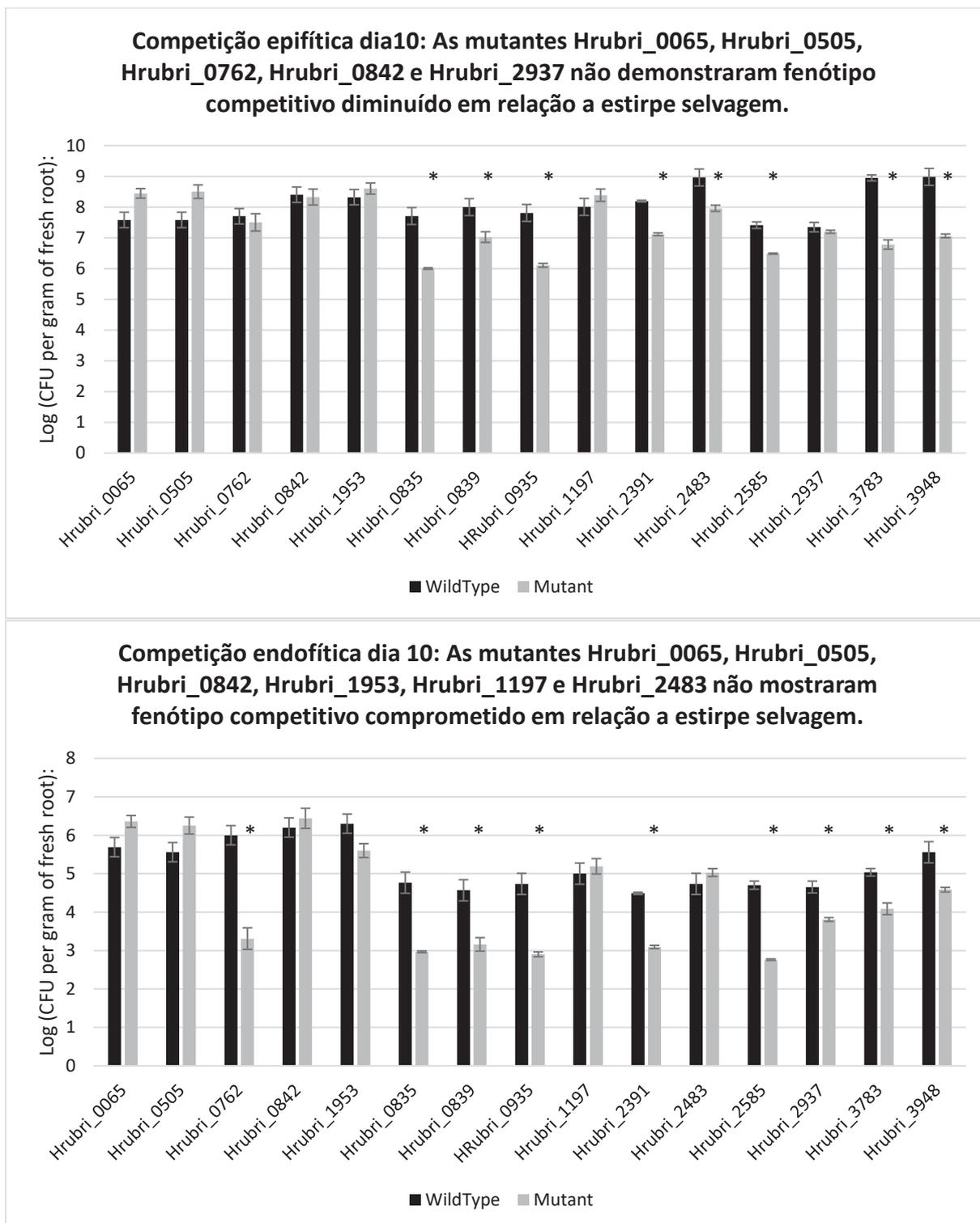


FIGURA 68: Perfil de competição durante a colonização endofítica no dia 10 após inoculo, contra estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 dia 10 após inoculação. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

TABELA 35: Dados comparativos em números absolutos durante a competição entre as estirpes mutantes da interação planta-bactéria e a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

| Estirpe: | Adesão | Dia 1 | Dia 3 | Dia 7 | Dia 10 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 7 | Dia 10 |
|-------------|------------------|--------|--------|--------|--------|-------------------|-------|-------|--------|
| | Epifítico | | | | | Endofítica | | | |
| Hrubri_0065 | 0,6 | 0,4 | 9,5 | 0,7 | 0,1 | 1,8 | 1,7 | 0,7 | 0,8 |
| Hrubri_0505 | 13,8 | 2,5 | 1,6 | 1,3 | 0,5 | 1,2 | 3,2 | 1,7 | 1,4 |
| Hrubri_0762 | 2,0 | 1,6 | 0,6 | 0,7 | 1,6 | 2,8 | 0,7 | 0,9 | 1,4 |
| Hrubri_0842 | 0,2 | 1,9 | 0,7 | 0,0 | 0,8 | 1,3 | 0,7 | 0,4 | 1,3 |
| Hrubri_1953 | 0,7 | 7,7 | 2,1 | 2,1 | 0,5 | 0,2 | 6,5 | 0,5 | 5,0 |
| Hrubri_0835 | 42,2 | 9,0 | 84,7 | 166,0 | 51,0 | 118,1 | 8,2 | 42,6 | 62,7 |
| Hrubri_0839 | 2,8 | 52,8 | 30,0 | 181,4 | 9,4 | 73,6 | 33,0 | 7,1 | 25,6 |
| Hrubri_0935 | 86,2 | 34,7 | 11,2 | 9,4 | 50,6 | 23,2 | 25,8 | 1,0 | 68,1 |
| Hrubri_1197 | 4,6 | 2,0 | 0,4 | 3,2 | 0,4 | 16,5 | 0,8 | 0,9 | 0,6 |
| Hrubri_2391 | 45,3 | 391,9 | 1052,3 | 1799,0 | 11,9 | 13,4 | 223,0 | 117,0 | 25,0 |
| Hrubri_2483 | 1,1 | 21,7 | 13,1 | 7,3 | 10,1 | 3,6 | 3,0 | 12,4 | 0,5 |
| Hrubri_2585 | 56,0 | 1294,7 | 136,2 | 315,6 | 8,4 | 5,0 | 92,3 | 211,7 | 86,5 |
| Hrubri_2937 | 46,6 | 47,7 | 3,5 | 924,0 | 1,4 | 66,5 | 4,5 | 0,5 | 7,0 |
| Hrubri_3783 | 29,4 | 399,0 | 94,9 | 566,2 | 146,9 | 10,7 | 26,0 | 4,3 | 8,9 |
| Hrubri_3948 | 29,8 | 20,7 | 3,8 | 135,8 | 83,2 | 1,7 | 11,2 | 1,6 | 9,4 |

Competência na competição durante a colonização da estirpe selvagem em relação a estirpe mutante.

Já as estirpes mutantes dos T6SS (figuras 69 a 73 e tabela 36), todas as estirpes mutantes foram severamente afetadas, as mutantes do T6SS-II foram fortemente afetadas no início do experimento, recuperando o fenótipo competitivo a partir do dia 7. As mutantes do T6SS-I foram menos afetadas, passaram a perder a competição após a adesão, porém não recuperaram o fenótipo competitivo até o final do experimento. Esses dados nos sugerem que além da competição com a estirpe selvagem, a imunidade vegetal passa a atacar os mutantes do T6SS-II desde o contato, dificultando o início da colonização, principalmente para a mutante Hrubri_2309 (Hcp), reforçando o envolvimento do Hcp, ou de alguma proteína efetora associada a essa proteína, do cluster-II na colonização da planta. Já para as mutantes do T6SS-I, embora tenham a capacidade de aderir e possivelmente iniciar o processo

de regulação da imunidade vegetal, o competidor selvagem deve ter menos problemas em deslocá-lo competitivamente.

Essa característica de suprimir a imunidade vegetal através da injeção de proteínas efetoras é bem conhecida para o T3SS, inclusive já foi estudada em *H. rubrisubalbicans* M1 por Schmidt e colaboradores. Para o T6SS, a supressão imune é bem caracterizada em patógenos humanos, porém o interesse em fitos patógenos é recente, sendo essa tese um dos primeiros trabalhos.

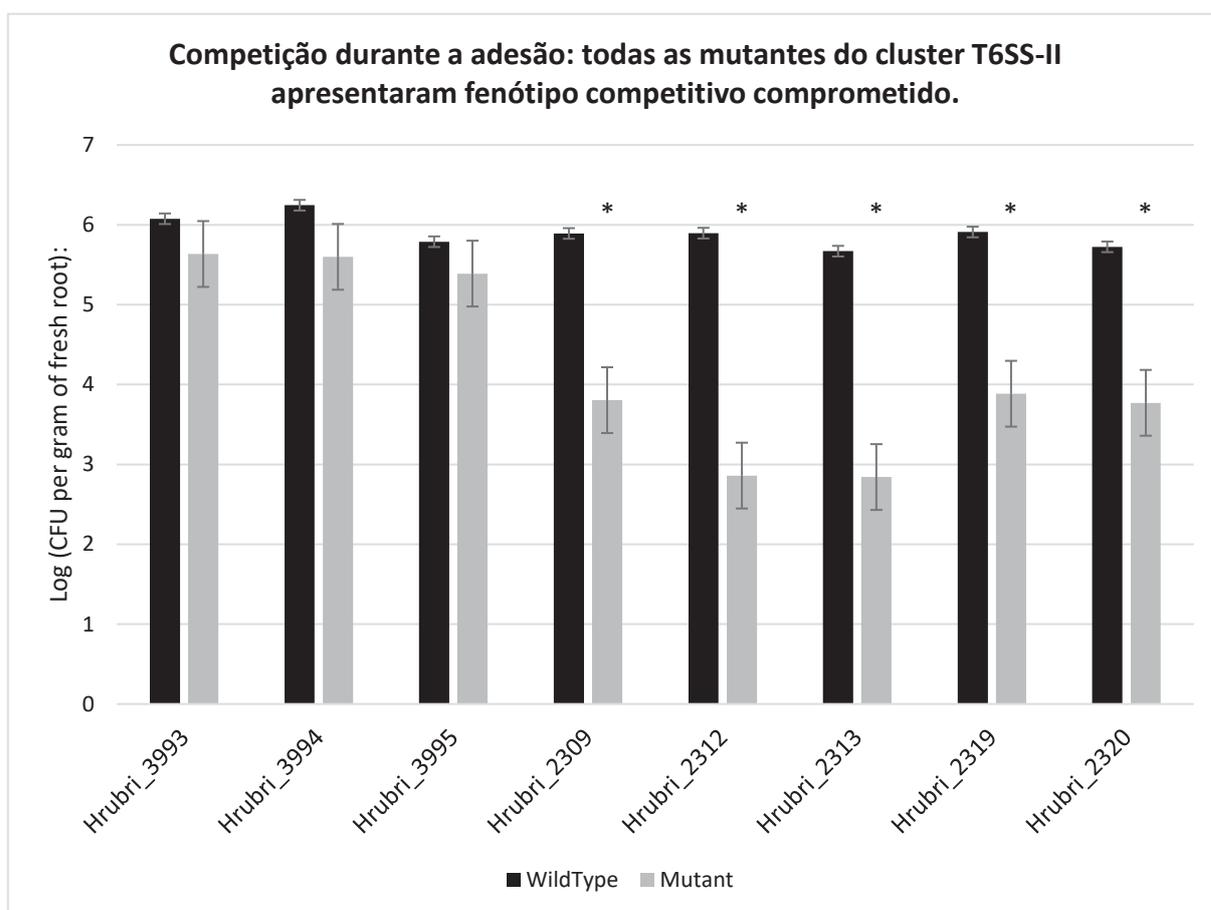


FIGURA 69: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

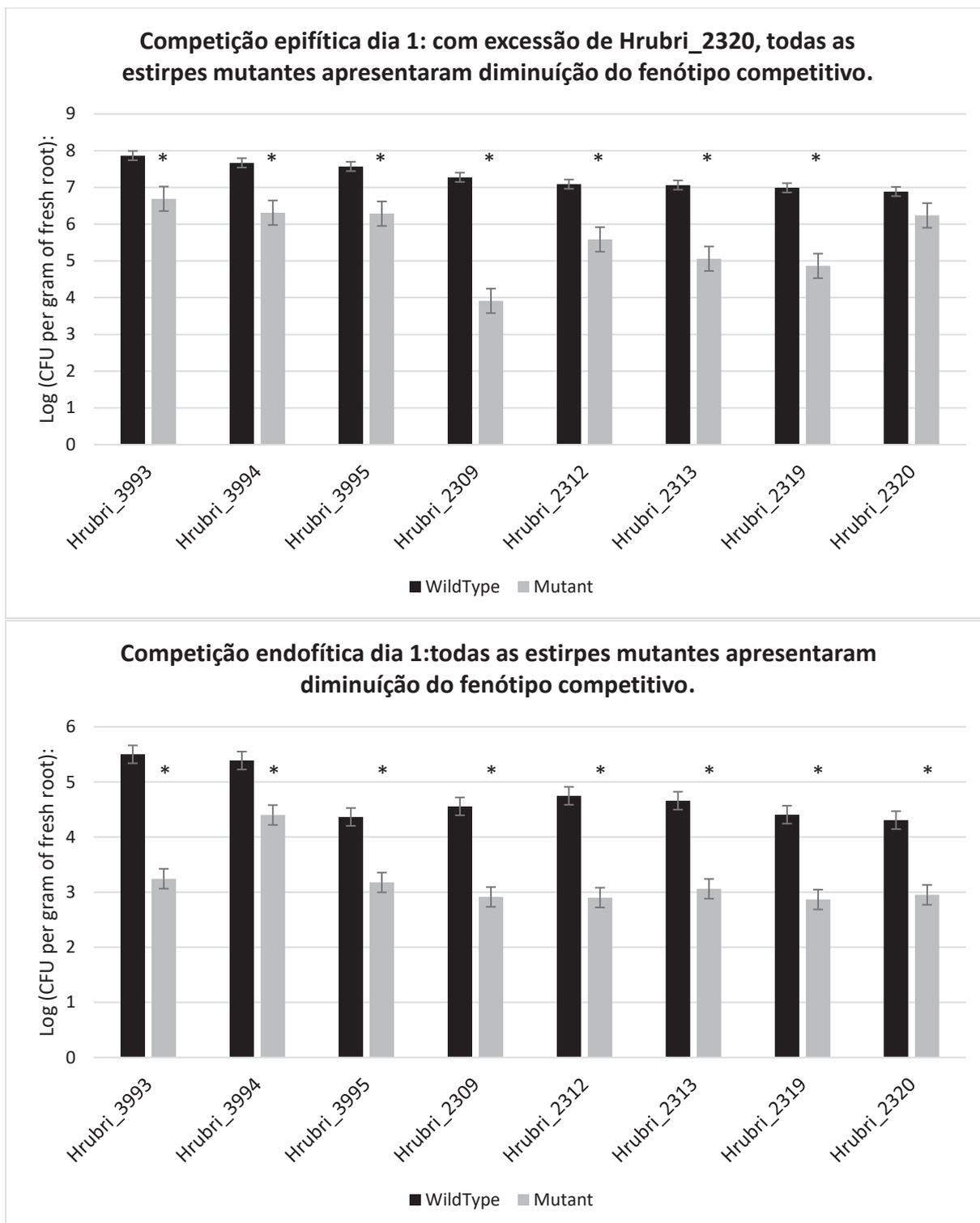


FIGURA 70: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

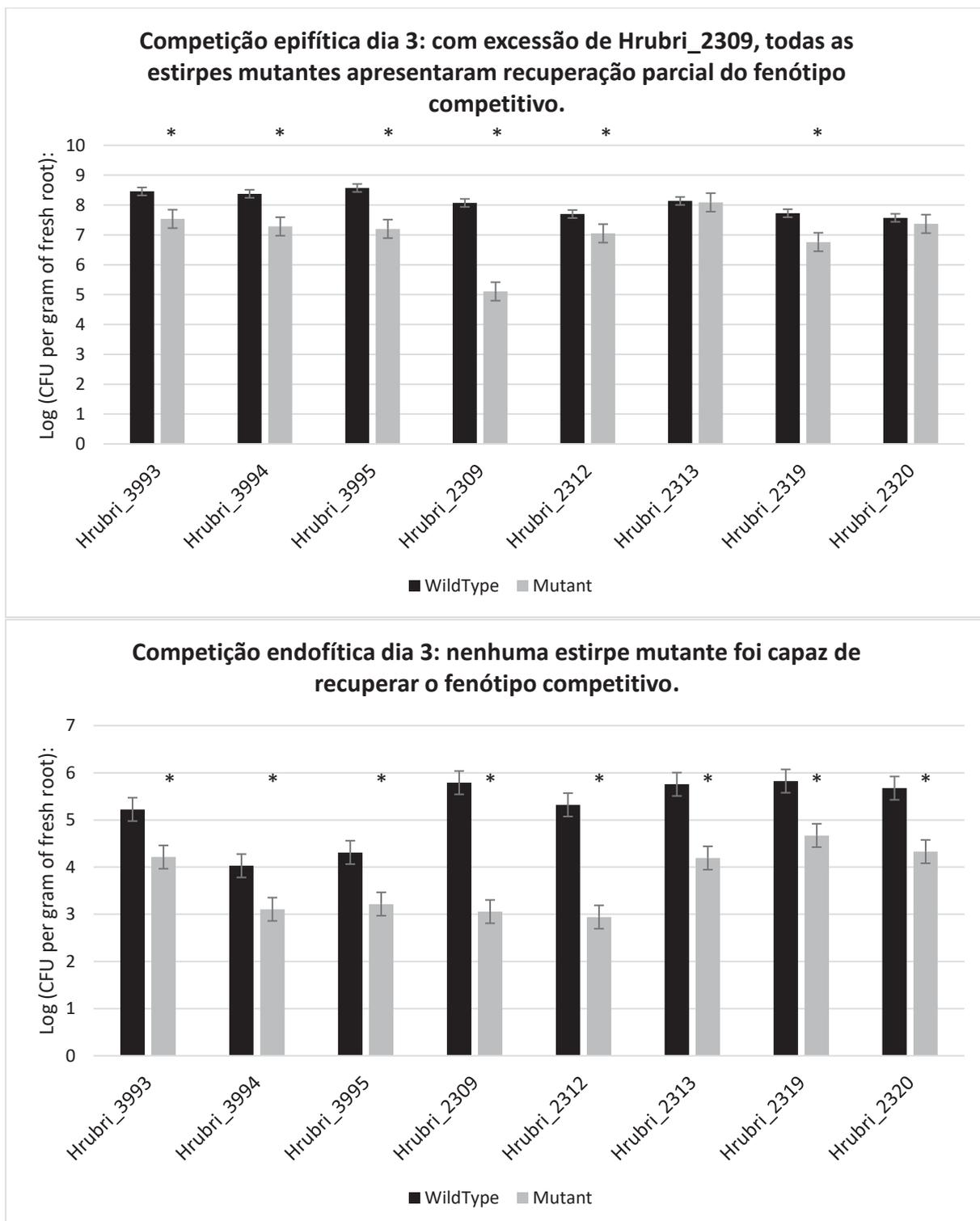


FIGURA 71: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

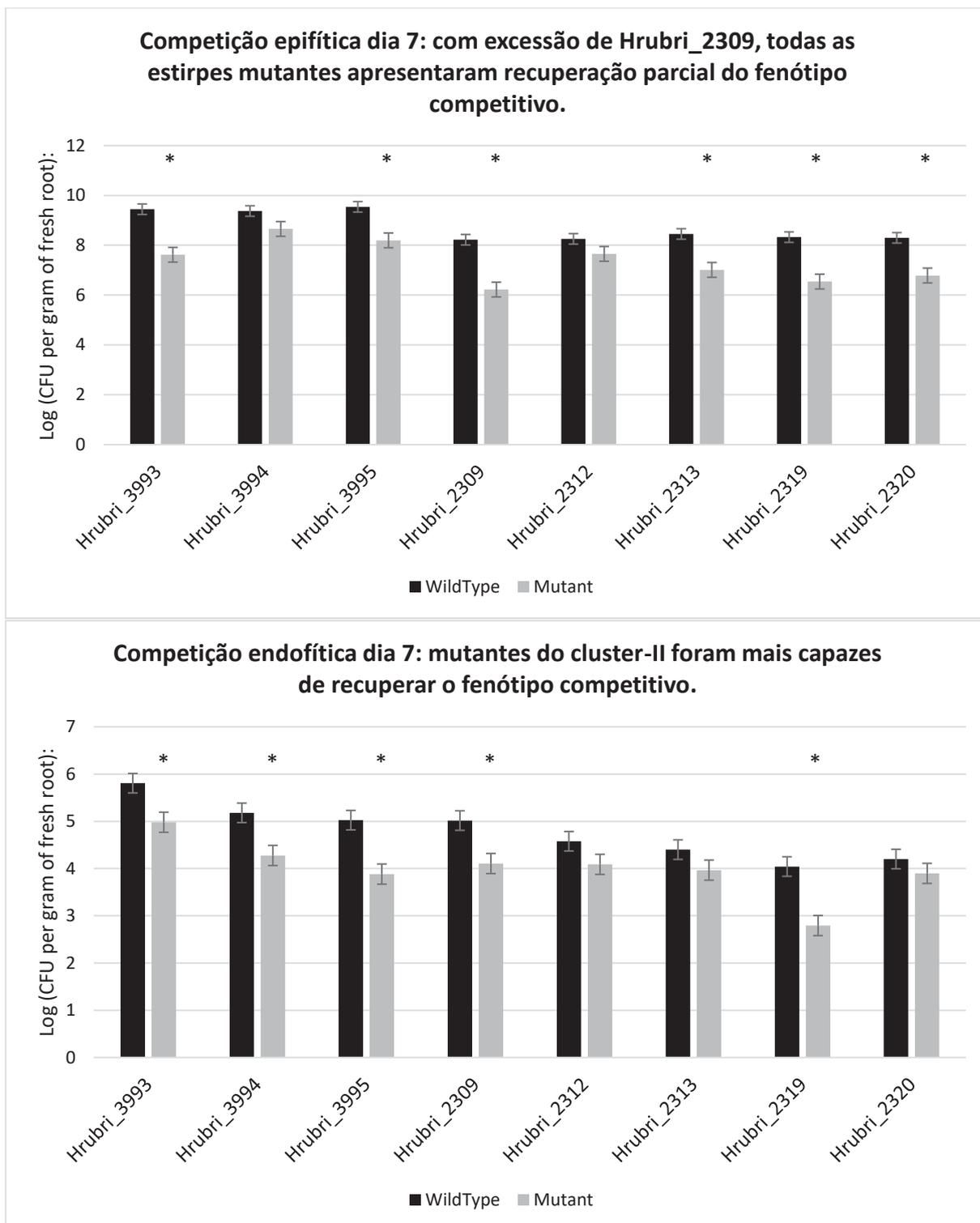


FIGURA 72: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

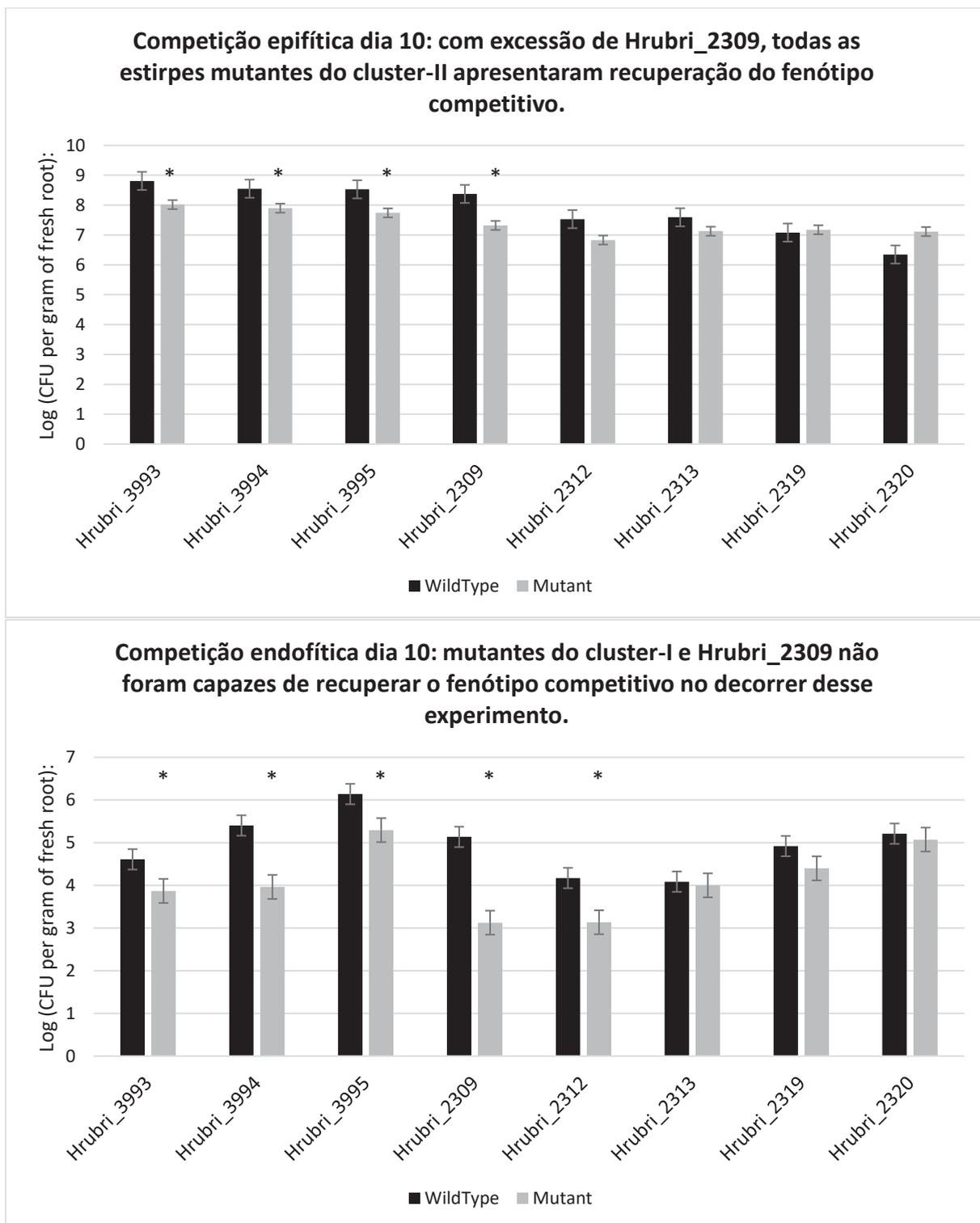


FIGURA 73: Perfil de competição durante adesão, colonizações epifíticas e endofítica para mutantes do T6SS clusters-I e II. A barra escura representa a estirpe selvagem e a barra clara representa a estirpe mutante. A soma das bactérias no inoculo é de 10^5 células, mantendo a concentração utilizada nos experimentos de colonização. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

TABELA 36: Dados comparativos em números absolutos durante a competição entre as estirpes mutantes dos T6SS e a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

| Estirpe: | Adesão | Dia 1 | Dia 3 | Dia 7 | Dia 10 | Dia 1 | Dia 3 | Dia 7 | Dia 10 | |
|----------------|------------------|--------|-------|-------|--------|-------------------|-------|-------|--------|--|
| | Epifítica | | | | | Endofítica | | | | |
| T6SS-II | | | | | | | | | | |
| Hrubri_2309 | 122,3 | 2307,4 | 919,8 | 101,1 | 11,4 | 44,0 | 8,1 | 542,4 | 102,4 | |
| Hrubri_2312 | 1086,7 | 31,9 | 4,04 | 4,0 | 5,0 | 70,4 | 3,1 | 239,9 | 10,9 | |
| Hrubri_2313 | 673,4 | 101,3 | 27,7 | 1,1 | 2,9 | 39,8 | 2,7 | 36,6 | 1,2 | |
| Hrubri_2319 | 106,0 | 133,2 | 60,9 | 9,3 | 0,8 | 34,7 | 17,7 | 14,3 | 3,3 | |
| Hrubri_2320 | 89,8 | 4,5 | 1,6 | 32,4 | 0,2 | 22,7 | 2,0 | 22,2 | 1,4 | |
| T6SS-I | | | | | | | | | | |
| Hrubri_3993 | 2,8 | 15,0 | 66,8 | 8,3 | 6,2 | 180,9 | 6,7 | 10,3 | 5,5 | |
| Hrubri_3994 | 4,4 | 22,8 | 12,4 | 5,2 | 4,5 | 9,7 | 8,0 | 8,4 | 27,6 | |
| Hrubri_3995 | 2,5 | 19,3 | 23,5 | 22,2 | 6,1 | 15,4 | 13,9 | 12,4 | 7,0 | |

Diferença em números absolutos na competência da competição durante a colonização da estirpe selvagem em relação a estirpe mutante.

A proteína Hcp é uma proteína efetora e carreadora de outras proteínas efetoras injetadas por esse sistema (COULTHURST, 2018; CAINFANELLI *et al.*, 2004). A secreção associada ao Hcp (gene HR_2309) depende de chaperonas para que as proteínas efetoras sejam dobradas de maneira adequada, o que torna essa etapa muito específica (LIEN *et al.*, 2017). Imaginamos que o Hcp do cluster II de *H. rubrisubalbicans* M1 seja responsável pela entrega de proteínas efetoras responsáveis por mediar a interação planta-bactéria, modulando a imunidade vegetal.

6.4. COMPARAÇÃO ENTRE O BIOFILME FORMADO PELA ESTIRPE SELVAGEM *H. rubrisubalbicans* M1 E AS ESTIRPES MUTANTES.

A figura 74 e tabela 37 mostram a formação de biofilme das estirpes mutantes do transcriptoma de interação com o sorgo de *H. rubrisubalbicans* M1. As estirpes

mutantes Hrubri_0842, Hrubri_1953 e Hrubri_0835 apresentaram menor formação de biofilmes consistentemente diminuídas no decorrer do experimento, por outro lado Hrubri_0839, Hrubri_3783 e Hrubri_3948 apresentaram produção de biofilme aumentada em todos os períodos. Embora essa informação pareça irrelevante, a produção de biofilme está diretamente relacionada na geração de sintomas da doença da estria vermelha do sorgo, estirpes menos virulentas que apresentam formação de biofilmes normal ou aumentada podem representar bons candidatos a fatores de geração de doença, como as estirpes Hrubri_0842, Hrubri_0839 e Hrubri_3948.

O biofilme representa um anteparo complexo e altamente regulado, seu aumento pode indicar uma forma de se proteger de processos altamente estressantes para a bactéria (BOLES *et al.*, 2008), já a formação diminuída pode ser mais relevante, podendo indicar fatores diretamente relacionados com a formação do biofilme, como observado na estirpe HR_0835, sugerindo que esse transportador ABC possa estar diretamente envolvido na secreção, maturação ou na formação biofilme em *H. rubrisubalbicans*.

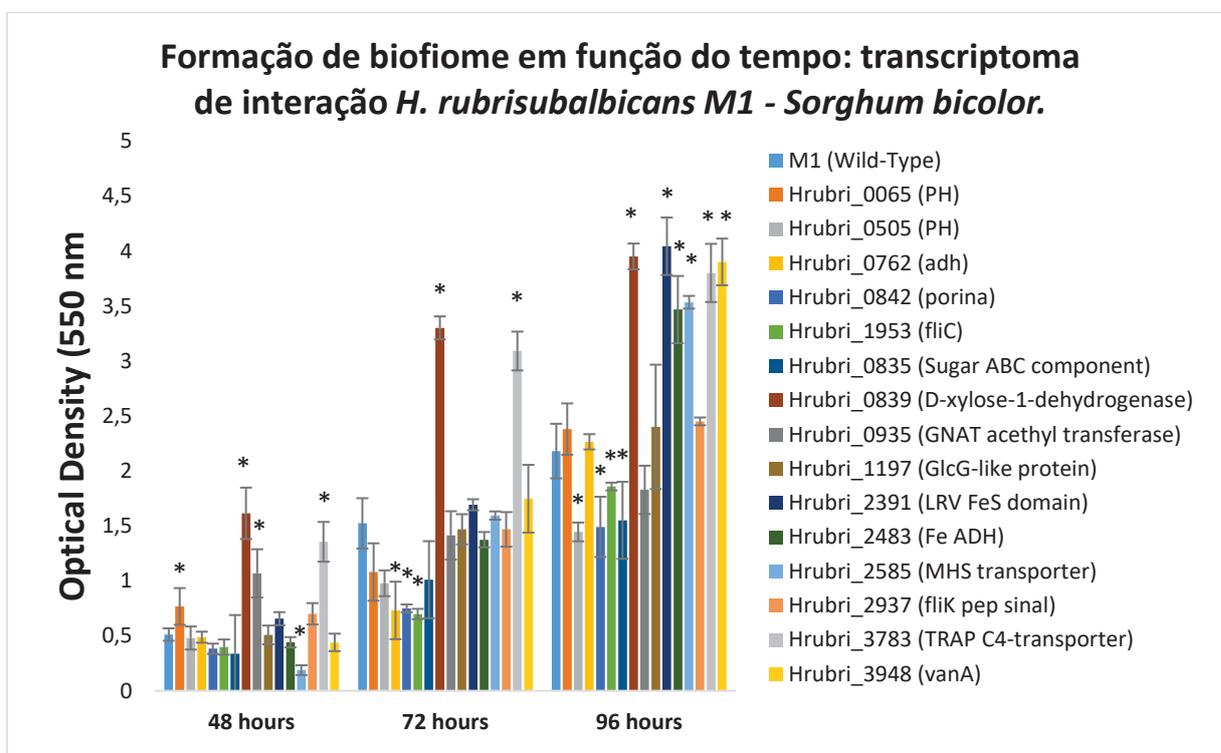


FIGURA 74: Formação de biofilme em função do tempo. Experimento realizado em octuplicatas. As setas foram adicionadas para chamar a atenção para estirpes mutantes com diferenças significativas em pelo menos duas ocasiões. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

TABELA 37: Dados comparativos em porcentagem entre as estirpes da interação planta-bactéria em relação a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

| | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| Hrubri_0065 (hypothetical protein) | 150% | 71% | 110% |
| Hrubri_0505 (hypothetical protein) | 94% | 64% | 67% |
| Hrubri_0762 (Adh) | 95% | 48% | 105% |
| Hrubri_0842 (porin) | 75% | 49% | 69% |
| Hrubri_1953 (FliC) | 78% | 46% | 86% |
| Hrubri_0835 (Sugar ABC component) | 66% | 66% | 72% |
| Hrubri_0839 (D-xylose-1-dehydrogenase) | 316% | 217% | 183% |
| Hrubri_0935 (GNAT acethyl transferase) | 209% | 93% | 85% |
| Hrubri_1197 (GlcG-like protein) | 99% | 96% | 111% |
| Hrubri_2391 (LRV FeS domain) | 128% | 111% | 187% |
| Hrubri_2483 (Fe ADH) | 86% | 90% | 160% |
| Hrubri_2585 (MHS transporter) | 37% | 105% | 164% |
| Hrubri_2937 (FliK pep sinal) | 137% | 96% | 113% |
| Hrubri_3783 (TRAP C4-transporter) | 265% | 203% | 176% |
| Hrubri_3948 (VanA) | 86% | 115% | 181% |

Relação entre a produção de biofilme das estirpes mutantes em relação a estirpe selvagem em função do tempo. Resultados dos mutantes do transcriptoma de interação entre *H. rubrisubalbicans* M1 e o *Sorghum bicolor*.

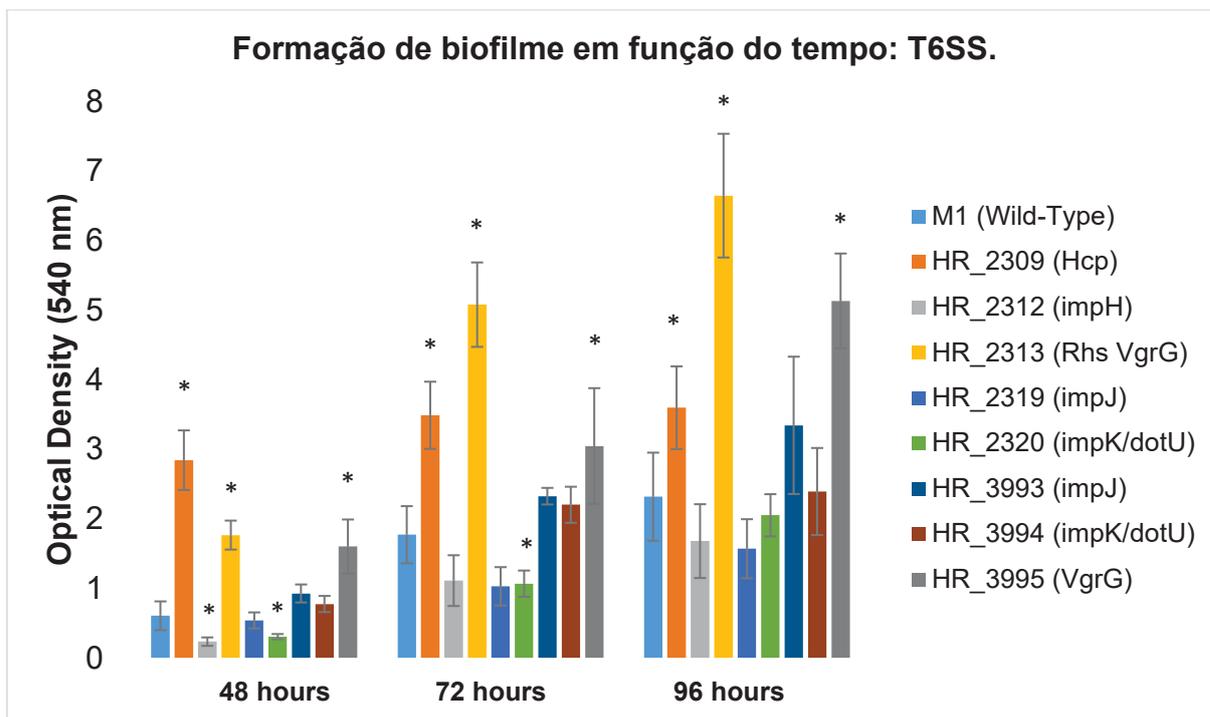


FIGURA 75: Formação de biofilme em função do tempo para estirpes mutantes do grupo 2-T6SS. Experimento realizado em octuplicatas. Os asteriscos adicionados para chamar a atenção para estirpes mutantes com diferenças significativas em pelo menos duas ocasiões. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0.05$ são assinaladas com (*)

TABELA 38: Dados comparativos em porcentagem entre as estirpes dos T6SS em relação a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

| | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|-------------------------|----------|----------|----------|
| Hrubri_2309 (Hcp) | 471% | 197% | 155% |
| Hrubri_2312 (ImpH) | 38% | 63% | 72% |
| Hrubri_2313 (Rhs VgrG) | 292% | 287% | 287% |
| Hrubri_2319 (ImpJ) | 89% | 58% | 68% |
| Hrubri_2320 (ImpK/DotU) | 50% | 60% | 88% |
| Hrubri_3993 (ImpJ) | 153% | 131% | 144% |
| Hrubri_3994 (ImpK/DotU) | 128% | 124% | 103% |
| Hrubri_3995 (VgrG) | 265% | 172% | 222% |

Relação entre a produção de biofilme das estirpes mutantes em relação a estirpe selvagem em função do tempo. Resultados dos mutantes do T6SS relativa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

Quanto a produção de biofilmes pelas estirpes mutantes do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1, mostrados na figura 75 e tabela 38 e reforçado pela figura 76. Podemos observar perfil mais claro, com envolvimento direto das proteínas efetoras de ambos os T6SS na formação do biofilme. Desde os trabalhos de Pukatzi (2006) e Southey-Pillig (2005), sabe-se do envolvimento do T6SS na formação de biofilmes. Um problema são as respostas distintas que a falta desse sistema trás em famílias bacterianas diferentes. No gênero *Pseudomonas* já foi observado que mutações nesse sistema podem levar a aumento na produção de biofilme (oposto do observado em *E. coli*) e que especificamente em *P. aeruginosa* a maturação do biofilme é Hcp-dependente. Em *H. rubrisubalbicans* M1 podemos observar que mutações nas proteínas VgrG e Hcp levam a um aumento significativo na produção de biofilmes. É interessante mostrar que a mutação nos T6SS leva a diminuição da excreção de exopolissacarídeos (figura 76) no T6SS-II e aumento no T6SS-I, sugerindo alteração na formação do biofilme por vias distintas, onde no caso do T6SS-II parece haver compensação por outras macromoléculas, consistente com os dados observados a partir do ensaio de microscopia eletrônica de transmissão (material suplementar – figuras 100S para a estirpe mutante Hrubri_2309, 114S Hrubri_2313 e 149S Hrubri_3995), onde as estirpes mutantes do cluster-II apresentaram perfil mucoide visualmente alterado em relação a estirpe Hrubri_3995, com espalhamento fortemente aumentado na superfície hidrofílica da matriz polimérica de nitrocelulose, sugerindo composição mais hidrofílica e menos estruturada.

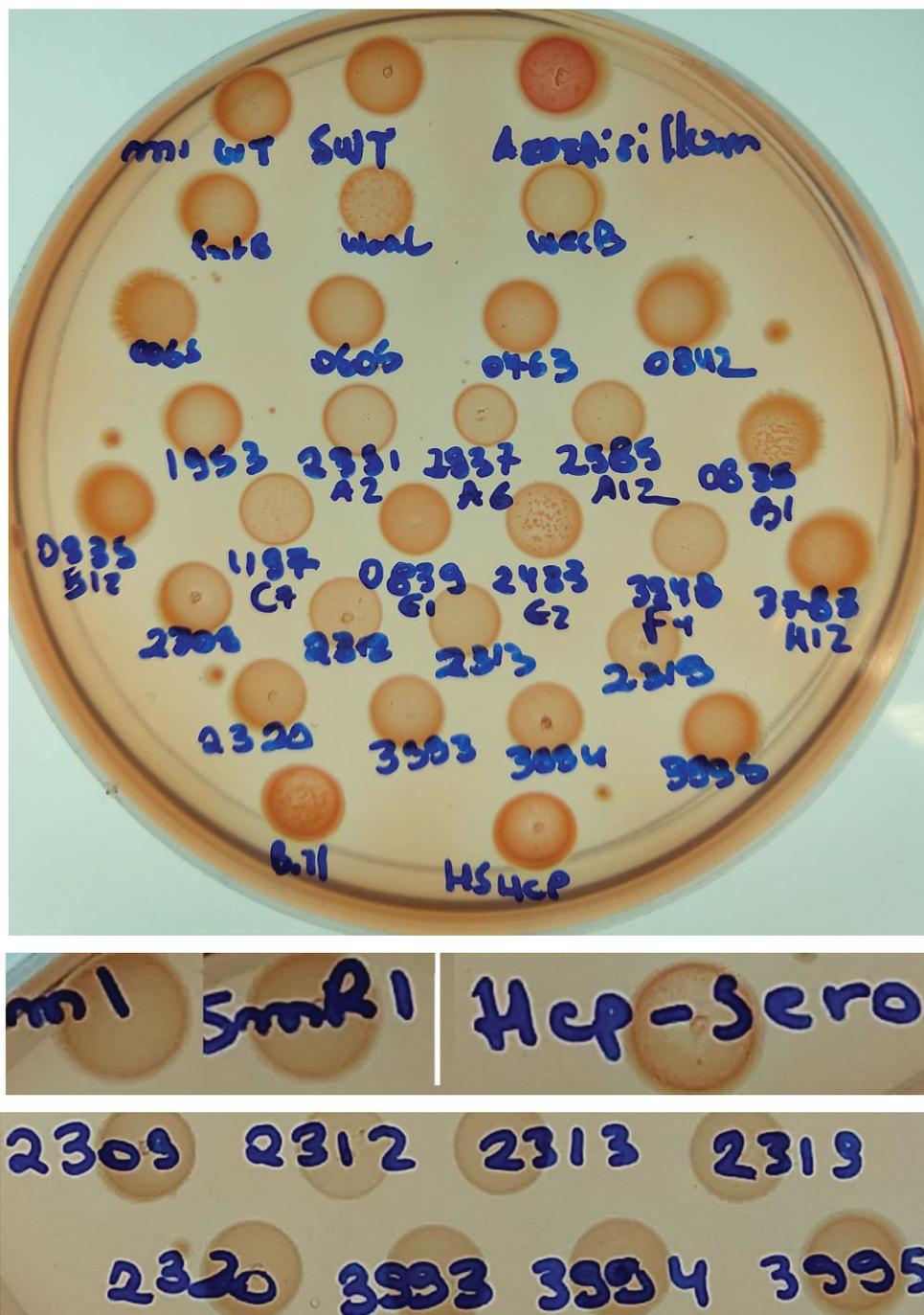


FIGURA 76: Teste de secreção de polissacarídeos utilizando vermelho congo.

6.5. Ensaio de MOTILIDADE do tipo “*Swarming*” das estirpes selvagem e mutantes de *H. rubrisubalbicans*

A figura 77 e a tabela 39 mostram os resultados para motilidade do tipo “*swarming*” (0,3% de ágar) para as estirpes mutantes referentes ao transcriptoma de interação. As estirpes mutantes Hrubri_0762, Hrubri_1953, Hrubri_0835, Hrubri_0839, Hrubri_0935, Hrubri_1197, Hrubri_2483, Hrubri_2585, Hrubri_2585, Hrubri_2937 e Hrubri_3783 apresentaram alteração significativa em relação a estirpe selvagem.

Dessas estirpes mutantes, grande parte conta com problemas em transportadores de carboidratos (Hrubri_0835, Hrubri_0839 e Hrubri_0935) ou na transformação de biomoléculas em ATP (Hrubri_1197 e Hrubri_2585), resultando na diminuição da motilidade devido ao grande gasto energético, tanto da síntese do aparato quanto da geração de energia motriz. As estirpes mutantes Hrubri_0762 e Hrubri_2483 codificam álcool desidrogenases, relacionadas com o detox de diversas moléculas relacionadas com a adaptação ao ambiente, sua ausência pode comprometer a sobrevivência da bactéria, comprometendo a motilidade. Com exceção da estirpe mutante Hrubri_1953, que deveria apresentar fenótipo de motilidade diminuída, a motilidade parece não ter sido afetada diretamente, sendo as diminuições oriundas de deficiências no metabolismo energético e detox (LEWIS *et al.*, 2002; PHAN *et al.*, 2018).

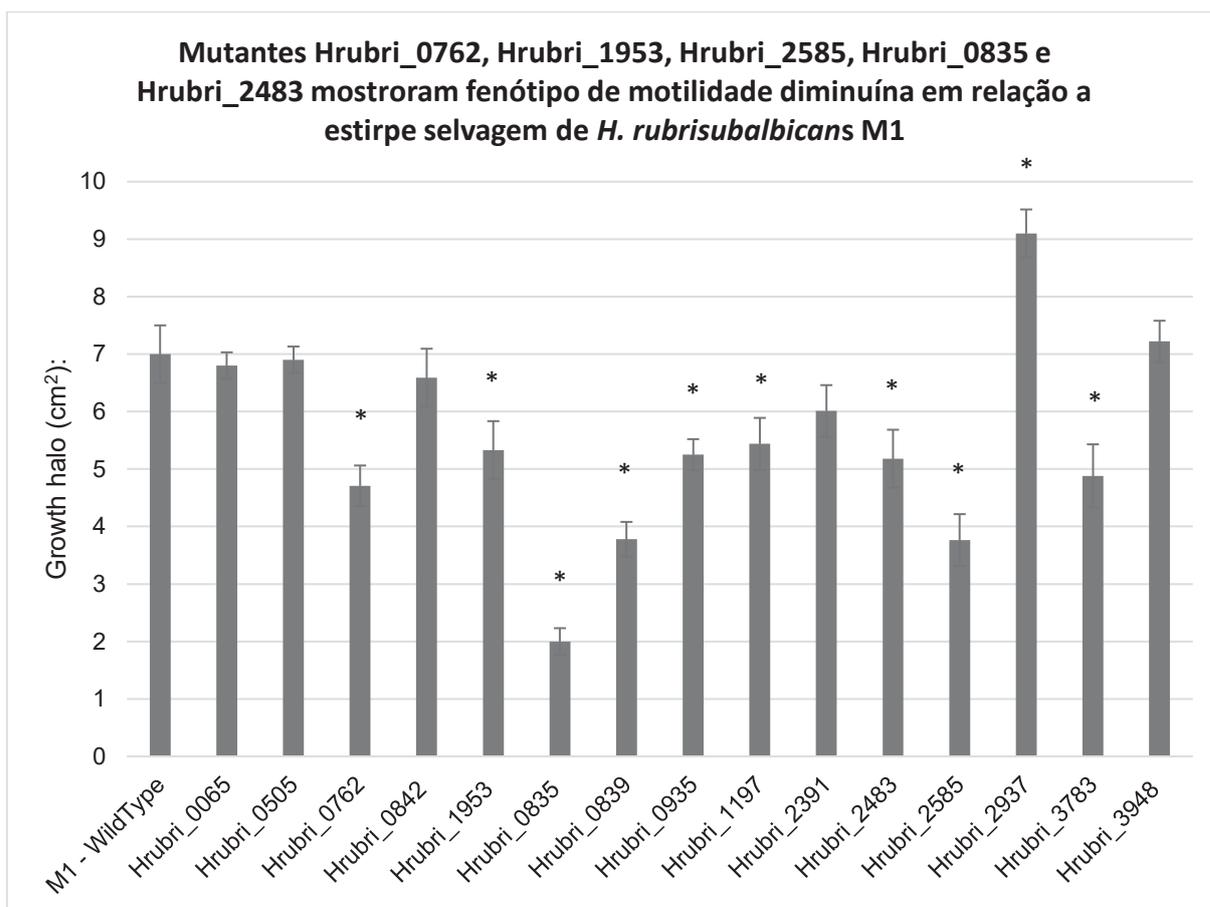


FIGURA 77: Motilidade tipo ‘swarming’. D.O.₅₉₅ foi ajustada para 1,0 e 10 μ L foram inoculados no centro de uma placa contendo NfbHPN contendo 0,3% de ágar. Após incubá-la por 48 horas a 30°C, os halos foram medidos e as áreas plotadas. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor $p < 0,05$ são assinaladas com (*)

TABELA 39: Dados comparativos em porcentagem da motilidade tipo “swarming” entre as estirpes mutantes da interação planta-bactéria e a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

| Motilidade: | | | | | |
|-------------|-----|-------------|-----|-------------|------|
| Hrubri_0065 | 97% | Hrubri_0835 | 29% | Hrubri_2483 | 74% |
| Hrubri_0505 | 99% | Hrubri_0839 | 54% | Hrubri_2585 | 54% |
| Hrubri_0762 | 67% | Hrubri_0935 | 75% | Hrubri_2937 | 130% |
| Hrubri_0842 | 94% | Hrubri_1197 | 78% | Hrubri_3783 | 70% |
| Hrubri_1953 | 76% | Hrubri_2391 | 86% | Hrubri_3948 | 103% |

Comparação entre as médias da motilidade tipo “swarming” dos mutantes do transcriptoma de interação entre *H. rubrisubalbicans* M1 e o *Sorghum bicolor* e a estirpe selvagem.

A figura 78 e tabela 40 mostram os resultados de motilidade tipo 'swarming' para os mutantes do T6SS. Podemos observar que a estirpe mutante no gene Hrubri_2309 apresentou motilidade reduzida em relação a estirpe selvagem. Essa alteração pode ser explicada pela produção aumentada de biofilme apresentada por essa estirpe. A formação do biofilme depende de diversas estruturas proteicas, como flagelos e pilus. Alterações na composição e quantidade formada de biofilme pode afetar os níveis de expressão genica dessas estruturas sinergicamente, como forma de complementar a ausência de algum elemento importante (O'TOOLE *et al.*, 1998).

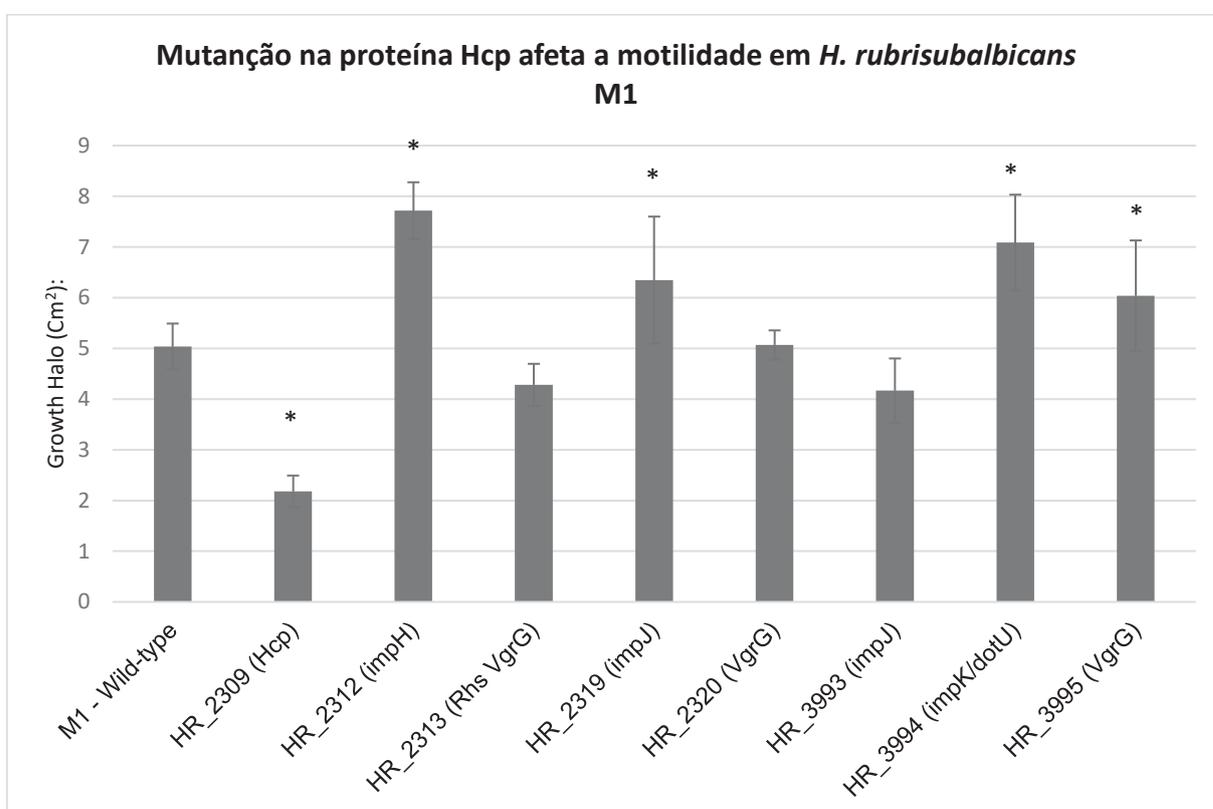


FIGURA 78: Motilidade tipo 'swarming' das estirpes mutantes do grupo 2-T6SS. D. O₅₉₅ foi ajustada para 1,0 e 10 µL foram inoculados no centro de uma placa contendo NfbHPN contendo 0,3% de ágar. Após incubá-la por 48 horas a 30°C, os halos foram medidos e as áreas plotadas. Experimento realizado em triplicatas. Análise estatística é representada pelo teste T de student, significâncias com valor p < do que 5% são assinaladas com (*)

TABELA 39: Dados comparativos em porcentagem da motilidade tipo “swarming” entre as estirpes mutantes dos T6SS e a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1.

| Motilidade: | | | |
|--------------------|------|----------------|------|
| T6SS cluster-II | | T6SS cluster-I | |
| Hubri_2309 | 43% | Hubri_3993 | 83% |
| Hubri_2312 | 153% | Hubri_3994 | 141% |
| Hubri_2313 | 85% | Hubri_3995 | 120% |
| Hubri_2319 | 126% | | |
| Hubri_2320 | 101% | | |

Relação que comparação entre as médias da motilidade tipo *swarming* dos mutantes do transcriptoma de interação entre *H. rubrisubalbicans* M1 e o *Sorghum bicolor* e a estirpe selvagem.

6.6. SINAIS DA ESTRIA VERMELHA DO SORGO

A colonização do sorgo por *H. rubrisubalbicans* M1 é intensa nos tecidos condutores (meta e protoxilemas). A colonização intensa associada a alta produção de biofilme pode levar ao entupimento desses vasos condutores levando a hipóxia localizada, resultando em processo necrótico (JAMES *et al.*, 1997; TULESKI *et al.*, 2019).

Embora a função dos biofilmes seja bem descrita na geração da estria vermelha em *Sorghum bicolor* por *H. rubrisubalbicans* M1, outros fatores não relacionados com com biofilmes não foram caracterizados.

- 6.6.1. Sinais da estria vermelha do sorgo: Transportador ABC de açúcares e porina de membrana externa (OmpW) afetam a capacidade de geração da doença em *H. rubrisubalbicans* M1.

As figuras 79 e 80 mostram a geração de sinais da estria vermelha em *Sorghum bicolor* pelas estirpes mutantes referentes ao transcriptoma de interação com o sorgo. Obtivemos três estirpes mutantes com diminuição significativa dos sinais da estria vermelha (estirpes Hrubri_0842, Hrubri_3948 e Hrubri_0835 – sendo essa última incapaz de gerar sinais da doença mesmo após 28 dias).

Sabemos que a formação de biofilme é um dos fenótipos que norteiam a geração de sinais da estria vermelha do sorgo por *H. rubrisubalbicans* M1 (JAMES *et al.*, 1997; TULESKI *et al.*, 2019). Quando comparamos os resultados de formação de biofilme com os resultados de geração de sinais da estria vermelha, observamos que embora as estirpes mutantes Hrubri_0835 e Hrubri_0842 tenham apresentado diminuição do processo-doença, também apresentaram menor produção de biofilme, de modo que não é possível inferir envolvimento direto do produto desses genes no processo doença. Por outro lado, Hrubri_3948, apresentou sinais da doença diminuídos mesmo produzindo quantidades significativamente maiores de biofilme, indicando que a vanilato-o-demetilase possa estar diretamente relacionado com o processo-doença na interação de *H. rubrisubalbicans* M1 com o sorgo.

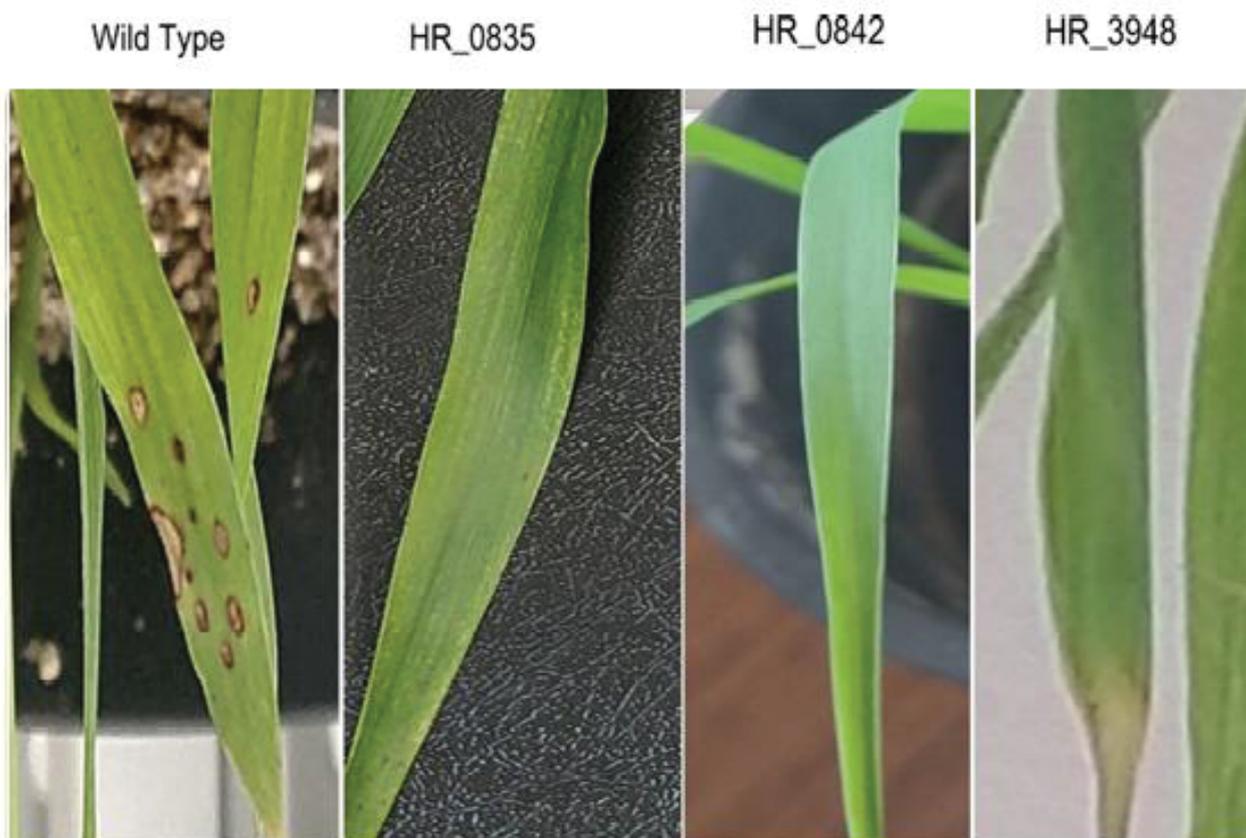


FIGURA 79: Estirpes que não geraram sinais necróticos em *Sorghum bicolor*. Esse experimento é realizado através da inoculação ativa, através da perfuração do colmo da planta e inoculação de 10^5 células. A planta é mantida a 25°C por até 45 dias. Experimento realizado em triplicatas.

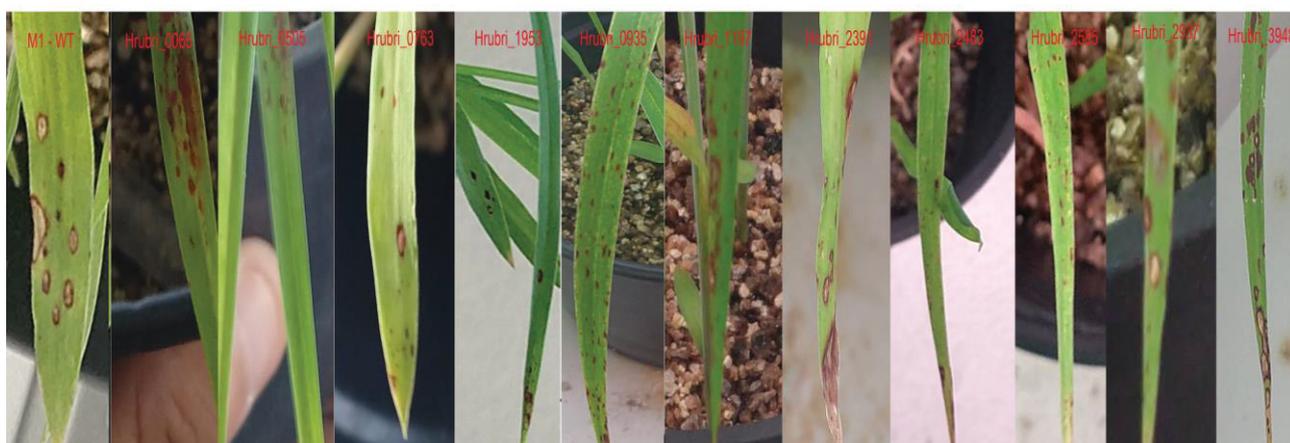


FIGURA 80: Estirpes causadoras de doença da estria vermelha no sorgo suscetível. Esse experimento é realizado através da inoculação ativa, através da perfuração do colmo da planta e inoculação de 10^5 células. A planta é mantida a 25°C por até 45 dias. Experimento realizado em triplicatas.

6.6.2. Sinais da estria vermelha do sorgo: Hcp do cluster-II do T6SS de *H. rubrisubalbicans* está relacionado com o processo-doença.

As figuras 81, 82 e 83 mostram a geração de sinais da estria vermelha em *Sorghum bicolor* pelas estirpes mutantes para o T6SS. Obtivemos resultados interessantes para ambos os sistemas, com dados que indicam envolvimento do T6SS-II na interação planta-bactéria e o T6SS-I na competição bacteriana. Nessas estirpes, apenas Hrubri_2309 apresentou diminuição dos sinais da doença, mesmo apresentando maior formação de biofilme do que a estirpe selvagem (FIGURA 218), sugerindo envolvimento direto do Hcp2 ou de alguma proteína efetora carregada esse Hcp na formação da doença, diretamente no processo-doença ou na inibição da imunidade vegetal. A presença de um Rh VgrG nos indica a possibilidade de secreção de nucleases, comumente relacionadas com o controle populacional ou limitação do crescimento populacional em processos de simbiose. A ausência desse Rh VgrG na mutante Hrubri_2313 levou a sinais aumentados da doença e comprometimento do crescimento em sorgo inoculado (FIGURAS 224 e 226), a ausência da secreção das proteínas efetoras associadas a esse VgrG pode ter levado ao descontrole da infecção, que pode ser observado na FIGURA 225, onde a mutante ImpJ desenvolveu sinais de doença mesmo em plântulas, replicando os mesmos resultados observados por Bladergroen (2003).

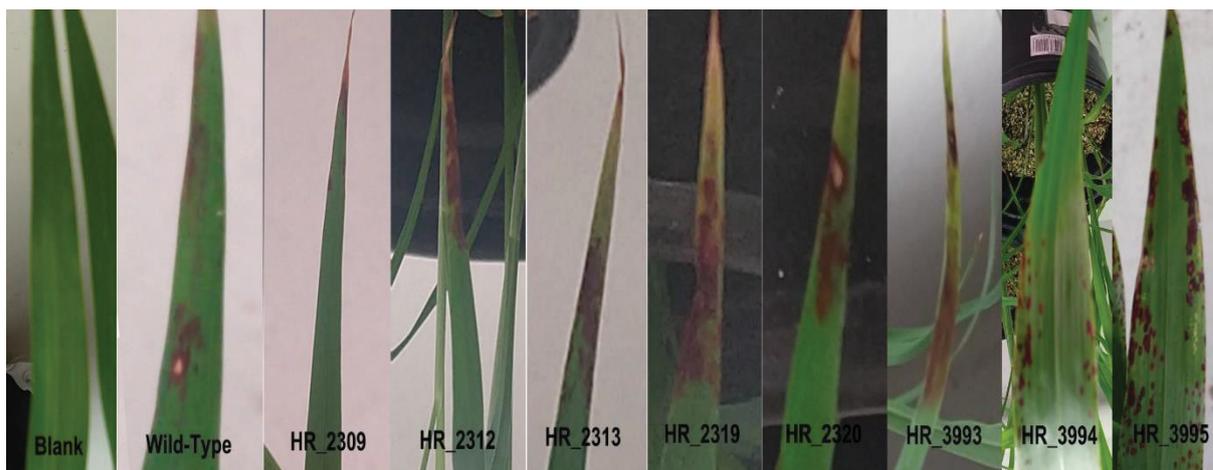


FIGURA 81: Formação de sinais necróticos por mutantes do T6SS em *Sorghum bicolor*. Esse experimento é realizado através da inoculação ativa, através da perfuração do colmo da planta e inoculação de 10^5 células. A planta é mantida a 25°C por até 45 dias. Experimento realizado em triplicatas.



FIGURA 82: mutante Hrubri_2312 causa estria vermelha em plântulas. com 3 dias de inóculo.

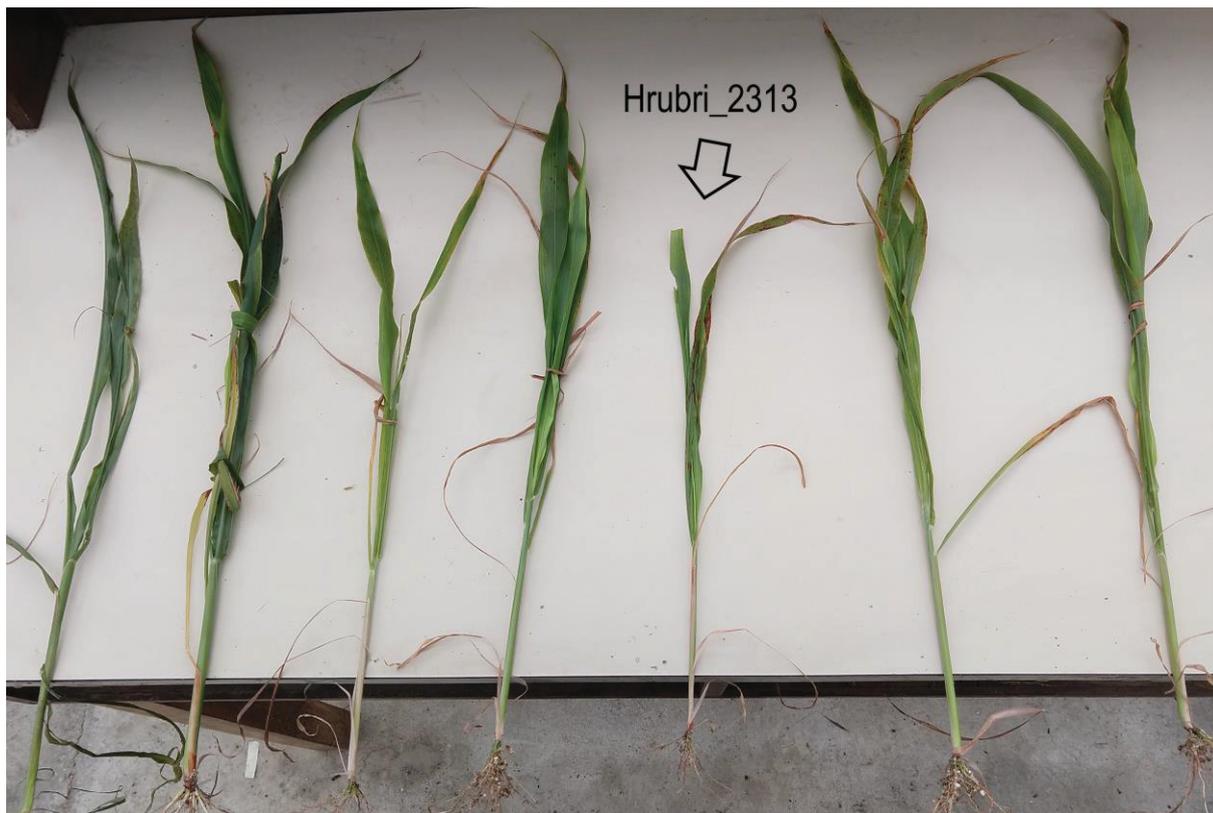


FIGURA 83: Inoculação com mutante Hrubri_2313 compromete o crescimento de *Sorghum bicolor*.

Já as estirpes do cluster-I, o descontrole competitivo leva a menor competição dentro da própria população que por sua vez pode levar à maior número de invidos, resultando em maior severidade da doença.

6.7. EXPRESSÃO GÊNICA DOS CLUSTERS QUE CODIFICAM PARA O T6SS DE *H. rubrisubalbicans* M1

Quanto a expressão genica das regiões promotoras dos clusters que codificam para o T6SS, resumidos nas figuras 84 e 85 mostradas a seguir, é possível observar características distintas entre os clusters que reforçam as hipóteses levantadas até esse momento de que o cluster-I está relacionado com a competição e auto-supressão do crescimento colonial e que o cluster-II está diretamente relacionado com a

interação planta-bactéria e seu processadoença. Na figura 84 é possível verificar que o cluster-I está sendo constitutivamente expresso através da região promotora do gene *Hrubri_3976*, diretamente relacionada com a taxa de crescimento durante curva de crescimento do *H. rubrisubalbicans* M1. As outras condições testadas (todas em 6 horas de crescimento colonial) não alteraram positivamente a expressão gênica em nenhuma das regiões promotoras presentes no cluster-I. Outra característica importante diz respeito à perda total da expressão gênica para ambos os clusters na presença do EDTA, sugerindo envolvimento de algum metal divalente na ativação do T6SS em *H. rubrisubalbicans* M1.

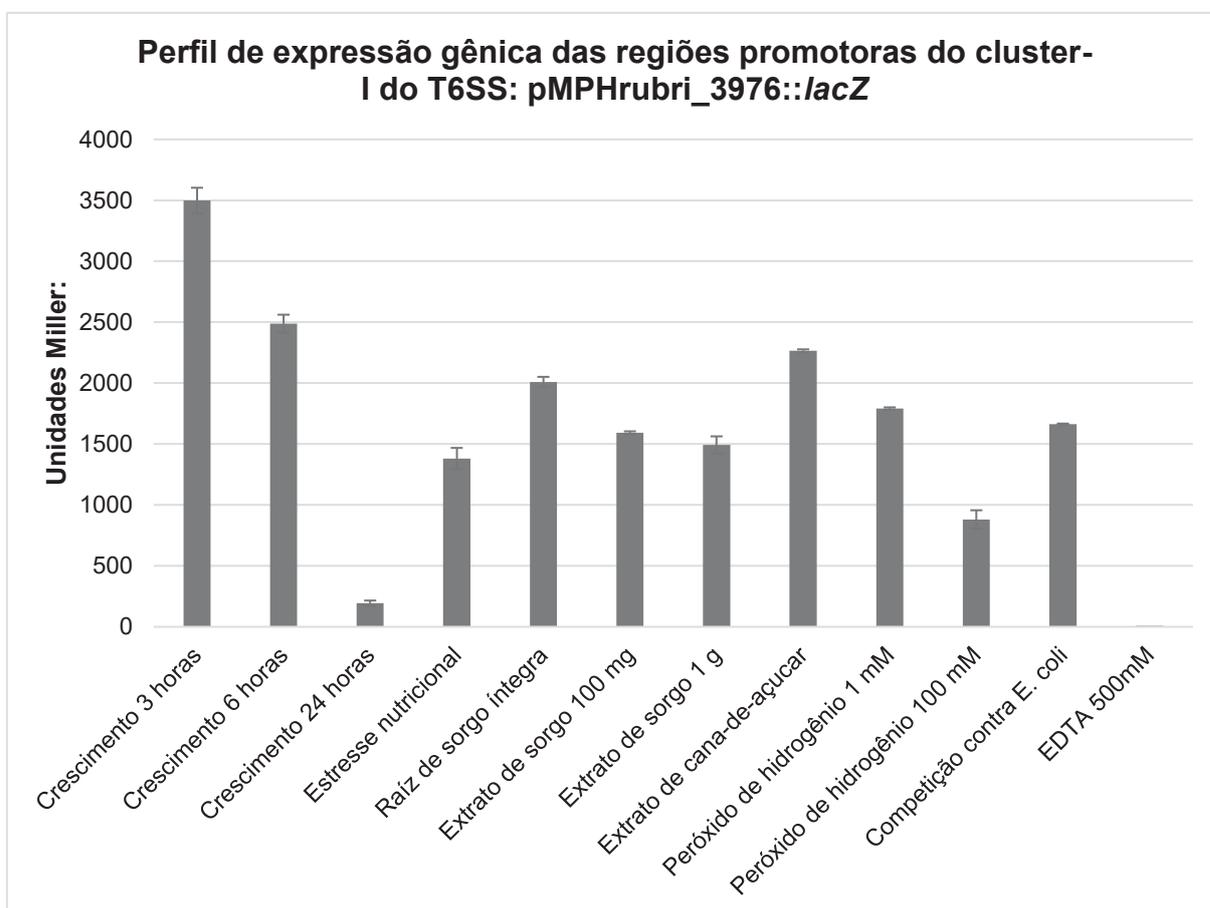


Figura 84: Ensaio de expressão gênica da região promotora do gene *Hrubri_3976* do cluster-I do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 em todas as condições testadas nessa tese. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril, os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão, porém foram omitidos nesse gráfico por ter sido mostrado no item de resultados. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

Já para o cluster-II (figura 85), não apenas é possível observar que a porção 1 da região promotora do gene *Hrubri_2308* (construção fw1Rv) é a responsável pela ativação de cluster, como também esses dados da expressão gênica reforçam a hipótese de seu envolvimento na interação planta-bactéria, indo de acordo com a hipótese levantada por Ma e colaboradores (2015).

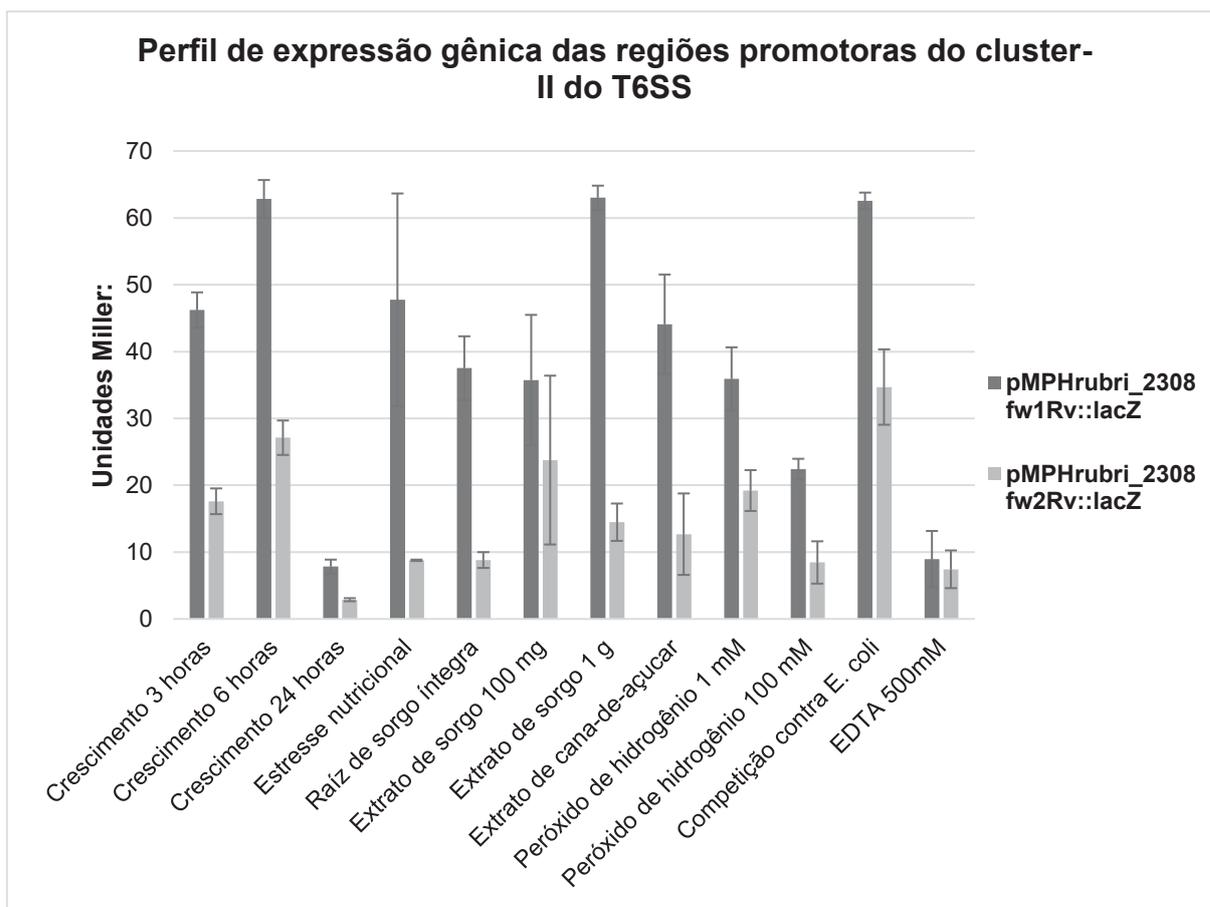


Figura 85: Ensaio de expressão gênica das regiões promotoras do gene *Hrubri_2308* do cluster-II do T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 em todas as condições testadas nessa tese. Experimento conduzido em três triplicatas. O branco da reação é feito através da adição de Nfb malato suplementado estéril, os controles negativos do experimento são *H. rubrisubalbicans* M1 contendo os vetores pMP220 ou pPW452 sem regiões promotoras ligadas ao sítio de expressão, porém foram omitidos nesse gráfico por ter sido mostrado no item de resultados. (*) foram empregados para os resultados com $p < 0,05$ em teste T-student.

Ma (2015) descreve que alguns T6SS, principalmente aqueles presentes em bactérias invasoras, é necessária a lise de uma frente invasora pioneira para que

alguma molécula sinalizadora seja liberada e ative a codificação do T6SS das próximas frentes invasoras, de modo que um ensaio de β -galactosidase não seria adequado para verificar a ativação gênica, porém mesmo assim foi possível ver leve ativação gênica sob estresse nutricional, esperado durante o processo de invasão da planta, e na presença de raízes e extratos vegetais, reforçando novamente a hipótese de que o cluster-II de *H. rubrisubalbicans* M1 está relacionado com a invasão da planta hospedeira.

6.8. COMPETIÇÕES DIRETAS

Devido a grande quantidade de gráficos, a tabela 41 conta com o resumo dos dados referentes as competições diretas entre as estirpes mutantes do T6SS e as estirpes selvagens de *H. rubrisubalbicans* M1, *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Sp7.

TABELA 41: Resumo comparativo da competição entre as estirpes mutantes dos T6SS e as estirpes selvagens de *H. rubrisubalbicans* M1, *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* FP2.

| | Competição M1 | Competição SmR1 | Competição Sp7 |
|------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| Selvagem M1 | | M1 > SmR1 | Sp7 > M1 |
| T6SS cluster-I | | | |
| Hubri_3993 | Hubri_3993 > M1 | Hubri_3993 > SmR1 | Hubri_3993 > Sp7 |
| Hubri_3994 | Hubri_3994 > M1 | Hubri_3994 < SmR1 | Hubri_3994 > Sp7 |
| Hubri_3995 | Hubri_3995 = M1 | Hubri_3995 < SmR1 | Hubri_3995 > Sp7 |
| T6SS cluster-II | | | |
| Hubri_2309 | Hubri_2309 = M1 | Hubri_2309 > SmR1 | - |
| Hubri_2312 | Hubri_2312 = M1 | Hubri_2312 > SmR1 | - |
| Hubri_2313 | Hubri_2313 < M1 | Hubri_2313 = SmR1 | - |
| Hubri_2319 | Hubri_2319 < M1 | Hubri_2319 > SmR1 | - |
| Hubri_2320 | Hubri_2320 = M1 | Hubri_2320 < SmR1 | - |

Para discutir a competição em função do T6SS é necessário pontuar algumas características, que utilizam o trabalho de LeRoux e colaboradores (em PUKATSKI, 2009) e Sana e colaboradores (2019). Os T6SS podem ser regulados negativamente através de 2 mecanismos fosforilativos: 1 - proteínas quinases que inativam a ATPase, como as proteínas Ppka e Paaa presentes em *P. aeruginosa*, *B. malei* e *A. brasilense*, achado nesse trabalho; 2 – fosforilação da proteína TagF, que está comumente associada ao complexo basal, o inibindo. No caso de *H. seropedicae* SmR1 e *H. rubrisubalbicans* M1, não estão presentes nenhum desses mecanismos, de modo que seus T6SS devem estar constitutivamente ativos, deste modo podemos classifica-los como bactérias predadoras. Já em espécies como *P. aeruginosa* é necessário estímulo, que pode ser através de perfurações pelo T6SS de competidoras ativas ou mesmo pela sinalização através de moléculas liberadas pela lise resultante da competição, que levam a sua ativação, dessa forma podemos considera-las contra atacantes. Por ultimo temos aquelas bactérias que não codificam T6SS, consideradas pacifistas.

Esse experimento visa verificar: 1 - competição direta por perfuração, que pode levar a lise, que é observado entre as estirpes mutantes e a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1, uma vez que todas contam com proteínas de imunidade contra seus próprio T6SS; 2 – ação tóxica específica, causada pelas proteínas efetoras, entre *H. rubrisubalbicans* M1 e suas mutantes contra *H. seropedicae* SmR1, uma vez que não contam com proteínas de imunidade um contra o outro; 3 – ativação do T6SS de *A. brasilense* Sp7, estirpe contra atacante que codifica proteína quinase Paaa.

Embora a análise desses dados seja desafiadora, esse experimento permitiu reforçar o caráter competitivo do cluster-I e também o fenótipo supressor do crescimento colonial, quando associado ao ensaio de geração dos sintomas da estria vermelha no sorgo.

A primeira análise a se fazer é da competição entre as estirpes selvagens, dos controles, visando demonstrar que *H. rubrisubalbicans* M1 vence a competição contra *H. seropedicae* SmR1 e que, até então não era sabido, *A. brasilense* Sp7 vence a competição contra *H. rubrisubalbicans* M1, aqui é possível observar a ativação do T6SS de *A. brasilense*, que inicia perdendo a competição até o momento de 3 horas de co-cultura, e então passa a derrotar *H. rubrisubalbicans* M1, característica importante na elucidação da função do cluster-I de *H. rubrisubalbicans* M1.

Mutantes do T6SS-I: a estirpe mutante mais importante desse cluster é a Hrubri_3995, que conta com deficiência na proteína pontiaguda VgrG, dificultando a inoculação de proteínas efetoras em células competidoras. Como esperado, a presença de proteínas de imunidade em sua competição contra a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 não levou a diferença competitiva significativa, por outro lado, essa estirpe mutante passou a perder a competição contra a estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1, uma vez que conta com dificuldades de inocular proteínas efetoras e não conta com proteína de imunidade, já contra *A. brasilense* Sp7, a estirpe mutante passa a vencer a competição, isso se deve justamente pela dificuldade de ativar o T6SS de *A. brasilense* Sp7, confirmando seu perfil contra atacante. Quando associado ao experimento de geração de sintomas da estria vermelha do sorgo, é possível verificar o fenótipo de supressão do crescimento. As estirpes mutantes do cluster-I apresentaram sintomas atenuados da doença no início do experimento e sintomas mais severos do que a estirpe selvagem a partir da segunda semana, sugerindo perda do mecanismo de controle populacional e não algum envolvimento direto no processo-doeça, como observado com as estirpes Hrubri_2309 e Hrubri_2313 do cluster-II.

Já o cluster-II, observamos perfil competitivo pouco alterado, sendo a estirpe mutante Hrubri_2313 a estirpe mais importante, representando deficiência na proteína VgrG. A fenótipo competitivo para esse cluster não apresentou alterações tão significantes quanto os presentes no cluster-I, porém é possível observar leve diminuição no perfil competitivo, principalmente contra *H. seropedicae* SmR1. Uma possível explicação diz respeito ao efeito sinérgico, onde as proteínas efetoras associadas a proteínas VgrG apresentam preferência, mas em caso de defeito podem apresentar promiscuidade durante a montagem da estrutura, levando a secreção de proteínas efetoras inespecíficas, como discutido por Russel e colaboradores (2013). Outra hipótese reforçando a hipótese de que o T6SS-II não está diretamente relacionado com perfil competitivo, as estirpes Hrubri_2309 e Hrubri_2313 produzem grandes quantidades de biofilme, já foi mostrado que grandes produtores de biofilme contam com número aumentado de células dormentes, com baixo nível metabólico, pré-adaptadas na formação de biofilme, numa espécie de “*hedge*” (BRENDA, 2005). Esse perfil metabólico diminuído pode ter representado desvantagem competitiva, levando a perda de deslocamento do *H. seropedicae* SmR1.

7. CONCLUSÃO

Através de dados de transcriptoma feito na interação entre *H. rubrisubalbicans* M1 e o *Sorghum bicolor* e as diversas análises genômicas e fenotípicas, foi possível caracterizar diversos genes diretamente relacionados com a interação planta-bactéria de *H. rubrisubalbicans* M1 com *Sorghum bicolor* e também caracterizar e definir as funções dos clusters distintos que codificam o sistema de secreção tipo VI em *H. rubrisubalbicans* M1.

Todas as estirpes mutantes construídas apresentaram fenótipos alterados, sendo que algumas estirpes apresentaram alterações severas em múltiplos fenótipos relacionados com a interação planta-bactéria (colonização e competição durante a colonização do sorgo, formação de biofilme, motilidade e geração de sintomas da estria vermelha do sorgo, principalmente), entre as estirpes mutantes mais promissoras temos: Hrubri_0065 (homologo pilT), Hrubri_0835 (transportador ABC), Hrubri_0839 (D-xilose desidrogenase), Hrubri_0842 (porina de membrana externa, transportador ABC), Hrubri_0935 (outro transportador ABC), Hrubri_1953 (FliC), Hrubri_2483 (ADH tipo III), Hrubri_3783 (sistema C4-TRAP do metabolismo de ácido málico) e Hrubri_3948 (VanA). Mostrando que nossa busca por genes relacionados com a interação planta-bactéria foi positiva e conclusiva.

As estirpes mutantes mais afetadas estão relacionadas com os transportadores ABC de múltiplos açúcares (Hrubri_0835 e Hrubri_0839 do transporte de xilose/trealose/ramnose) e peptídeo/níquel (Hrubri_0935), apresentando todos os fenótipos analisados alterados em relação a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1, sendo Hrubri_0835 a estirpe mutante mais afetada e a única estirpe que não desenvolveu sintomas da estria vermelha no sorgo. Esse transportador ABC de múltiplos açúcares parece estar diretamente envolvido com o processo-doença entre *H. rubrisubalbicans* M1 – *Sorghum bicolor*, hipótese reforçada pela estirpe Hrubri_0839, que além de apresentar diminuição no fenótipo de virulência, não apresentou diminuição na formação de biofilme, principal fenótipo associado com a virulência.

Outras estirpes que apresentaram diminuição no fenótipo de virulência sem diminuir a formação de biofilme foram as estirpes Hrubri_0842 e Hrubri_3783,

sugerindo envolvimento direto dessa porina de membrana externa OmpW do sistema do metabolismo de carbono C4-TRAP no processo-doença de *H. rubrisubalbicans* M1 – *Sorghum bicolor*, representando ótimos alvos para estudos posteriores para compreender esse complexo mecanismo de simbiose/epifitismo.

Quanto aos sistemas de secreção tipo VI, ambos os clusters que codificam os T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 estão envolvidos na formação e maturação do biofilme, mostrando formação extremamente aumentada para as estirpes mutantes das proteínas VgrG (Hrubri_2313 e Hrubri_3995) e Hcp (Hrubri_2309 e Hrubri_3988 – este apenas em microscopia eletrônica). Além da formação de biofilme, foi possível caracterizar o perfil de expressão gênica e quais as funções específicas para ambos os clusters.

O cluster-I que codifica o T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 é expresso de forma constitutiva, através da região promotora do gene *Hrubri_3976*, e não apresentando formas de regulação adicionais. A ativação da expressão gênica está diretamente relacionada apenas com a taxa de crescimento celular e é possivelmente controlado por algum metal divalente. O T6SS-I é responsável pela competitividade interespecífica e seu efeito tóxico está relacionado com proteínas efetoras associadas ao VgrG, fenótipo verificado durante as competições contra *H. seropedicae* SmR1 e *A. brasilense* Sp7. Outra característica importante do T6SS-I diz respeito a supressão do crescimento colonial, verificado através do experimento de expressão gênica e do perfil do desenvolvimento tardio dos sintomas da estria vermelha no sorgo pelas estirpes mutantes.

Por outro lado, o cluster-II que codifica o T6SS de *H. rubrisubalbicans* M1 não apresenta homologia com outras espécies do gênero *Herbaspirillum*, tendo proximidade com o fitopatógeno *B. glumae*, e assim como essa bactéria, parece estar diretamente associado com o processo de invasão e colonização de plantas hospedeiras, podendo representar a diferença de virulência em relação ao *H. seropedicae* SmR1. Esse T6SS-II não está constitutivamente ativado e os ensaios de β -galactosidase mostram que a ativação é dependente do hospedeiro, dificultando a análise do perfil de expressão gênica, porém outros experimentos corroboraram essa função “*in planta*”. Os ensaios de colonização e competição durante a colonização do sorgo mostraram fenótipo fortemente alterado para as estirpes mutantes das proteínas Hcp e VgrG, principalmente nas etapas iniciais da colonização. Os experimentos de desenvolvimento de doença nos mostraram envolvimento da proteína Hcp no

processo-doença, sendo a única estirpe mutante com decréscimo virulento, mesmo apresentando forte produção de biofilme, indicando que a proteína Hcp do T6SS-II é a proteína carreadora de alguma proteína efetora diretamente envolvida com o processo-doença. Por outro lado, a proteína VgrG parece ser a carreadora de proteínas efetoras que regulam a imunidade vegetal para facilitar a invasão da planta, dados mostrados pela virulência aumentada para essa estirpe mutante, além do comprometimento do crescimento das plantas inoculadas e também na formação de sintomas da estria vermelha em plântulas pela mutante *impK*, indicando resposta imune vegetal aumentada para essa estirpe mutante.

Enfim, foi possível caracterizar diversos genes importantes para a interação planta-bactéria, permitindo estudo posteriores e maior compreensão dos mecanismos e novas proteínas que podem estar envolvidos no processo-doença. Até o momento de publicação dessa tese, os resultados e métodos utilizados foram pioneiros, espero que não sejam desperdiçados.

REFERÊNCIAS:

ABDERRAHMAN HACHANI, LUKE P. ALLSOPP, YEWANDE ODUKO AND ALAIN FILLOUX. The VgrG Proteins Are “à la Carte” Delivery Systems for Bacterial Type VI Effector. **J Biol Chem**. V.289(25), pp. 17872–17884. 2014.

ACHOUAK, W.; PAGÈS, J. M.; MOT, R.; MOLLE, G. & HEULIN, T. A major outer membrane protein of *Rahnella aquatilis* functions as a porin and root adhesin. **J. Bacteriol**. V. 180, pp: 900 – 913. 1998

ÅGREN, G. I; WETTERSTEDT, M. J. Å; BILLBERGER, M. F. K. Nutrient limitation on terrestrial plant growth – modeling the interaction between nitrogen and phosphorus. **New Phytologist**, p. 953–960, V. 194, e. 4, 2012.

ALBERTI, L. & HARSHEY, R. M. Differentiation of *Serratia Marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. **J. Bacteriol**. V.172, pp. 4322: 4328. 1990.

ALLARD, S. T.; GIRAUD, M. F. & NAISMITH. J. H. Epimerases: structure, function and mechanism. **Cell Mol Life Sci**.. V.58(11), pp.1650-65. 2001.

ALLEN W.J., PHAN G., WAKSMAN G. Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. **Curr. Opin. Struct. Biol**. V.22, pp.500–506. 2012.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B.; MEALY, T. R.; SEATON, B. A. & HEAD, J. F. The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance. **Nat Struct Biol**. V.8, pp:710-714. 2001.

ALVAREZ-MARTINEZ MT, MACHOLD J, WEISE C, SCHMIDT-EISENLOHR H, BARON C, ROUOT B. The *Brucella suis* homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence operon *chvE* is essential for sugar utilization but not for survival in macrophages. **J Bacteriol**. V. 183, pp:5343-51. 2001. DOI:10.1128/JB.183.18.5343-5351.2001.

AMES, P. & BERGMAN, K. Competitive advantage provided by bacterial *motility* in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. **J Bacteriol**. V. 148, pp: 728–908. 1981.
AN, D. D.; DANHORN, T.; FUQUA, C. & PARSEK, M. R. Quorum sensing and *motility* mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. V. 103, pp: 3828–3833. 2006.

ANDREOZZI, A.; PRIETO, P.; MERCADO-BLANCO, J.; MONACO, S.; ZAMPIERI, E.; ROMANO, S.; VALÈ, V.; DEFEZ, R. & BIANCO, C. Efficient colonization of the endophytes *Herbaspirillum huttiense* RCA24 and *Enterobacter cloacae* RCA25 influences the physiological parameters of *Oryza sativa* L. cv. Baldo rice. **Environmental Microbiology**. 2019. Retirado de: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14688>

BAJERSKI, F.; GANZERT, L.; MANGELSDORF, K. LIPSKI, A.; JURGEN, H.; PADUR, L. & WAGNER, D. *Herbaspirillum psychrotolerans* sp. nov., a member of the family Oxalobacteraceae from a glacier forefield. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 63, pp.3197–3203, 2013.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S. & VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Ann Rev Plant Biol**. V. 57, pp: 233–266. 2006.

BALDANI *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986a.

BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A. B.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant Soil** V.90, pp.35-40, 1986b.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and classification of a group of clinical isolates (EFgroup 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.46, p.802–810, 1996.

BALDANI, V. L. D; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol Fertil Soils**. V 30, pp 485–491, 2000.

BALSANELLI, E., SERRATO, R. V., BAURA, V. A., SASSAKI, G., YATES, M. G., UN RIGO, L., PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology** . V.12(8), pp. 2233–2244, 2010.

BALSANELLI, E.; SASSAKI, G. L.; CARLSON, R. W.; MUSZYNSKI, A.; SERRATO, R. V.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. & IACOMINI, M. Structural analysis of *Herbaspirillum seropedicae* lipid-A and of two mutants defective to colonize maize roots. **Int J Biol Macromol**. V. 51(4), pp.384-91, 2012.

BALSANELLI, E., SERRATO, R.V., PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M., MONTEIRO, R.A. Role of *Herbaspirillum seropedicae* LPS in plant colonization, in **Biological Nitrogen Fixation (ed F. J. de Bruijn)**, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9781119053095.ch93, 2013.

BALSANELLI, E.; TULESKI, T.; BAURA, V. YATES, M. G.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; 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(10), E. 77001, 2013b.

BARRET, M.; EGAN, F.; FARGIER, E.; MORRISSEY, J. P. & O'GARA, F. Genomic analysis of the type VI secretion systems in *Pseudomonas spp.*: novel clusters and putative effectors uncovered. **Microbiology**. V. 157, pp: 1726–1739. 2011.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R. & HERNANDEZ, J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**. V. 378, pp. 1–33, 2014.

BASLER, M.; PILHOFER, M.; HENDERSON, G. P.; JENSEN, G.J. & MEKALANOS, J.J. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. **Nature**. V.483, pp.182–186, 2012 doi:10.1038/nature10846.

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

BEROE inc. Urea Marketing intelligence. 19 de outubro de 2019. Retirado de: <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-urea-market-to-reach-67-8-billion-by-2022--says-beroe-inc-300931169.html>.

BEATTIE, G.A. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. **Gnanamanickam S.S. (eds), Plant-associated bacteria. Dordrecht: Springer**, pp. 1–56. 2006.

BERNAL, P.; LLAMAS, M. A. & FILLOUX, A.. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. **Environ Microbiol**. V. 20, e. 1, pp: 1–15. 2017. doi: 10.1111/1462-2920.13956.

BLADERGROEN, M. R.; BADEL, K. & SPAINK, H. P. Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. **Mol Plant Microbe Interact**. V. 16, pp: 53–64. 2003.

BOGINO, P. C.; OLIVA, M. M.; SORROCHE, F. G. & GIORDANO, W. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. **Int J Mol Sci**. V. 14(8), pp. 15838–15859, 2013.

BOLES, B. R., SINGH, P. K. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** V.105, pp:12503–12508. 2008. 10.1073/pnas.0801499105.

BOLES, B. R., THOENDEL, M. & SINGH, P. K. Selfgenerated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. V. 101, pp: 16630–16635. 2004.

BÖNEMANN, G.; PIETRISIUK, A.; DIEMAND, A.; ZENTGRAF, H. & MOGK, A. Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. **EMBO Journal**. V.28, pp.315–25, 2009. doi:10.1038/emboj.2008.269.

BOYER, F.; FICHANT, G.; BERTHOD, J.; VANDENBROUCK, Y. & ATTREE, I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources. **BMC Genom.** V. 10, pp: 104. 2009.

BRANDA, S.S. *et al.* Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** V. 98, pp: 11621–11626. 2001.

BRANDA, S. S.; VIK, A. S.; FRIEDMAN, L. & KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **TRENDS in microbiology.** V. 13, E. 1. 2005. Doi:10.1016/j.tim.2004.11.006.

BRUNET, Y.R.; HÉNIN, J.; CELIA, H. & CASCALES, E. Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. **EMBO Reports.** V.15, pp.315–21, 2014. doi:10.1002/embr.201337936.

BURCHARD, R. P. Gliding *motility* of prokaryotes: ultrastructure, physiology, and genetics. **Annu Rev Microbiol.** V. 35, pp. 497:529. 1981.

BÜTTNER, D. & SHENG YANG HE, S. Y. Focus Issue on Plant Interactions with Bacterial Pathogens Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. **Plant Physiol.** V. 150, E. 4, pp. 1656–1664. 2009. doi: 10.1104/pp.109.139089.

CARRO, L.; RIVAS, R.; LEON-BARRIOS, M.; GONZALEZ-TIRANTE, M.; VELA´ZQUEZ, E. & VALVERDE, A. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus *Herbaspirillum*. **Int J Syst Evol Microbiol.** V.62, pp.1300–1306, 2012.

CASCALES, E. & CHRISTIE, P. J. The versatile bacterial type IV secretion system. **Nature Reviews Microbiology.** V.1, pp. 137-149, 2003.

CIANFANELLI, F. R.; MONLEZUN, L. & COULTHURST, S. J. Aim, load, fire: the Type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. **Trends Microbiol.** V. 24, pp: 51–62. 2016.

CHEN, C.; YANG, X. & SHEN, X. Confirmed and Potential Roles of Bacterial T6SSs in the Intestinal Ecosystem. **Front. Microbiol.** V.10, pp.1484. 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01484.

CHEN, W.-J. J.; KUO, T.-Y. Y.; HSIEH, F.-C. C.; CHEN, P.-Y. Y.; WANG, C.-S. S. & SHIH, Y.-L. L. Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis*. **Sci Rep.** V. 6, pp: 32950. 2016.

CHEN, L.; ZOU, Y. & WU, S. L. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological research.** V. 172, pp: 19-25. 2015.
CHIANG S. L. & MEKALANOS J. J. *rfb* mutations in *Vibrio cholerae* do not affect surface production of toxin-coregulated pili but still inhibit intestinal colonization. **Infect. Immun.** V.67, pp. 976–980, 1999.

CHRISTENSEN, B. B.; HAAGENSEN, J. A. J.; HEYDORN, A. & MOLIN, S. Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 68, pp. 2495–2502. 2002.

CHUNG, C.T.; NIEMELA, S.L. & MILLER, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **PNAS.** Vol. 86, pp. 2172-2175, 1989.

COLEMAN, W. G. & LEIVE, L. Two mutations which affect the barrier function of the *Escherichia coli* K-12 outer membrane. **J. Bacteriol.** V.139, pp.899–910, 1979.

CORNISH A, GREENWOOD JA, JONES CW. Binding-protein-dependent sugar transport by *Agrobacterium radiobacter* and *A. tumefaciens* grown in continuous culture. **J Gen Microbiol.** V. 135, pp: 3001-13. 1989. DOI:10.1099/00221287-135-11-3001.

CONNELL, J. H. The influence of interspecific competition and other factors on the distribution of the barnacle *Chthamalus stella* *Tus.* **Ecology.** V.42, pp: 710–723. 1961.
COULTHURST S. J. The type VI secretion system - a widespread and versatile cell targeting system. **Res. Microbiol.** V.164, pp. 640–654. 2013. 10.1016/j.resmic.2013.03.017. .

CRAIG, L., FOREST, K. T., & MAIER, B. Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. **Nature Reviews Microbiology.** doi:10.1038/s41579-019-0195-4. 2019.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Appl Environ Microbiol.** V.67, pp. 2375-2379, 2001.

DANHORN, T. & FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annu Rev Microbiol.** V. 61, pp:401-422. 2007.

DARBY, C. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. **Nature.** V. 417, pp: 243–244. 2002.

DAVIES, D. G. *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science.** V. 280, pp. 295–298. 1998.

DAVEY, M. E. *et al.* Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **J. Bacteriol.** V. 185, pp: 1027–1036 37. 2003.

DERETIC, V. *et al.* Mucoicid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the muc loci affect transcription of the algR and algD genes in response to environmental stimuli. **Mol. Microbiol.** V. 4, pp. 189–196 31. 1990.

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 lanceolata* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.** V.54, pp. 2223–2230, 2004.

DOBRIŤSA *et al.* 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., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **international journal of systematic and evolutionary microbiology.** V. 60, 2010.

DONG, T. G.; HO, B. T.; YODER-HIMES, D. R. & MEKALANOS, J. J. Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. **Proc Natl Acad Sci USA.** V. 110, pp: 2623–2628. 2013.

DOWER, W. J., Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation. **Genetic Engineering, Principles and Methods.** V. 12, pg. 275296, 1990.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H. & MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology.** V. 67, pp. 5285-5293. 2001.

ELKOCA, E., KANTAR, F. E SAHIN, F. Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. **J Plant Nut.** V.31, pp.157-171. 2008.

EL-KOMY, H. M.; SAAD, O. A. & HETTA, A. M. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using 15N-dilution method. **Folia Microbiol.** V. 48, pp. 787-793. 2003.

EMBRAPA. ENCARTE DO INFORMAÇÕES AGRONÔMICAS Nº 100 – DEZEMBRO/2002. EMBRAPA milho e sorgo. Retirado de <http://www.cnpms.embrapa.br/sorgo/doutorsorgo.pdf>

ERRIDGE, C.; BENNET-GUERRERO, E.; POXTON, I.R. Structure and function of lipopolisaccharides. **Microb. Infect.** V.4, pp. 837-851, 2002.

ERICSSON, T. Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. **Plant and Soil**, p.168-169: v. 205-214, 1995.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United nations. World fertilizer trends and outlook to 2018. ROME, 2015. Retirado de: <http://www.fao.org/3/a-i4324e.pdf>

FINNEY, A.J., LOWDEN, R., FLESZAR, M., ALBAREDA, M., COULTHURST, S.J. AND SARGENT, F. (2019) The plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum* contains a functional formate hydrogenlyase-2 complex. BioRxiv DOI 10.1101/688135. Accepted in Molecular Microbiology 2019.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbiology**. v.58, pp. 352–386, 1994.

FLORES-MIRELES A.L., WALKER J.N., CAPARON M., HULTGREN S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat. Rev. Microbiol.** V.13, pp.269-284. 2015.

GALLIQUE, M.; DECOIN, V.; BARBEY, C.; ROSAY, T.; FEUILLOLEY, M. G. J. & ORANGE, N. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 Type VI secretion system to biofilm formation. **PLoS One**. V. 12, e. 0170770. 2017.

GHIGO, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. **Nature**. V. 412, pp. 442–445. 2001.

FRIEDMAN, L. & KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. **Mol. Microbiol.** 51, pp: 675–690. 2004.

GAMA-CASTRO S., SALGADO H., SANTOS-ZAVALA A., LEDEZMA-TEJEIDA D., MUÑIZ-RASCADO L., GARCÍA-SOTELO J.S. RegulonDB version 9.0: high-level integration of gene regulation, coexpression, motif clustering and beyond. **Nucleic Acids Res.** 2016.

GIRAUD, M. & NAISMITH, J. H. *The rhamnose pathway*. **Current Opinion in Structural Biology**. 2000, V.10, E.6, pg. 687, 2000.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY, P. M. & LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, V154, pp 131–145, 2002.

GOLOWCZYC, M. A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G. & DE ANTONI, G. L. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Int. J. Food Microbiol.** V. 118, pp. 264–273. 2007.

HAAPALAINEN, M.; MOSORIN, H.; DORATI, F.; WU, R.-F.; ROINE, E. & TAIRA, S. Hcp2, a secreted protein of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, is required for fitness for competition against bacteria and yeasts. **J Bacteriol.** V. 194, pp. 4810–4822. 2012.

HAAS, D. & DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nat Rev Microbiol.** V. 3, pp. 307–319. 2005.

HANLON, D. & ORDAL, G. W. Cloning and characterization of genes encoding methyl-accepting chemotaxis proteins in *Bacillus subtilis*. **J Biol Chem.** v. 269, pp. 14038-46. 1994.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. & ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiol.** V. 16, pp. 463-471. 2008.

HARSHEY, R. M. Bees aren't the only ones: *swarming* in gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.** V.13, pp.389-94. 1994.

HARSHEY, R. M. Bacterial *Motility* on a Surface: Many Ways to a Common Goal. **Annual Review of Microbiology**. Vol. 57, pp. 249-273. 2003. doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091014.

HE, F.; NAIR, G. R.; SOTO, C. S.; CHANG, Y.; HSU, L.; RONZONE, E.; DEGRADO, W. F. & BINNS, A. N. Molecular basis of *ChvE* function in sugar binding, sugar utilization, and virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. **J Bacteriol**. V. 191, pp. 5802-13. 2009. DOI:10.1128/JB.00451-09.

HENSE, B. A. *et al.* Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? **Nature Rev. Microbiol**. V. 5, pp. 230–239. 2007.

HO, B.; BASLER, M. & MEKALANOS, J. Type 6 secretion system–mediated immunity to Type 4 secretion system–mediated gene transfer. **Science**. V. 342, pp. 250–253. 2013.

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **J. circular Agricultural Experiment Station**, V. 147(2), pp. 32, 1950.

HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. J. *Azoarcus sp.* strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. **Biotechnol**. V. 106, e. 2-3, pp.169-78. 2003.

IM, W.-T.; BAE, H.-S.; YOKOTA, A. & LEE, S. T. *Herbaspirillum chlorophenicum sp. nov.*, a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**. V.54, pp.851–855, 2004.

IRIE, Y.; O'TOOLE, G. A. & YUK, M. H. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. **FEMS Microbiol. Lett**. V. 250, pp. 237–243. 2005.

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**, Vol. 48, No. 308, pp. 785-797,1997.

JAN LENNINGS, T. EOIN WEST & SANDRA SCHWARZ1*. The *Burkholderia* Type VI Secretion System 5: Composition, Regulation and Role in Virulence. *Front. Microbiol.*, 10 January 2019 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03339>.

JEFFREY A. LEWIS, ALEXANDER R. HORSWILL, BRIAN E. SCHWEM, JORGE C. ESCALANTE-SEMERENA. The Tricarballoylate Utilization (*tcuRABC*) Genes of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* LT2. **American Society for Microbiology**. 2003. Retirado de: <https://jb.asm.org/content/186/6/1629>. DOI: 10.1128/JB.186.6.1629-1637.2004.

JERVIS, A. J.; CRACK, A. J. C.; WHITE, B. G.; ARTYMIUK, P. J.; CHEESMAN, M. R.; THOMSON, A. J.; LE BRUN, N. E. & JEFFREY GREEN, J. The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 24, e. 106(12), pp. 4659–4664. 2009.

MCMULLEN, J. G.; MCQUADE, R.; OGIER, J.-C.; PAGES, S.; GAUDRIAULT, S. & STOCK, S. P. Variable virulence phenotype of *Xenorhabdus bovienii* (gProteobacteria: Enterobacteriaceae) in the absence of their vector hosts. **Microbiology society**. V.163, pp.510–522. 2017. DOI 10.1099/mic.0.00044

JIANG, T.; LEI, W.; DAN, L.; YUE, L. I.; BASTIN, D. A.; YUNQI, G. & LU, F. Molecular analysis of *Shigella boydii* O1 O-antigen gene cluster and its PCR typing. **Canadian Journal of Microbiology**. V.51, E.5, pp.387, 2005.

JUNG, S. Y.; MI-HWA, L.; TAE-KWANG, O. & JUNG, H. Y. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. V. 57, pp: 2284–2288, 2007.

KANNENBERG, E.L.; REUHS, B.L.; FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structure, biosynthesis and functions. In: The Rhizobiacea. Ed. H.P. SPAINK; A. KONDOROSI; P.J.J. HOOYKAAS. Dordrecht:Kluwer Academic Publisher, pp. 154, 1998.

KAISER, D. Bacterial *motility*: how do pili pull? **Curr Biol**. V. 10(21), pp.R777:R780. 2000. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00764-8.

KAITO C, SEKIMIZU K. Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**. V. 189(6), pp.2553-2557. 2007.

KAPATRAL, V.; ANDERSON, I.; IVANOVA, N. *et al*. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. **J Bacteriol**. V.184, pp. 2005-2018. 2002.

KASSEN, R., LLEWELLYN, M. & RAINEY, P. B. Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation. **Nature**. V. 431, pp: 984–988. 2004.

KEBEISH, R.; NIESSEN, M.; THIRUVEEDHI, K.; BARI, R.; HIRSCH, H.-J.; ROSENKRANZ, R.; STÄBLER, N.; SCHÖNFELD, B.; KREUZALER, F. & PETERHÄNSEL, C. Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. **Nat Biotechnol**. V. 25, pp. 593–599. 2007.

KERR, B.; RILEY, M. A.; FELDMAN, M. W. & BOHANNAN, B. J. Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock-paper-scissors. **Nature**. V 418, pp: 171–174. 2002.

KHAN, M. S., ZAIDI, A. E WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms insustainable agriculture - A review. **Agron Sustain Dev** v. 27, pp.29-43. 2009.

KIM, E. J.; JONES, M. B.; RHEE, J. K.; SAMPATHKUMAR, S. G. & YAREMA, K. J. Establishment of N-acetylmannosamine (ManNAc) analogue-resistant cell lines as improved hosts for sialic acid engineering applications. **Biotechnol Prog**. V.20, E.6, pp.1674-82, 2004.

KIRCHHOFF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. & HARTMANN, A.. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *Int J Syst Evol Microbiol*. V.51, pp.157–168, 2001.

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

KLAUSEN, M.; AAES-JORGENSEN, A.; MOLIN, S. & TOLKER-NIELSEN, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol*. V. 50, pp: 61–68. 2003.

KLOEPPER, J. W. & BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*., 38(12), 1219–1232. 1992. doi:10.1139/m92-202.

KRAUSE *et al.* Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Natural Biotechnology*. V.24, p.1385–1391, 2008.

KRIN, E.; LAURENT-WINTER, C.; BERTIN, P. N.; DANCHIN, A. & KOLB, A. Transcription Regulation Coupling of the Divergent argG and metY Promoters in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*. 2003. Retirado de: <https://jb.asm.org/content/185/10/3139>. DOI: 10.1128/JB.185.10.3139-3146. 2003.

KULMATISKI, A.; BEARD, K. H.; STEVENS, J. R. & COBBOLD, S. M. Plant-soil feedbacks: a meta-analytical review. *Ecology Letters*. V. 11, pp: 980–992. 2008.

LAVELLE, P.; LATTAUD, C.; TRIGO, D. & BAROIS, I. Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil*. V. 170, pp: 23–33. 1995.

LEE, L.K. *et al.* Structure of the torque ring of the flagellar motor and the molecular basis for rotational switching. *Nature*. V. 466, pp. 996:1000. 2010.

LEIMAN, P. G.; BASLER, M.; RAMAGOPAL, U. A.; BONANNO, J. B.; SAUDER, J. M. & PUKATZKI, S. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 106, pp: 4154–4159. 2009.

LESIC, B.; STARKEY, M.; HE, J.; HAZAN, R. & RAHME, L. G. Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis. *Microbiology*. V. 155, pp: 2845–2855. 2009.

LEVEAU, J. H. & LINDOW, S. E. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl Environ Microbiol*. V.71, pp.2365-2371. 2005.

LEWIS, J. A.; HORSWILL, A. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. the tricarballylate utilization (*tcuRABC*) genes of *Salmonella enterica* serovar Tyohimurium LT2. **J. bacterial**. 186: 1629-1637. 2002.

LOHA, J.; PIERSON, E. A.; PIERSON, L. S.; STACEY, G. & CHATTERJEE, A. Quorum sensing in plant-associated bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 5, E. 4 (1), pp: 285-290. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00274-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00274-1).

LOSADA L., SHEA AA, DESHAZER D. A MarR family transcriptional regulator and subinhibitory antibiotics regulate type VI secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*. **Microbiology**.V. 164, e. 9, pp: :1196-1211. 2018. doi: 10.1099/mic.0.000697.

MA, A. T. & MEKALANOS, J. J. In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. **Proc Natl Acad Sci USA**. V. 107, pp: 4365–4370. 2010.

MA, L.-S.; HACHANI, A.; LIN, J.-S.; FILLOUX, A. & Lai, E.-M. *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. **Cell Host Microbe**. V. 16, pp: 94–104. 2014.

MACNAB, R. M. How bacteria assemble flagella. **Annu. Rev. Microbiol**. V.57, pp. 77:100. 2003.

LU, D.; SHANG, G.; ZHANG, H.; YU, Q.; CONG, X.; YUAN, J.; HE, F.; ZHU, C.; ZHAO, Y.; YIN, K.; CHEN, Y.; HU, J.; ZHANG, X.; YUAN, Z.; XU, S.; HU, W.; CANG, H. & GU, L. Structural insights into the T6SS effector protein Tse3 and the Tse3-Tsi3 complex from *Pseudomonas aeruginosa* reveal a calcium-dependent membrane-binding mechanism. **Mol Microbiol**. V. 92, e. 5, pp.1092-112. 2014. doi: 10.1111/mmi.12616.

LV, M.; CHEN, Y.; LIAO, L.; LIANG, Z.; SHI, Z.; TANG, Y.; YE, S.; ZHOU, L. & ZHANG, L. Fis is a global regulator critical for modulation of virulence factor production and pathogenicity of *Dickeya zeae*. **Scientific Reports**. V. 8, N. 341 .2018.

MARTINEZ, A.; TORELLO, S. & KOLTER, R. Sliding *motility* in mycobacteria. **J. Bacteriol**. V.181, pp. 7331:7338. 1999.

MARTÍNEZ-ANTONIO, A. & COLLADO-VIDES, J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. **Curr Opin Microbiol**. V. 6, pp: 482–489. 2003.

MATSUYAMA, T.; SOGAWA, M. & NAKAGAWA, Y. Fractal spreading growth of *Serratia Marcescens* which produces surface active exolipids. **FEMS Microbiol**. V 52, pp. 243:246. 1989.

MATSUYAMA, T.; BHASIN, A. & HARSHEY, R. M. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia Marcescens* 274 on a low-ágar medium. **J. Bacteriol**. V.177, pp. 987:991. 1995.

MATTICK, J. S. Type IV pili and *twitching motility*. **Annu. Rev. Microbiol.** V.56, pp. 289-314. 2002.

MATTINEN, L.; NISSINEN, R.; RIIPI, T.; KALKKINEN, N. & PIRHONEN, M. Host-extract induced changes in the secretome of the plant pathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum*. **Proteomics.** V. 7, pp: 3527–3537. 2007.

MEDELSON, N. H. & COLE, R. M. Genetic regulation of cell division initiation in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol** 112:994–1003. 1972.

MEIER-DIETER, U.; BARR, K.; STARMAN, R.; HATCH, L. & RICK, P. D. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli rfe* gene involved in the synthesis of enterobacterial common antigen. Molecular cloning of the *rfe-rff* gene cluster. **J Biol Chem.** V.15, E.267, pp.746-53, 1992.

McPHERSON, D. F.; MANNING, P. A.; MORONA, G. Characterization of the dtdp-rhamnose biosynthetic genes encoded in the *rfb* locus of *Shigella flexneri*. **molecular microbiology.** V.11, E.2, pp. 281–292, 1994.

MILLER, L.D.; RUSSELL, M. H. & ALEXANDRE, G. Diversity in bacterial chemotactic responses and niche adaptation. **Adv Appl Microbiol.** V. 66, pp: 53-75. 2009. DOI:10.1016/S0065-2164(08)00803-4.

MINAMINO, T. & NAMBA, K. Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** V.7, pp.5:17. 2004.

MINAMINO, T. *et al.* Molecular motors of the bacterial flagella. **Curr. Opin. Struct. Biol.** V.18, pp.693:701. 2008.

MINISTÉRIO DA ECONOMIA (2019). Ministério da Economia, Indústria, Comércio exterior e Serviços. Comexstat. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral>.
MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annu. Rev. Microbiol.** V. 3, pp: 371–394. 1949.

MONTEIRO, R. A., BALSANELLI, E.; TULESKI, T. R.; FAORO, H.; CRUZ, L. M.; WASSEM, R.; BAURA, V. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; WEISS, V.; DAROCHA, W. D.; MULLER-SANTOS, M.; CHUBATSU, L. S.; HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O. AND 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 Microbiology Ecology.** V. 80(2), pp. 441-51, 2012.

MORRISON, D.C. & LEIVE, L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. **J Biol Chem.** V. 250(8), pp.:2911-19, 1975.

MOUGOUS, J. D.; CUFF, M. E.; RAUNSER, S.; SHEN, A.; ZHOU, M.; GIFFORD, C. A.; GOODMAN, A. L.; JOACHIMIAK, G.; ORDONEZ, C. L. & LORY, S. A virulence

locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. **Science**, v.312, pp.1526-1530, 2006.

MUELLER-LOENNIS, S.; LINDNER, B.; BRADE, H. Structural Analysis of Oligosaccharides from Lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* K12 Strain W3100 Reveals a Link between Inner and Outer Core LPS Biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**. V.278, pp.34090-34101, 2003.

MURRAY, M. G. & BAIRD, D. R. Resource-ratio theory applied to large herbivores. **Ecology**. V. 89, pp: 1445–1456. 2008.

NARISAWA, N., HARUTA, S., ARAI, H., ISHII, M. & IGARASHI, Y. Coexistence of antibiotic-producing and antibioticsensitive bacteria in biofilms is mediated by resistant bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 74, pp: 3887–3894. 2008.

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. **J Biol Chem**. V.270, pp.26723-26726. 1995.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**. V. 67, E. 4, pp:593-656. 2003.

OLDROYD, G. E. & DOWNIE, J. A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annu. Rev. Plant Biol**. V. 59, pp: 519–546. 2008. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839.

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

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, V.135, 1997.

O'TOOLE, G.A. AND KOLTER, R. Flagellar and *twitching motility* are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol. Microbiol**. V. 30, pp: 295–304. 1998.

O'TOOLE, G.A. AND KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol**. V. 28, pp: 449–461. 1998.

de PACE, F.; BOLDRIN DE PAIVA, J.; NAKAZATO, G.; LANCELLOTTI, M.; SIRCILI, M. P. & GUEDES STEHLING, E. Characterization of IcmF of the type VI secretion system in an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. **Microbiology**. V. 157: 2954–2962. 2011.

PARK, D. M.; AKHTAR, S.; ANSARI, A. Z.; LANDICK, R. & KILEY, P. J. The Bacterial Response Regulator ArcA Uses a Diverse Binding Site Architecture to Regulate Carbon Oxidation Globally. **PLoS Genet**. V. 9(10), E. e1003839. 2013. doi: 10.1371/journal.pgen.1003839.

PARSONS, D. A. & HEFFRON, F. *sciS*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, limits intracellular replication and decreases virulence. **Infect Immun.** V. 73(7), pp.4338-45. 2005.

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.; TERENCEIO, 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.; NICOLA´S, M. F.; PEREIRA-FERRARI, L.; SILVA, J. L.C.; GIOPPO, N. M. R.; MARGARIDO, V. P.; MENCK-SOARES, M. A.; PINTO, F. G.S.; SIMA˜O, 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 Genetics.** V. 7, 2011.

PEÑUELAS, J. & SARDANS, J. The Role of Plants in the Effects of Global Change on Nutrient Availability and Stoichiometry in the Plant-Soil System. **Plant Physiology**, Vol. 160, pp. 1741–1761, 2012.

PHAN, T. V.; MORRIS, R. J.; LAM, H. T.; HULAMM, P.; BLACK, M. E.; BOS, J. *et al.* Emergence of *Escherichia coli* critically buckled motile helices under stress. **Proc Natl Acad Sci.** V. 115(51), pp.12979–84. 2018. PMID:30498027.

PIMENTEL *et al.* 1991a. Diversification of biological control strategies in agriculture. **Crop Protection.** v.10, p.243-253. 1991.

POSTGATE, J.R. The fundamental of nitrogen fixation. Cambridge university press, 1982.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** V.103 (5), pp.1528–33, 2006.

QUINONES, B.; DULLA, G.; LINDOW, S.E. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, *motility*, and virulence in *Pseudomonas syringae*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** V. 18, pp. 682–93, 2005.

RAETZ, C. R. & WHITEFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem.** V. 71, pp. 635-700, 2002.

RAINEY, P. B. & TRAVISANO, M. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. **Nature.** V. 394, pp: 69–72. 1998.

RAHIN, R.; BURROWS, L. L.; MONTEIRO, M. A. Perry, M. B. & LAM, J. S. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology (2000).** V.146, pp. 2803–2814, 2000.

RASKIN, I.; TURNER, I. M. & MELANDER, W. R. Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V. 86, pp. 2214-2218, 1989.

REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends Microbiol.** V. 6, pp: 139-144. 1998.

RIBAS, P. M. Embrapa Milho e Sorgo Sistema de Produção, 2. EMBRAPA, 2000.
Retirado de:
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27507/1/Importancia-economica.pdf>.

RINAUDI, L. V. & GIORDANO, W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. **FEMS Microbiol Lett.** V. 304, E. 1, pp:1-11. 2010.

ROLLAUER, S. E.; SOORESHJAN, M. A.; NOINAJ, N. & BUCHANAN, S. K. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v.370, e.1679, 2015. doi: 10.1098/rstb.2015.0023.

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, pp. 37-47, 2003.

ROSS, P. *et al.* Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiol. Rev.** V. 55, pp: 35–58. 1991.

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

SAAB, A. A & PAULA, R. A. O mercado de fertilizantes no Brasil: Diagnósticos e propostas de políticas. **EMBRAPA: rev. de politica Agricola.** V. 2, ANO XVII, 2008.

SALOMON, D.; KINCH, A. L. N.; TRUDGIAN, B. D. C.; XIAOFENG GUO, C. C.; KLIMKO, J. A.; GRISHIN, A. N. V.; MIRZAEI, B. C. D. & KIM ORTHA, K. Marker for type VI secretion system effectors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** V. 111(25), pp. 9271–9276. Publicação on-line. 2014. doi: 10.1073/pnas.1406110111

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

SANGER, F; NICKELMAN, S & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **PNAS**. V. 74, E.12, pp. 5463–5467, 1977.

SANTOS, F.G.; COSTA, E.F.; RODRIGUES, J.A.S.; LEITE, C.E.P.; SCHAFFERT, R.E. Avaliação do comportamento de genótipos de sorgo para resistência à seca. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 21., Londrina, 1996. Resumos... Londrina: IAPAR, 1996. p.32.

SARRIS, P. F.; SKANDALIS, N.; KOKKINIDIS, M. & PANOPOULOS, N. J. In silico analysis reveals multiple putative type VI secretion systems and effector proteins in *Pseudomonas syringae* pathovars. **Mol Plant Pathol**. V. 11, pp: 795–804. 2010.

SERRATO, R.V.; SASSAKI, R. G.; CRUZ, L. M.; MUSZYNSKI, A.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. & IACOMINI, M. Chemical composition of lipopolysaccharides isolated from various endophytic nitrogen-fixing bacteria of the genus *Herbaspirillum*. **Canadian journal of microbiology**. V. 56, E. 4. 2010.

SHAHAROONA, B., ARSHAD, M. E ZAHIR, Z. A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Lett Appl Microbiol**. V.42, pp.155-159, 2006.

SCHMID, M. Chapter 3.1.6: The Genus *Herbaspirillum*. In: SCHMID,; M. BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. prokaryotes, p.141-150, 2006.

SCHMIDT, M. A.; BALSANELLI, E.; FAORO, H, CRUZ, LM, WASSEM, R, DE BAURA, VA, WEISS, V, YATES, MG, MADEIRA, HM, PEREIRA-FERRARI, L, FUNGARO, MH, DE PAULA, FM, PEREIRA, LF, VIEIRA, LG, OLIVARES, F. L.; PEDROSA, F. O.; DE 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 Microbiol**. v. 12:98. 2012. doi: 10.1186/1471-2180-12-98.

SCHWARZ, S.; WEST, T. E.; BOYER, F.; CHIANG, W.-C. C.; CARL, M. A. & HOOD, R. D. *Burkholderia* type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. **PLoS Pathog**. V. 6, e. 1001068. 2010.

SKERKER, J. M. & BERG, H. C. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. **Proc. Natl Acad. Sci**. V. 98, pp.6901:6904. 2001.

SMITH, A. R. W.; MUNRO, S. M. R. & HIGNETT, R. C. T. Effect on lipopolysaccharide structure of aeration during growth of a plum isolate of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. **Microbiology**, V.140, pp.1585-1593, 1994.

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C. A. *et al*. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Mol Biol**. V.9, pp.27:39. 1987.

SHUJI KANAMARU, PETR G. LEIMAN, VICTOR A. KOSTYUCHENKO, PAUL R. CHIPMAN, VADIM V. MESYANZHINOV, FUMIO ARISAKA & MICHAEL G. ROSSMANN. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. **Nature**. V. 415, pp: 553–557. 2002.

RUSSELL, A. B.; LEROUX, M.; HATHAZI, K.; AGNELLO, D. M.; ISHIKAWA, T. & WIGGINS, P. A. Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. **Nature**. V. 496, pp: 508–512. 2013.

SANA, T. G.; HACHANI, A.; BUCIOR, I.; SOSCIA, C.; GARVIS, S. & TERMINE, E. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. **J Biol Chem**. V. 287, pp: 27095–27105. 2012.

SANDOZ, K. M., MITZIMBERG, S. M. & SCHUSTER, M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. V. 104, pp: 15876–15881. 2007.

SAUER, F.G. *et al.* Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. **Curr. Opin. Microbiol**. V. 3, pp: 65–72. 2000.

SHNEIDER, M. M.; BUTH, S. A.; HO, B. T.; BASLER, M.; MEKALANOS, J. J. AND LEIMAN, P. G. PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. **Nature**. V. 500, pp: 350–353. 2013.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D. & WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harb Perspect Biol** v.2, pg.414, 2010.

SILVERMAN, J. M.; AGNELLO, D. M.; ZHENG, H.; ANDREWS, B. T.; LI, M. & CATALANO, C. E. Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. **Mol Cell**. V. 51, pp: 584–593. 2013.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. **Nat. Biotechnol**. V.1, pp.784:791, 1983.

SMITH, V. Effects of resource supplies on the structure and function of microbial communities. **Antonie Van Leeuwenhoek**. V. 81, pp: 99–106. 2002.

SOLOVYEV, V. & SALAMOV, V. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Pp.61:78. 2011.

SOUTHEY-PILLIG, C.J.; DAVIES, D. G. & SAUER, K. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **J Bacteriol**. V.187, e.23, pp. 8114-8126. 2005.

STEPHENS, C.; CHRISTEN, B.; FUCHS, T.; SUNDARAM, V.; WATANABE, K. & JENAL, U. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. **J Bacteriol.** V. 189, pp: 2181-5. 2007. DOI:10.1128/JB.01438-06.

STEWART, W.M; DIBB, D.W; JOHNSTON, A. E e SMYTH, T.J. The Contribution of Commercial Fertilizer Nutrients to Food Production. **American Society of Agronomy journal.** Vol. 97 No. 1, p. 1-6, 2005.

STRAUB, D.; YANG, H.; LIU, Y.; TSAP, T & LUDEWIG, U. Root ethylene signalling is involved in *Miscanthus sinensis* growth promotion by the bacterial endophyte *Herbaspirillum frisingense* GSF30T. **J Exp Bot.** V. 64, e.14, pp.4603-4615. 2013. doi: 10.1093/jxb/ert276.

SUAREZ, G.; SIERRA, J.C.; EROVA, T. E.; SHA, J.; HORNEMAN, A. J. & CHOPRA, A. K.. A Type VI Secretion System Effector Protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* That Induces Host Cell Toxicity by ADP Ribosylation of Actin . **J. Bacteriol.** V. 192, E. 1, pp. 155-168. 2010.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol.** V. 9, pp: 222–227. 2001.

TAL, R. *et al.* Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. **J. Bacteriol.** V. 180, pp: 4416–4425. 1998.

TIAN, Y.; ZHAO, Y.; WU, X.; LIU, F.; HU, B. & WALCOTT, R. R. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Ácidovorax citrulli* on melon. **Mol Plant Pathol.** V. 16, pp: 38–47. 2015.

TILMAN, D. Resource competition between planktonicalgae: experimental and theoretical approach. **Ecology**, v. 58, pp: 338–348. 1977.

TISCHLER, A. D. AND CAMILLI, A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. **Mol. Microbiol.** V. 53, pp: 857–869. 2004.

THOMAS, D.R. *et al.* The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.** V.188, pp.7039:7048. 2006.

TONG, H. *et al.* *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H₂O₂: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. **Mol. Microbiol.** V. 63, pp: 872–880. 2007.

TRUNK, K., PELTIER, J., LIU, Y. C., DILL, B. D., WALKER, L., GOW, N. A. R., *et al.* The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. **Nat. Microbiol.** 3, 920–931. 2018. doi: 10.1038/s41564-018-0191-x.

TSAI, C., AND FRISCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**; 119: 115–119; 1982.

TSONPANIDOU, E.; SIBBALD, M. J.; CHLEBOWICZ, M. A.; DREISBACH, A.; BACK, J. W.; VAN DIJL, J. M.; BUIST, G. & DENHAM, E. L. Requirement of the agr locus for colony spreading of *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** V.193(5), pp.1267:1272. 2011.

TULESKI, T. R. envolvimento dos genes de biossíntese de celulose na formação de biofilme pela bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. 99f Dissertação de mestrado do ciencias (bioquímica) - setor de ciencias biologicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

UROZ, S. *et al.* N-Acylhomoserine lactone quorum sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. **Microbiology.** V. 151, pp: 3313–3322. 2005.

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*. **Int J Syst Evol Microbiol.** V.53, pp.1979–1983, 2003.

VERSTRAETEN, N. *et al.* Living on a surface: *swarming* and biofilm formation. **Trends Microbiol.** V. 16, pp: 496–506. 2008.

WEI, L.; YI, X.; MCNEIL, M. R. & YUFANG, M. A. *rmlB* and *rmlC* genes are essential for growth of *mycobacteria*., **Biochemical and Biophysical Research Communications**, V. 342, E.1, pp. 170, 2006.

WILLIAMS, A. H.; IMMORMINO, R. M.; GEWIRTH, D. T. & RAETZ, C. R. Structure of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase with a bound antibacterial pentadecapeptide. **Proc Natl Acad Sci.** V.18, E.103(29), pp.10877-82, 2006.

YAMASHITA, Y.; TOMIHISA, K.; NAKANO, Y.; SHIMAZAKI, Y.; OHO, T. & KOGA, T. Recombination between *gtfB* and *gtfC* is required for survival of a dTDP-rhamnose synthesis-deficient mutant of *Streptococcus mutans* in the presence of sucrose. **Infect Immun.** Vol.67, pp.3693-3697, 1999.

RIETSCHER, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZÄHRINGER, U.; SEYDEL, U. D. I. & PADOVA, F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J.** V. 8(2), pp.:217-25, 1994.

VELICER, G. J. Social strife in the microbial world. **Trends Microbiol.** V. 11, pp: 330–337. 2003.

WANG, X. *et al.* The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **J. Bacteriol.** V. 186, pp: 2724–2734 29. 2004.

WEGER, L. A.; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. & LUGTENBERG, B. J. *Pseudomonas* spp. with mutational changes in the O-antigenic side chain of their lipopolysaccharide are affected in their ability to colonize

potato roots. **Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions**. V. 36, pp.197- 202, 1989.

WELCH M, OOSAWA K, AIZAWA S, EISENBACH M. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. **Proc Natl Acad Sci**. V.90, pp.8787: 8791. 1993. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.8787>.

WEST, S. A., DIGGLE, S. P., BUCKLING, A., GARDNER, A. & GRIFFIN, A. S. The social lives of microbes. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst**. V. 38, pp: 53–77. 2007.

WESTOVER, K. M. & BEVER, J. D. Mechanisms of plant species coexistence: Roles of rhizosphere bacteria and root fungal pathogens. **Ecology**. V. 82, pp: 3285–3294. 2001.

WOZNIAK, D. J. *et al*. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**. V. 100, pp: 7907–7912. 2003.

WU H.-Y., CHUNG P.-C., SHIH H.-W., WEN S.-R., & LAI E.-M. Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. **J Bacteriol**. V.190, pp: 2841–2850. 2008.

XAVIER, J. B. & FOSTER, K. R. Cooperation and conflict in microbial biofilms. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. V. 104, pp: 876–881. 2007.

YUAN, J. AND BERG, H.C. Ultrasensitivity of an adaptive bacterial motor. **J. Mol. Biol**. V. 425, pp. 1760:1764. 2013.

ZHANG *et al*. Genetic organization and sequence of the *gcpA* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3: similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. **Molecular biology**. V. 9, E. 2, pp.309-321, 1993.

ZHANG L., XU J., XU J., ZHANG H., HE L., & FENG J. TssB is essential for virulence and required for Type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*. **Microb Pathog** 74: 1–7. 2014.

ZHENG, J. & LEUNG, K. Y. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. **Mol Microbiol**. V.66, pp.1192-1206, 2007.

ZHENG, J.; HO, B. & MEKALANOS, J. J. Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. **PLoS One**. V. 6, e. 23876. 2011.

ZOUED, A.; DURAND, E.; BEBEACUA, C.; BRUNET, Y. R.; DOUZI, B. & CAMBILLAU, C. TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. **J Biol Chem**. V.288, e.38, pp. 27031-27041. 2013.

| Estirpe: | Crescimento | biofilme | Motilidade | colonização | comp. Colonização | estria vermelha | micro estrutura | Comp. Direta |
|-----------------|-------------|----------|---------------|-------------|-------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Hrubri_0065 | -- | + | -(tw) | + | - | + | + | NA |
| Hrubri_0505 | + | - | -(tw) | - | + | + | vacuação | NA |
| Hrubri_0762 | - | + | - | + | + | - | FO | NA |
| Hrubri_0842 | - | - | + | + | - | -- | FO | NA |
| Hrubri_1953 | -- | - | --- (s/sw/tw) | - | - | + | Agregado | NA |
| Hrubri_0835 | + | -- | -- (tw) | - | -- | --- | FO | NA |
| Hrubri_0839 | - | ++ | - | - | -- | -- | FO | NA |
| Hrubri_0935 | + | - | + | - | -- | + | FO | NA |
| Hrubri_1197 | --- | - | + | + | - | + | NA | NA |
| Hrubri_2391 | + | + | + | - | -- | + | NA | NA |
| Hrubri_2483 | + | - | - | + | - | - | NA | NA |
| Hrubri_2585 | - | - | - | - | -- | - | NA | NA |
| Hrubri_2937 | + | - | ++ | -- | -- | + | NA | NA |
| Hrubri_3783 | + | ++ | + | + | -- | + | NA | NA |
| Hrubri_3948 | + | + | + | | - | + | NA | NA |
| T6SS cluster-I | | | | | | | | |
| Hubri_3993 | + | + | + | + | -- | -7d +++ 21d | NA | M1< ; SmR1< |
| Hubri_3994 | + | + | ++ | - | -- | -7d +++ 21d | NA | M1< ; SmR1> |
| Hubri_3995 | + | +++ | + | + | - | -7d +++ 21d | Muco | M1= ; SmR1< |
| T6SS cluster-II | | | | | | | | |
| Hubri_2309 | + | +++ | -- | - | -- | -- | muco | M1= ; SmR1< |
| Hubri_2312 | -- | - | ++ | - | -- | ++ | NA | M1= ; SmR1< |
| Hubri_2313 | + | +++ | - | - | -- | +++ | | M1> ; SmR1= |
| Hubri_2319 | + | - | + | - | -- | - | NA | M1> ; SmR1< |
| Hubri_2320 | + | - | + | + | -- | - | NA | M1= ; SmR1= |

MATERIAIS SUPLEMENTARES:

S1. SISTEMAS DE MOTILIDADE EM *H. rubrisubalbicans* M1

Ensaio de motilidade perfazem uma porção grande dessa tese, dessa forma é necessário apresentar alguns detalhes dos genes presentes nesses sistemas em *H. rubrisubalbicans* M1 que poderão facilitar a discussão.

Herbaspirillum rubrisubalbicans M1 conta com clusters *fli* e *flg* completos. Conta com os genes *motA* e *motB* (respectivamente HRubri_3011 HRubri_3010), importantes para o funcionamento da estrutura motora.

O cluster *fli* conta com 20 genes, que serão mostrados na Tabela a seguir.

Observamos a presença dos operons *fliLMNO*, *fliPQR*, *fliFG* e *fliEpilZflhBfliKTSD*.

TABELA S1: Genes de motilidade *fli* de *H. rubrisubalbicans* M1:

| Gene | Codifica | Característica |
|----------------------------------|-------------|---|
| <i>Hrubri_1917</i> | FliA | fator transcricional |
| <i>Hrubri_1953</i> | FliC | Flagelina |
| <i>Hrubri_1932</i> | FliR | proteína fliR da biossíntese flagelar |
| <i>Hrubri_1933</i> | FliQ | proteína fliQ da biossíntese flagelar |
| <i>Hrubri_1934</i> | FliP | Proteína precursora fliP da biossíntese flagelar |
| <i>Hrubri_1935</i> | FliO e fliZ | proteína fliO ou Z da biossíntese flagelar |
| <i>Hrubri_1936</i> | FliN e fliY | Proteína motora e relacionada com o T3SS fliN ou fliY |
| <i>Hrubri_1937</i> | FliM | Proteína motora fliM |
| <i>Hrubri_1938</i> | FliL | Proteína flagelar transmembrana fliL |
| <i>Hrubri_1939 e Hrubri_1948</i> | FliK | Proteína limitante do comprimento do gancho fliK |
| <i>Hrubri_1940</i> | FliJ | Proteína flagelar fliJ |
| <i>Hrubri_1941</i> | FliI | ATP sintase específica flagelar fliI |
| <i>Hrubri_1942</i> | FliH | Proteína montadora flagelar fliH |
| <i>Hrubri_1943</i> | FliG | Proteína motora fliG |
| <i>Hrubri_1944</i> | FliF | proteína do anel M flagelar fliF |
| <i>Hrubri_1945</i> | FliE | Proteína do coRpo basal do gancho fliE |
| <i>Hrubri_1949</i> | FliT | Proteína flagelar fliT |
| <i>Hrubri_1950</i> | FliS | Chaperona específica flagelar fliS |
| <i>Hrubri_1951</i> | FliD | Proteína 2 associada ao gancho flagelar fliD |
| <i>Hrubri_1952</i> | FlaG | Regulador do comprimento dos flagelos |

Esses genes *fli* podem gerar a estrutura isoladamente ou associados aos genes *flg*, que também codificam para sistemas flagelares. O sistema *flg* pode ter surgido anteriormente ao sistema *fli*, ambos contam com regulações diferentes, nesse caso pelos genes *flh* (*Hrubri_1913*, *Hrubri_1914*, *Hrubri_1915* e *Hrubri_1916*).

Já os genes *flg*, são 18 genes sendo os *flh* genes reguladores e os genes *flg* relacionados com a biossíntese do aparato de motilidade e do T3SS. Temos a formação dos operons *flhBAFGfliA* (genes regulatórios), *flgBCDEFGHIJ* e *flgKL*.

Temos ainda os genes *Hrubri_3013* e *Hrubri_3014* (genes regulatórios *flhC* e *flhD* respectivamente) e *Hrubri_4700* (estrutural *flgH*) presentes fora do cluster.

TABELA S2: Genes de motilidade *fla* de *H. rubrisubalbicans* M1:

| Gene | Codifica | Característica |
|--------------------|----------------------------|---|
| <i>Hrubri_1913</i> | <i>flhB</i> | Proteína <i>flhB</i> da Biossíntese flagelar |
| <i>Hrubri_1914</i> | <i>flhA</i> | Proteína <i>flhA</i> da Biossíntese flagelar |
| <i>Hrubri_1915</i> | <i>flhF</i> | Proteína ligadora de GTP associada a Biossíntese flagelar |
| <i>Hrubri_1916</i> | <i>flhG</i> ou <i>flhN</i> | proteína ativadora da biossíntese <i>flhN</i> |
| <i>Hrubri_1918</i> | <i>flgN</i> | Chaperona associada a secreção do tipo III |
| <i>Hrubri_1919</i> | <i>flgM</i> | Proteína anti fator sigma 28 |
| <i>Hrubri_1920</i> | <i>flgA</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgA</i> |
| <i>Hrubri_1921</i> | <i>flgB</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgB</i> |
| <i>Hrubri_1922</i> | <i>flgC</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgC</i> |
| <i>Hrubri_1923</i> | <i>flgD</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgD</i> |
| <i>Hrubri_1924</i> | <i>flgE</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgE</i> |
| <i>Hrubri_1925</i> | <i>flgF</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgF</i> |
| <i>Hrubri_1926</i> | <i>flgG</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgG</i> |
| <i>Hrubri_1927</i> | <i>flgH</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgH</i> |
| <i>Hrubri_1928</i> | <i>flgI</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgI</i> |
| <i>Hrubri_1929</i> | <i>flgJ</i> | proteína que compõe coRpo basal Proteína <i>flgJ</i> |
| <i>Hrubri_1930</i> | <i>flgK</i> | proteína que compõe o gancho Proteína <i>flgK</i> |
| <i>Hrubri_1931</i> | <i>flgL</i> | Proteína do coRpo basal do gancho Proteína <i>flgL</i> |

Comumente a motilidade flagelar é filtrada em relação a presença do gene *fliC*, principalmente *fliC2*, que codifica para a flagelina e é a principal proteína que constitui o bastão. Em *H. rubrisubalbicans* M1 se trata do gene *Hrubri_1953*. O comprimento do flagelo pode ser controlado pelo gene *flaG* (*Hrubri_1954*). *H. rubrisubalbicans* M1 não conta com outras cópias do gene *fliC*.

A importância desses sistemas de dois componentes e a diversidade de sinais de resposta em *H. rubrisubalbicans* M1 pode ser estimada considerando a quantidade de genes relacionados com sua biossíntese presente em seu genoma (33 genes), onde cheA é a proteína sensora, cheB é uma metilesterase

Dessa forma, pode-se observar que *H. rubrisubalbicans* M1 conta com todos os genes necessários para a biossíntese dos flagelos/ T3SS.

Pili em *H. rubrisubalbicans* M1: os pilus (pilus tipo I, pilus tipo IV, sistema de secreção tipo 2 e pilus tipo T – twitch), *H. rubrisubalbicans* M1 conta com 22 genes, entre eles o *pilZ*, principal proteína buscada na análise de bactérias a procura de pilus. A tabela seguir mostra os genes relacionados com a biossíntese de pilus em *H. rubrisubalbicans* M1.

TABELA S3: Genes e características dos pili de *H. rubrisubalbicans* M1:

| Gene | Codifica | Característica |
|--------------------|--------------|--|
| <i>Hrubri_0628</i> | <i>pilA</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína pilina A |
| <i>Hrubri_0332</i> | <i>pilB</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína ATPase <i>pilB</i> |
| <i>Hrubri_0331</i> | <i>pilC</i> | Montagem do pilus tipo IV, Proteína F do T2SS |
| <i>Hrubri_0330</i> | <i>pilD</i> | prepilina peptidase/ N-metiltransferase |
| <i>Hrubri_3629</i> | <i>pilE</i> | Proteína transmembrana do pilus tipo IV |
| <i>Hrubri_3802</i> | <i>pilI</i> | Proteína de motilidade <i>Twitch</i> |
| <i>Hrubri_3801</i> | <i>pilJ</i> | Proteína transmembrana de motilidade <i>Twitch</i> |
| <i>Hrubri_4114</i> | <i>pilM</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína <i>pilM</i> |
| <i>Hrubri_4115</i> | <i>pilN</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína <i>pilN</i> |
| <i>Hrubri_4116</i> | <i>pilO</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína <i>pilO</i> |
| <i>Hrubri_4117</i> | <i>pilP</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína <i>pilP</i> |
| <i>Hrubri_4118</i> | <i>pilQ</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína secretina |
| <i>Hrubri_2418</i> | <i>pilT1</i> | Proteína de motilidade <i>Twitch</i> , proteína <i>pilT</i> |
| <i>Hrubri_3774</i> | <i>pilT2</i> | Proteína de motilidade <i>Twitch</i> , ATPase de retração do pilus |
| <i>Hrubri_3626</i> | <i>pilV</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína de modificação |
| <i>Hrubri_3627</i> | <i>pilW</i> | Proteína transmembrana do pilus tipo IV |
| <i>Hrubri_3628</i> | <i>pilX</i> | Montagem do pilus tipo IV, proteína da biogênese |
| <i>Hrubri_1441</i> | - | Montagem do pilus, proteína putativa |
| <i>Hrubri_1442</i> | <i>fimD</i> | Chaperona usher do pilus tipo I |
| <i>Hrubri_1443</i> | <i>fimC</i> | Chaperona de montagem do pilus, putativa |
| <i>Hrubri_1444</i> | <i>fimA</i> | Pilina da montagem do pilus tipo I |
| <i>Hrubri_1946</i> | <i>pilZ</i> | proteína que compõe corpo basal Proteína Flgl |

Podemos observar que *H. rubrisubalbicans* M1 conta com os 4 genes comumente associados à biossíntese do pilus do tipo I (operon *Hrubri_1443Hrubri_1442Hrubri_1441* mais o gene *Hrubri_1444*) (ALLEN *et al.*, 2012). além envolvido na adesão, já foi observado como importante fator de virulência e formação de biofilme em estudos avaliando a infecção de bexiga em *E. coli* uropatogênica (FLORES-MERELES *et al.*, 2015).

H. rubrisubalbicans M1 também apresenta todos os genes necessários para a biossíntese do pilus do tipo IV e tipo T, porém esse não foi observado sob microscopia eletrônica de transmissão, sendo observado apenas em mutante com deficiência da proteína pilT2, que gera um evento conhecido como hiper piliação, esse foi observado por Chicora e colaboradores (2018).

H. rubrisubalbicans M1 não conta com os genes necessários para a motilidade tipo “gliding”, a saber: os genes *gldB* e *gldD*, e não apresenta o gene *tra*, importante para o T4SS, embora apresente os demais genes do maquinário.

Biossíntese do pilus tipo IV: Em *H. rubrisubalbicans* M1: a base PilBC é codificada pelo operon *Hrubri_0332Hrubri_0331*. A estrutura transmembrana PilMNOP é codificada pelo operon *Hrubri_4114 Hrubri_4115 Hrubri_4116 Hrubri_4117*. A secretina PilQ é codificada pelo gene *Hrubri_4118*. As extensoras fimbriais PilA e PilE são codificadas por *Hrubri_0628* e *Hrubri_3629*. Das proteínas não essenciais de diversidade PilUVXW que recobrem a fimbria, *H. rubrisubalbicans* M1 não apresenta apenas PilU, as demais são codificadas pelo operon *Hrubri_3626Hrubri_3627Hrubri_3628*. Apresenta pilT2, gene *Hrubri_3774*, podendo realizar motilidade tipo “twitch”. Por último, PilZ é codificada pelo gene *Hrubri_1946*.

S2. PARTE I - MUTANTES CONSTRUÍDOS A PARTIR DO TRANSCRIPTOMA DA INTERAÇÃO ENTRE *H. rubrisubalbicans* M1 – *Sorghum bicolor*:

Material suplementar referente a estirpe mutante *Hrubri_0065*:

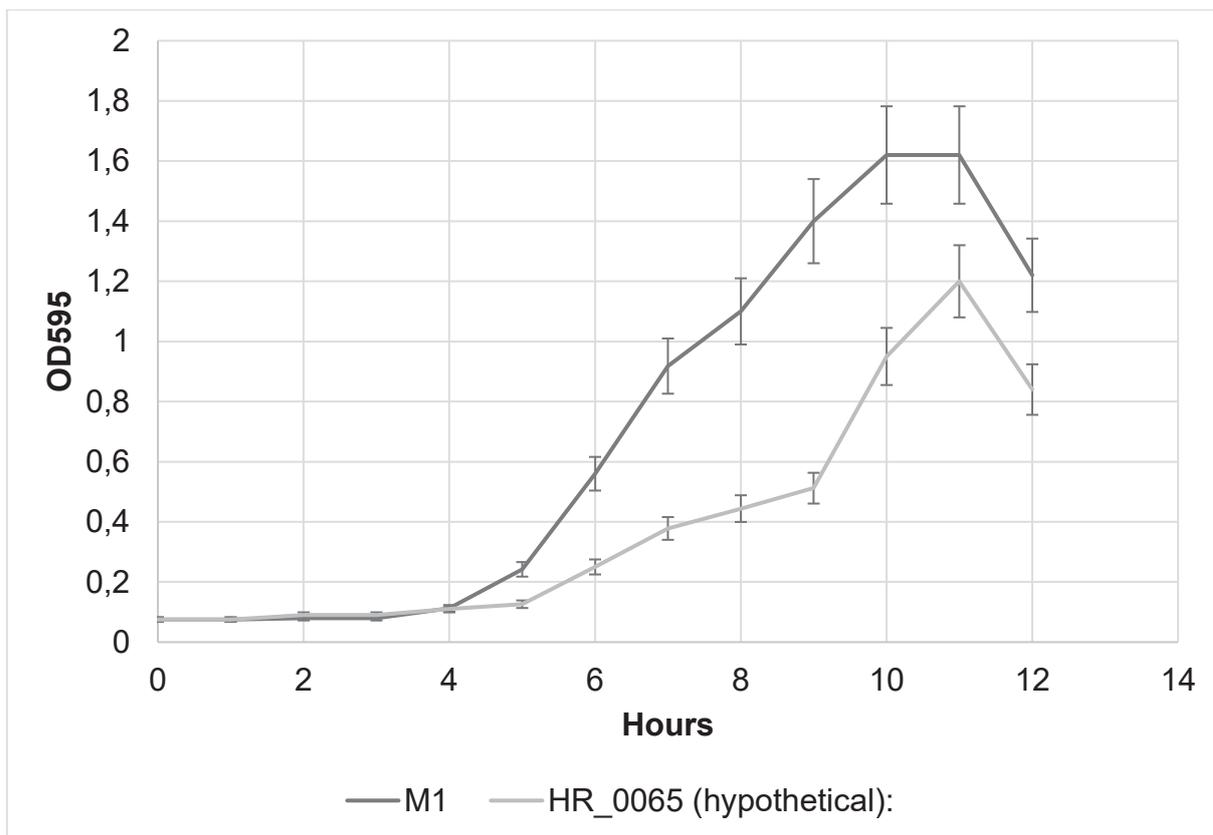


FIGURA 1S: Curva de crescimento da estirpe Hrubri_0065. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

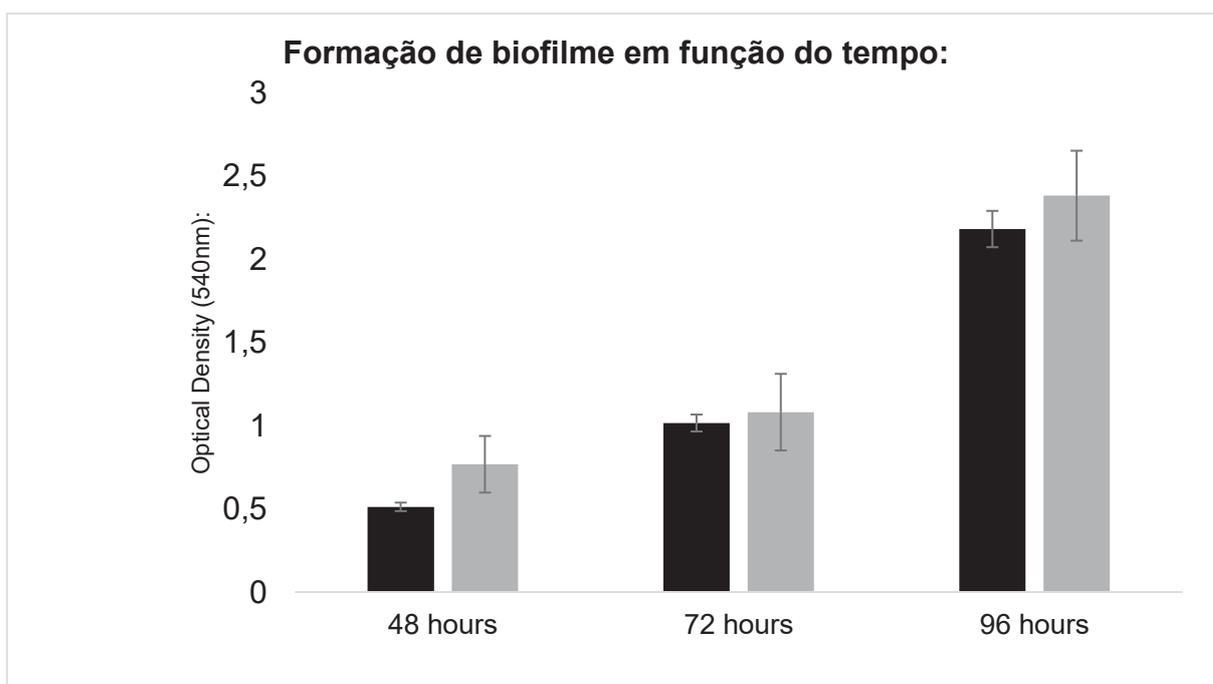


FIGURA 2S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_0065. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p > 0,05\%$.

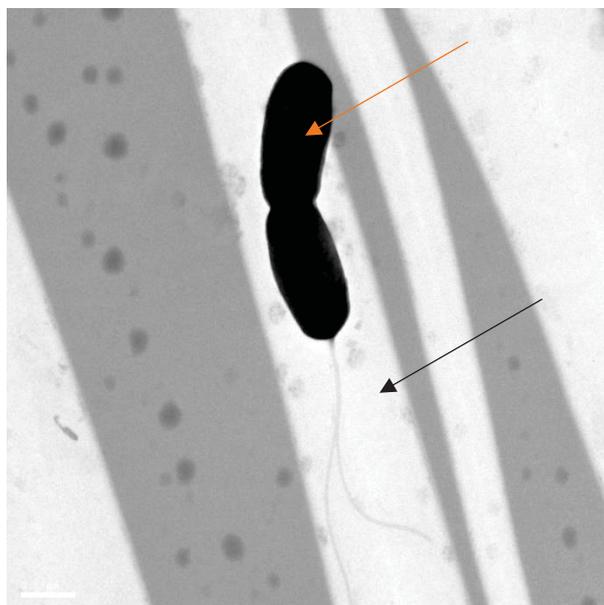


FIGURA 3S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_0065. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódica 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. A seta preta representa os flagelos, a seta amarela mostra grânulos intracelulares.

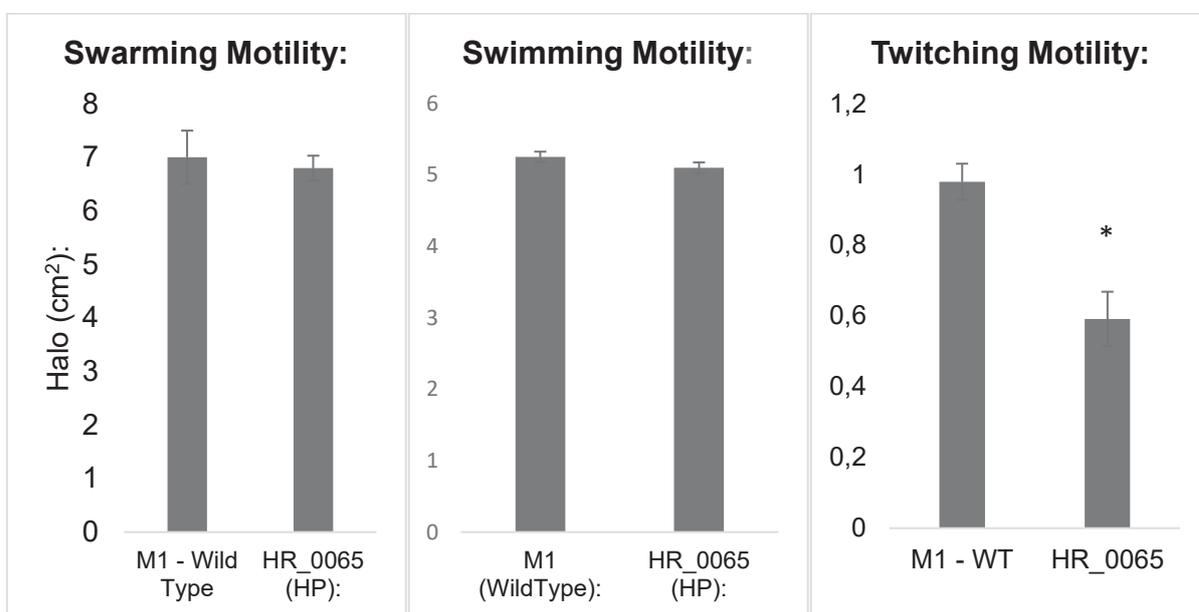


FIGURA 4S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_0065. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p > 0,05\%$.

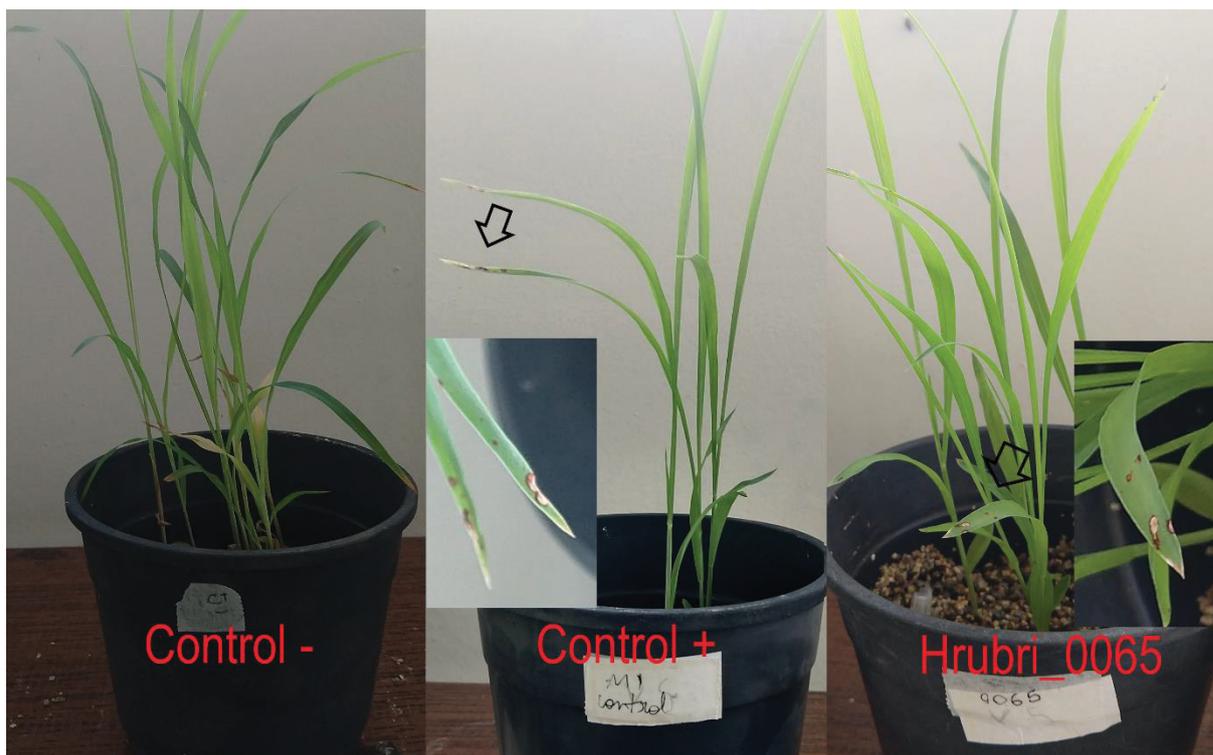


FIGURA 5S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_0065. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

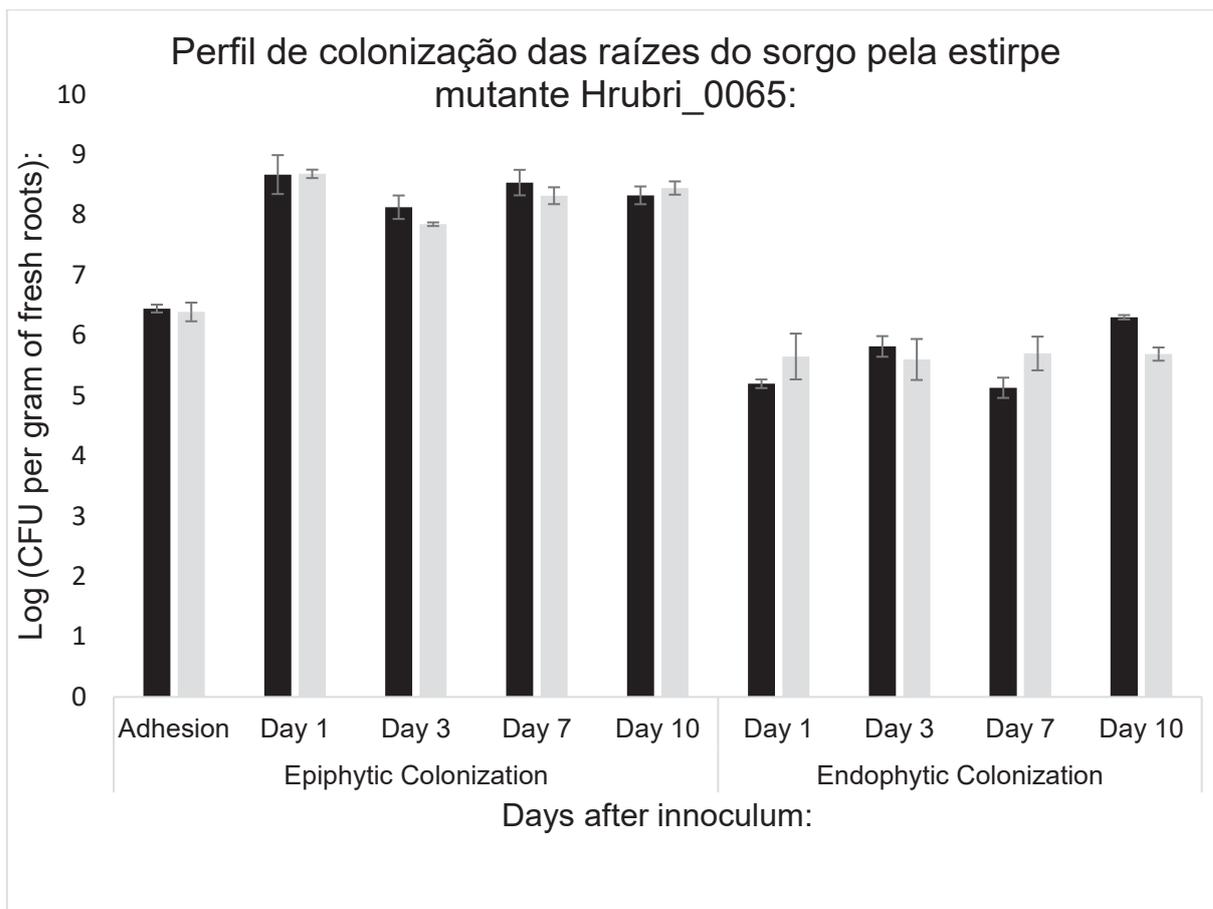


FIGURA 6S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_0065. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p > 0,05$ em teste T-student.

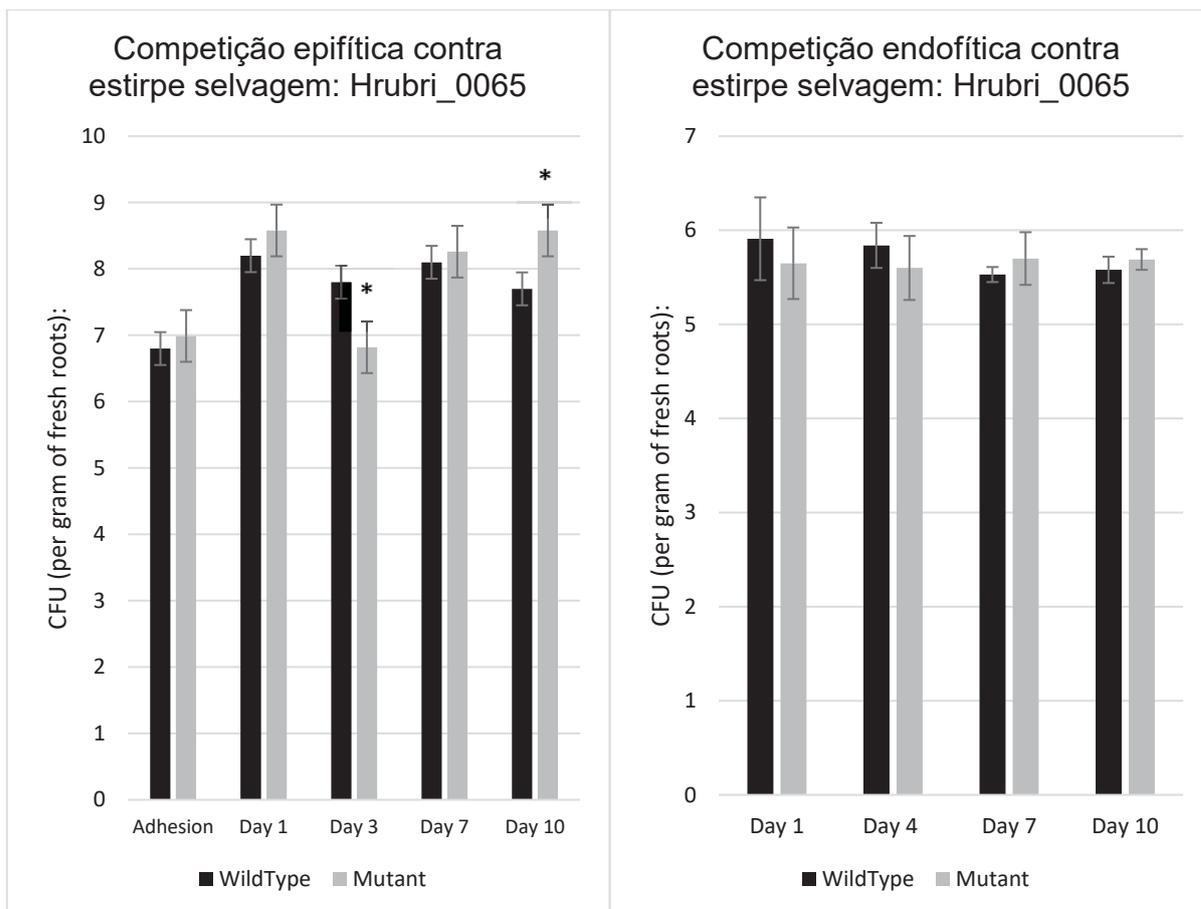


FIGURA 86: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_0065 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p > 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_0505

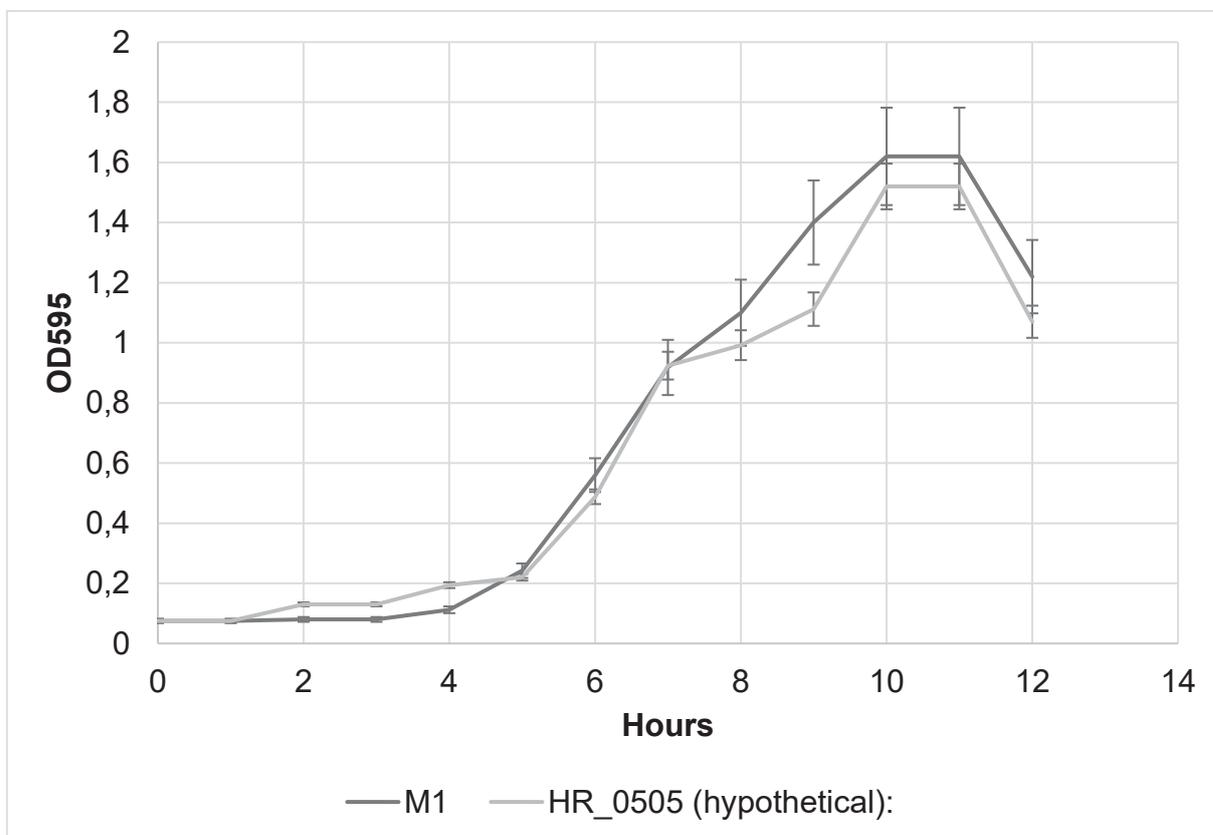


FIGURA 8S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_0505. Curva de crescimento da estirpe Hrubri_0065. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

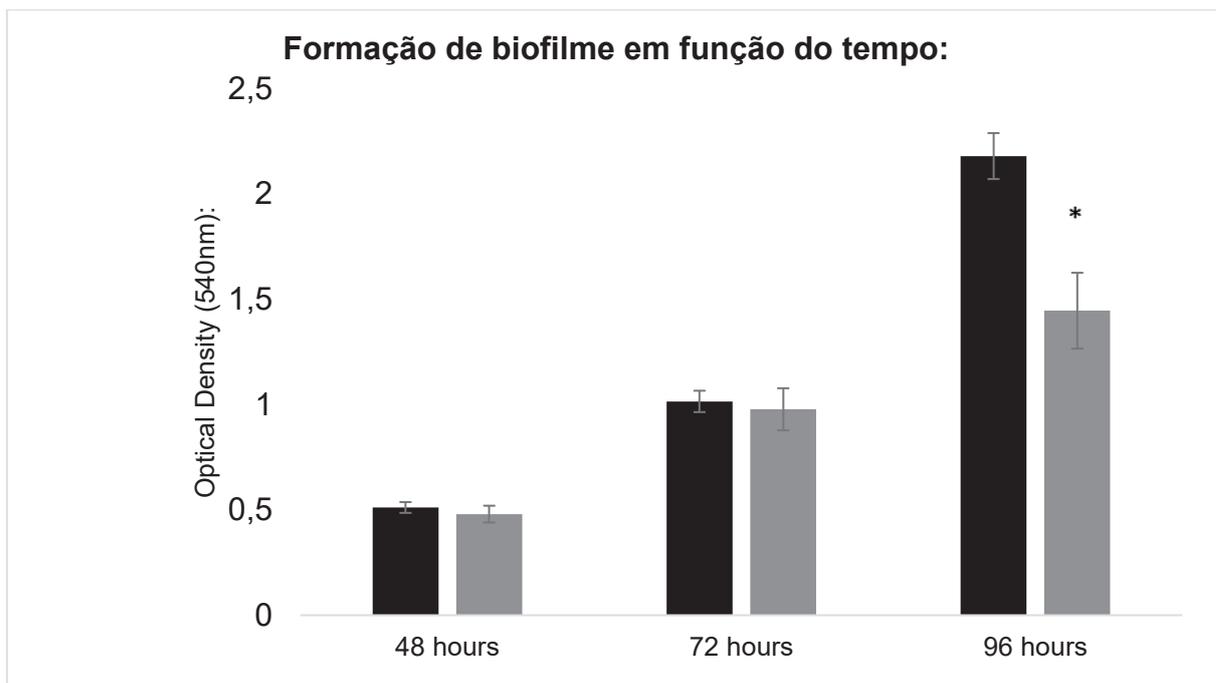


FIGURA 9S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_0505. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

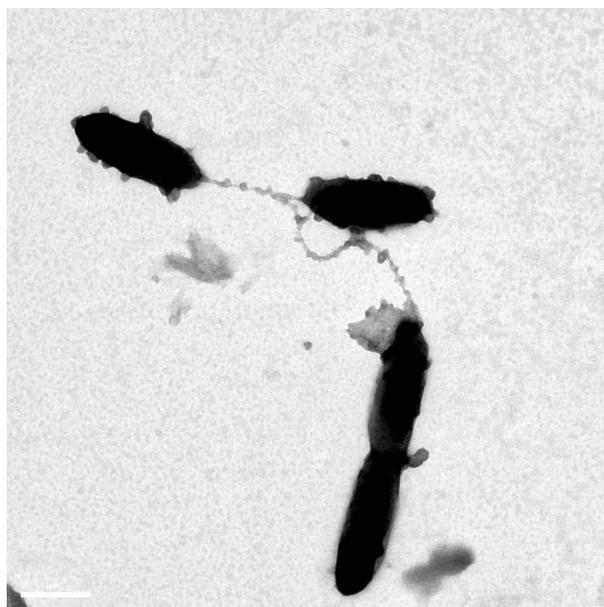


FIGURA 10S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_0505. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódica 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. É possível observar as vacuolizações na membrana e flagelos.

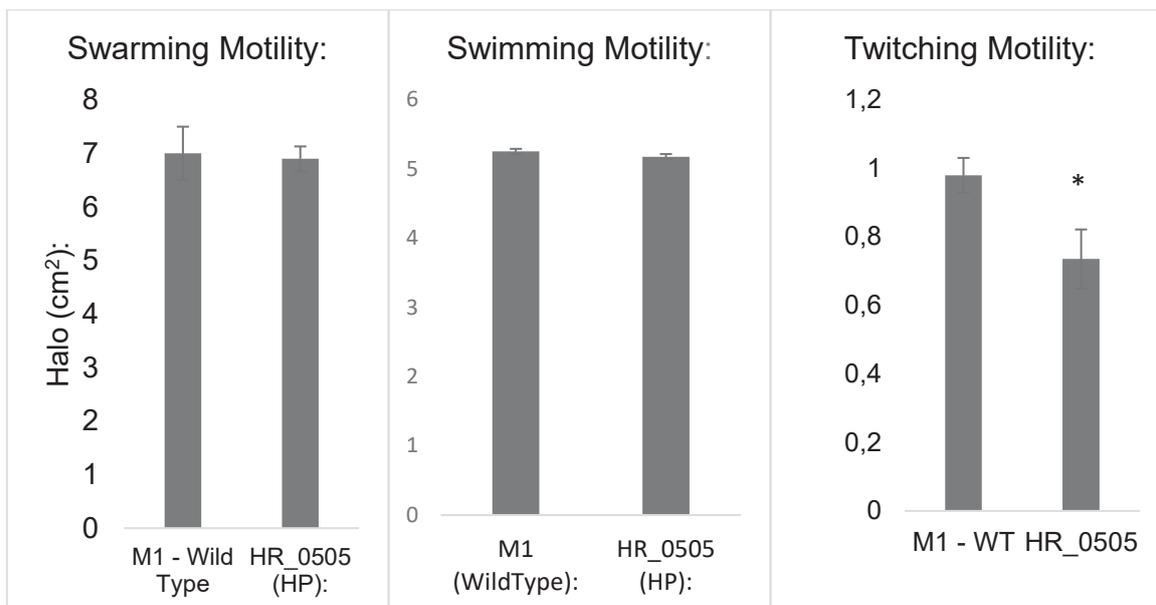


FIGURA 11S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_0505. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

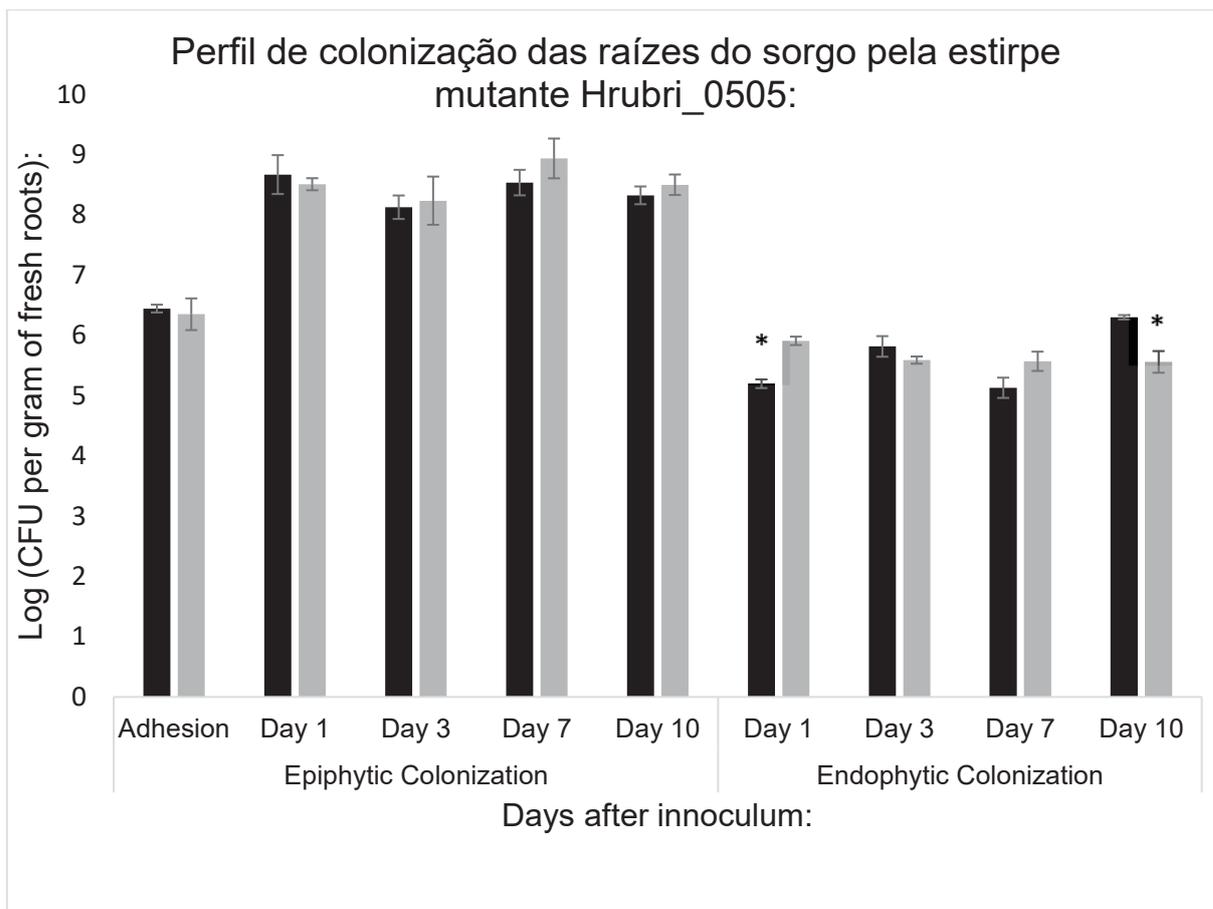


FIGURA 12S: Perfis de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_0505. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

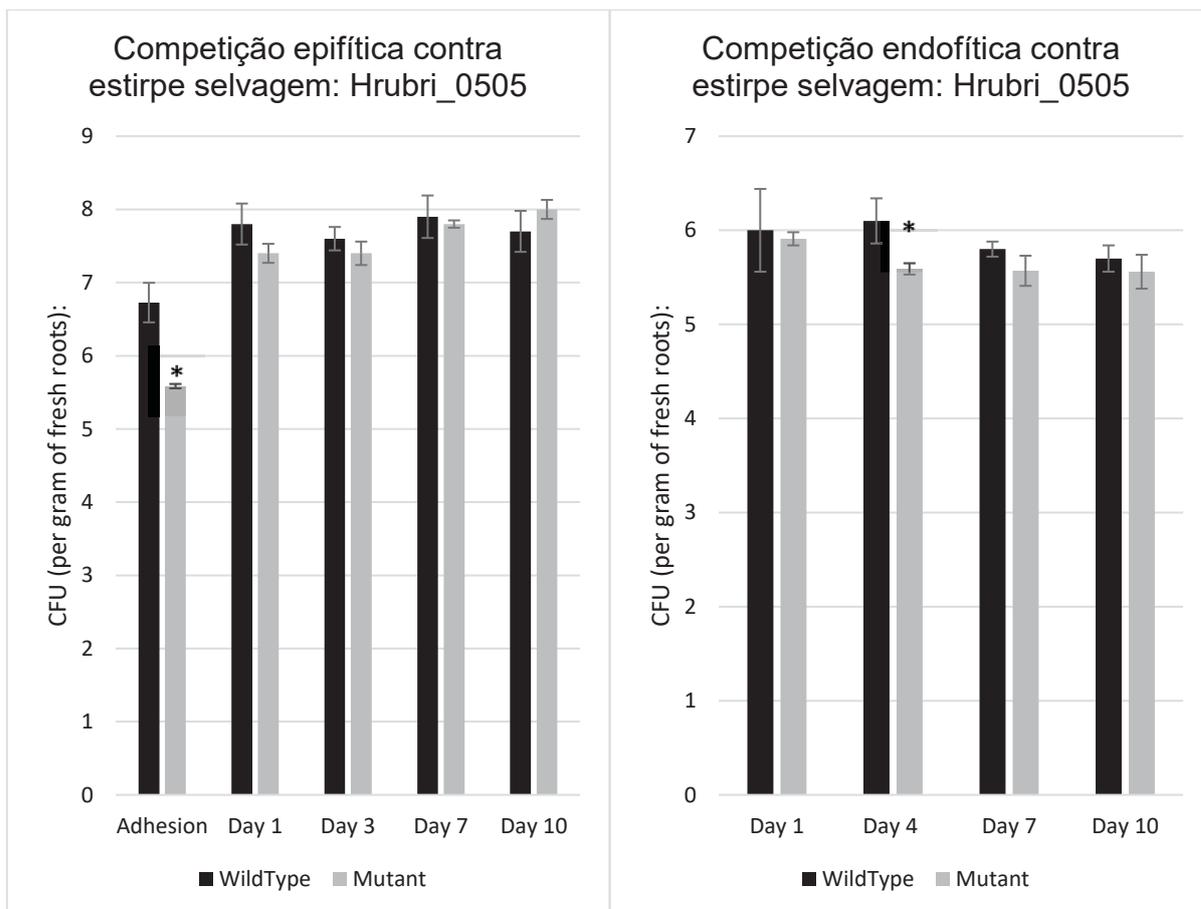


Figura 13S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_0505 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

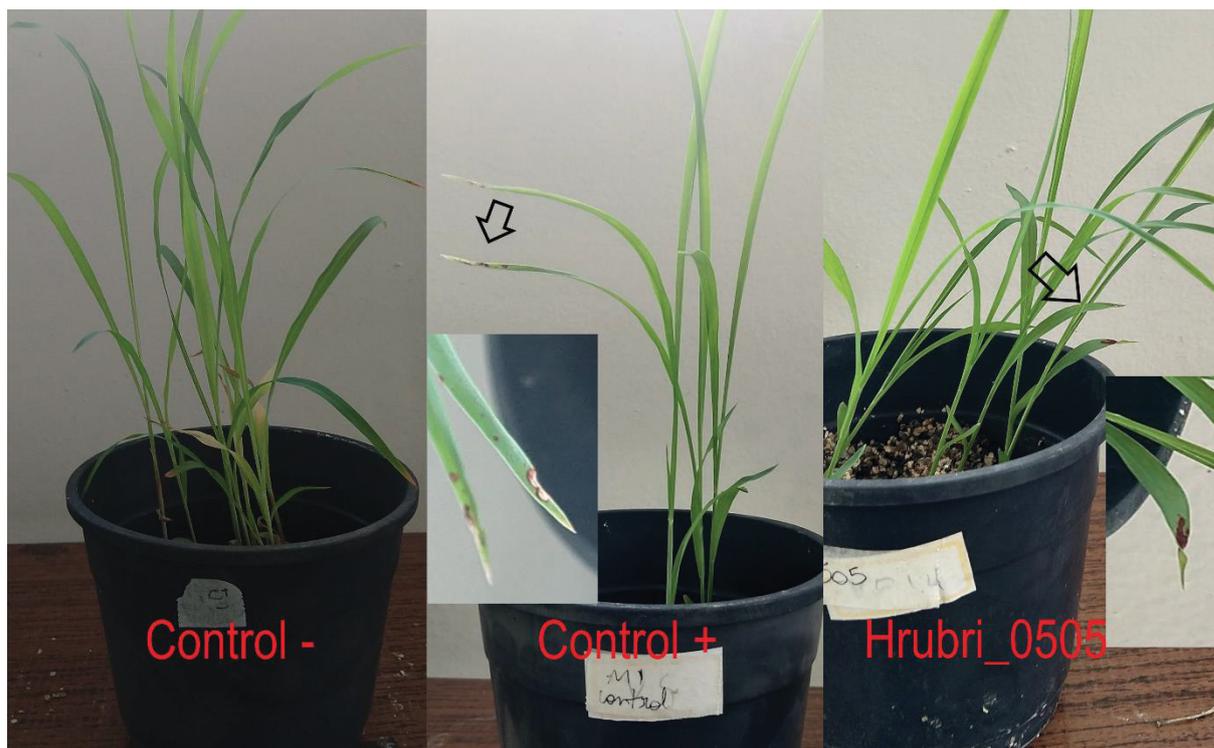


FIGURA 14S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_0505. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_0762

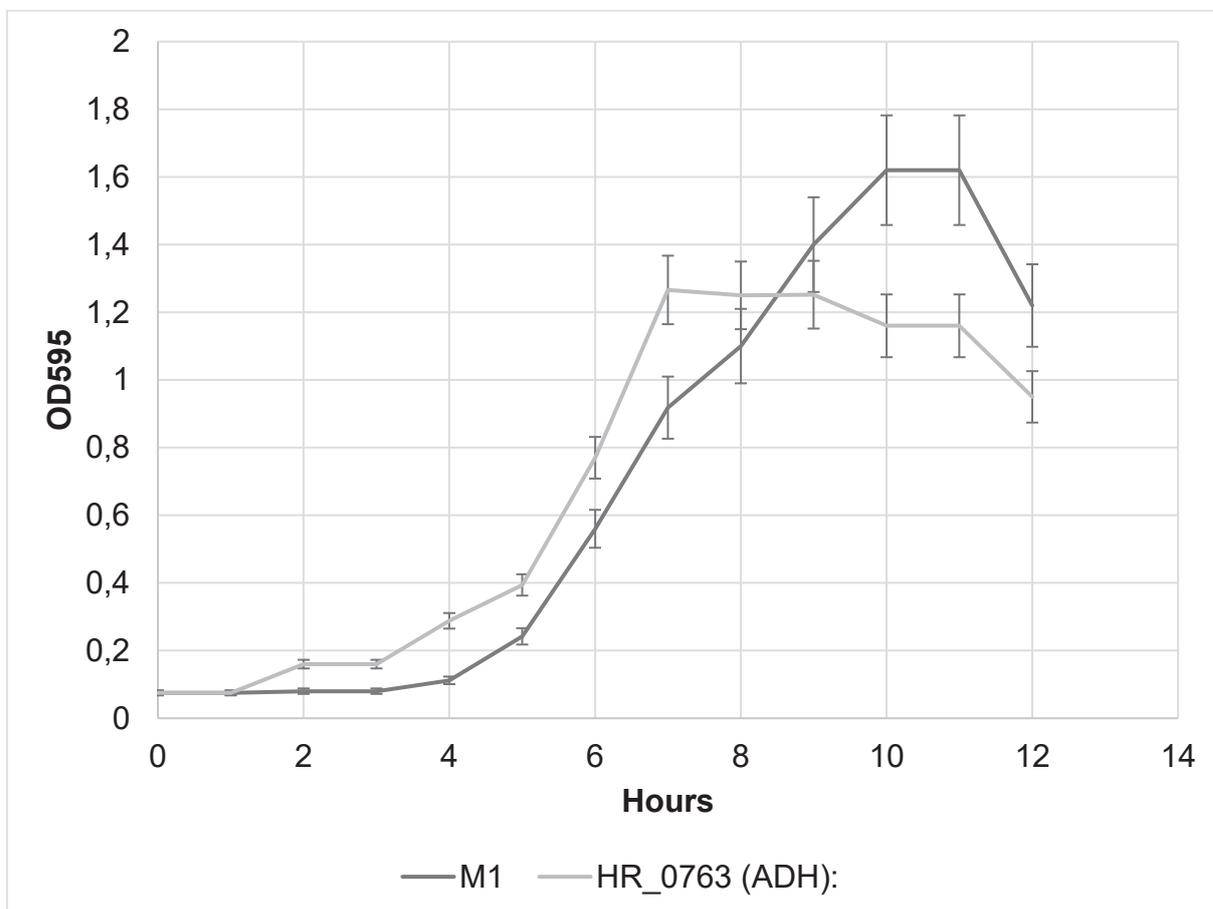


FIGURA 15S: curva de crescimento estirpe Hrubri_0762. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

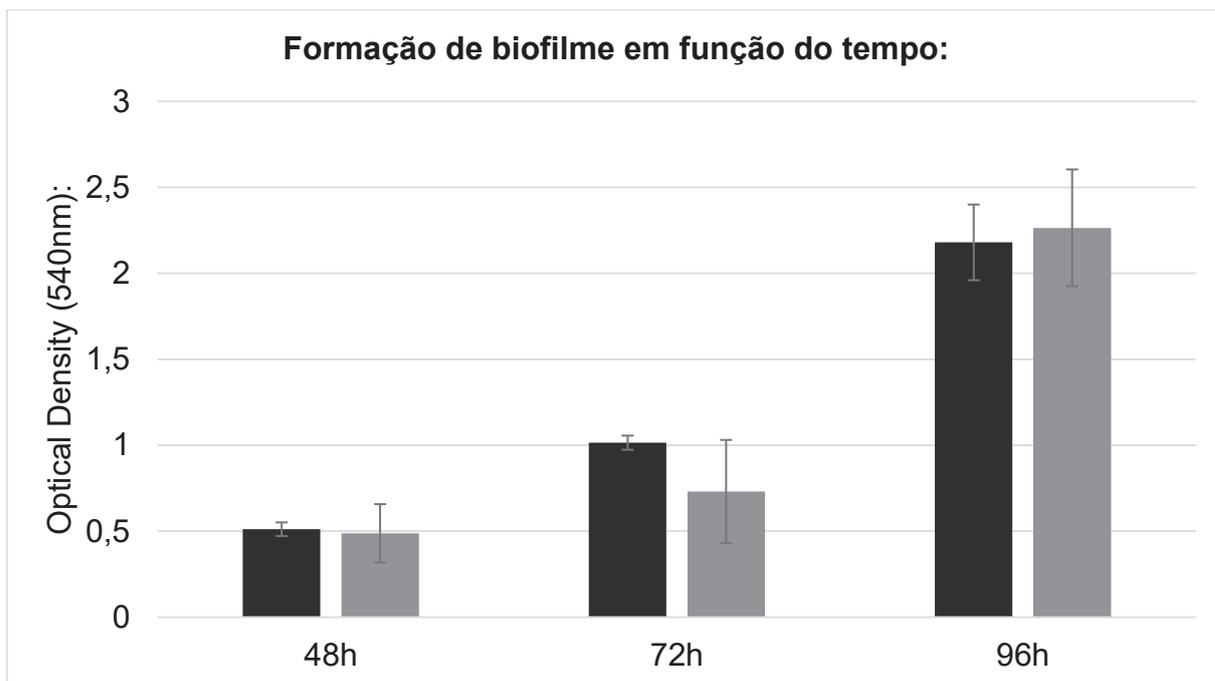


FIGURA 16S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_0762. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

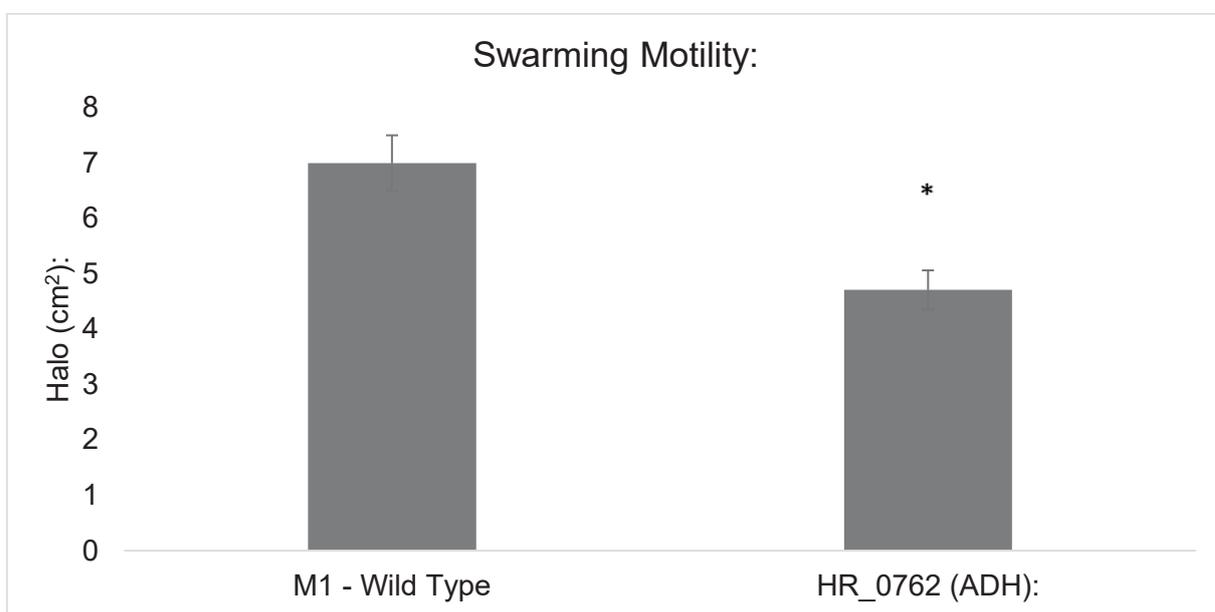


FIGURA 17S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_0762. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

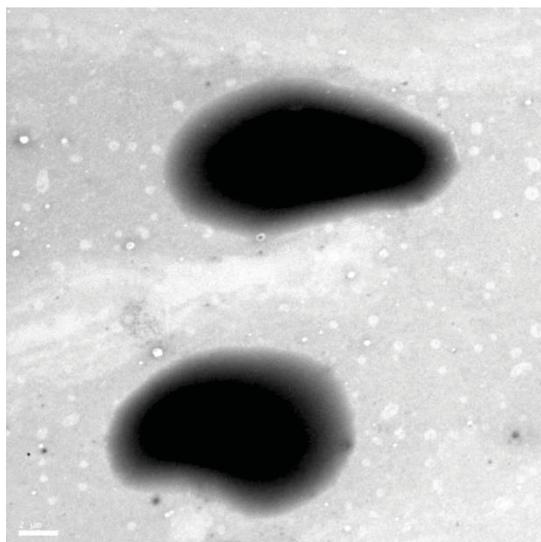


FIGURA 18S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_0762. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódica 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. Essa estirpe não apresentou fenótipo compatível com a fixação.

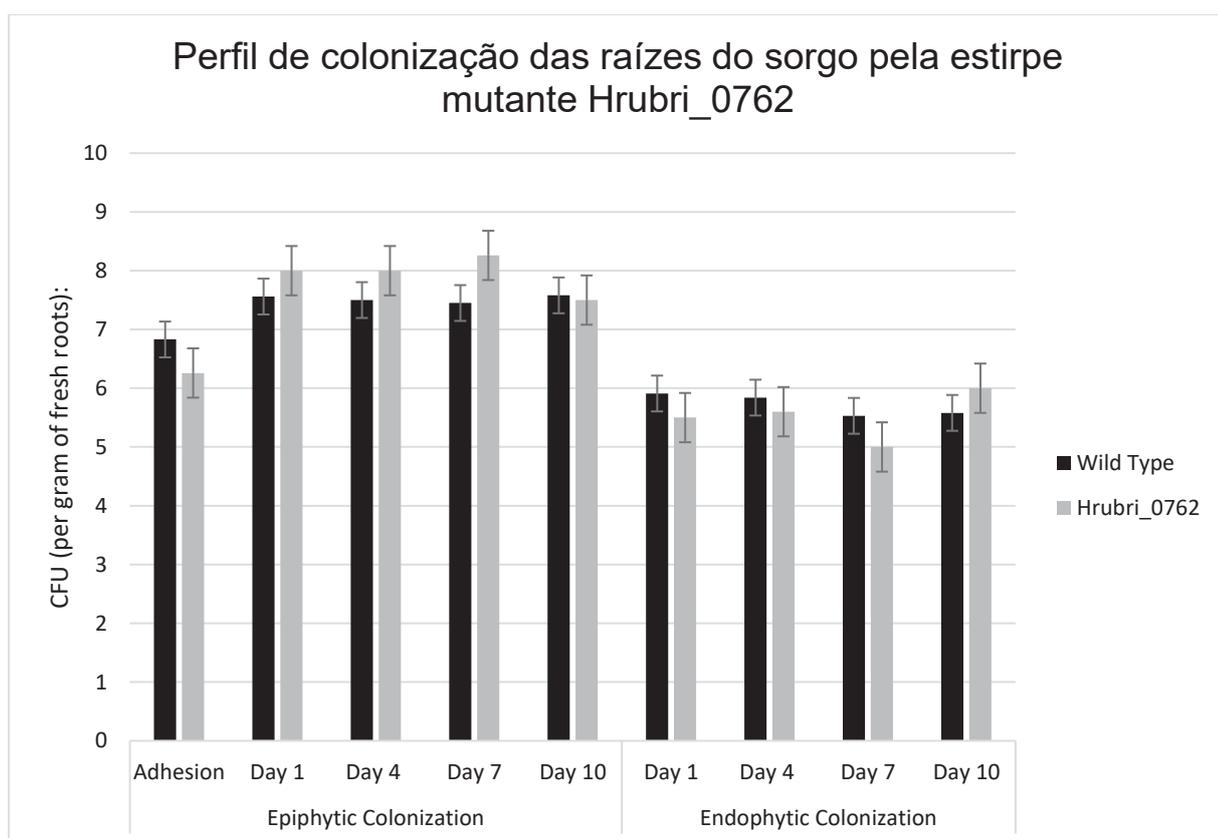


FIGURA 19S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_0762. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

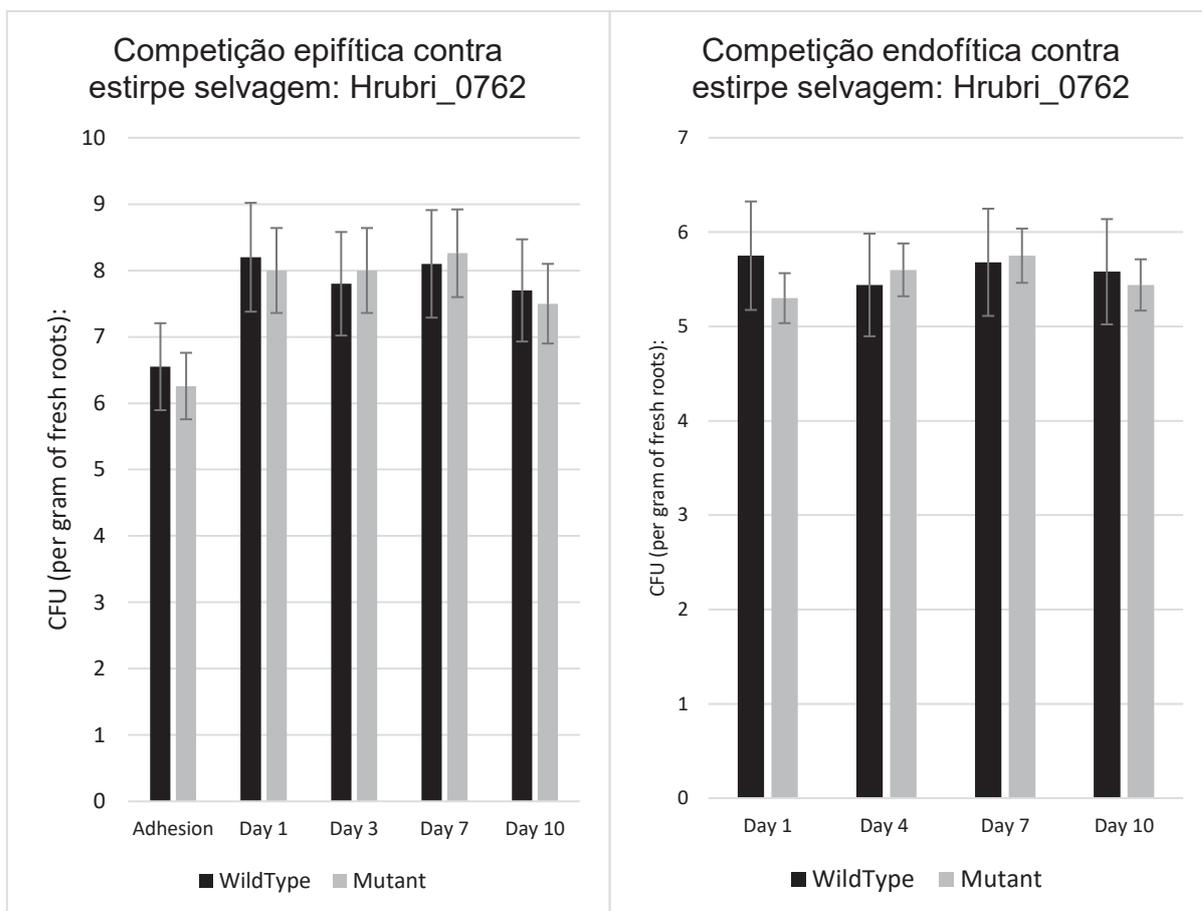


FIGURA 20S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_0762 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

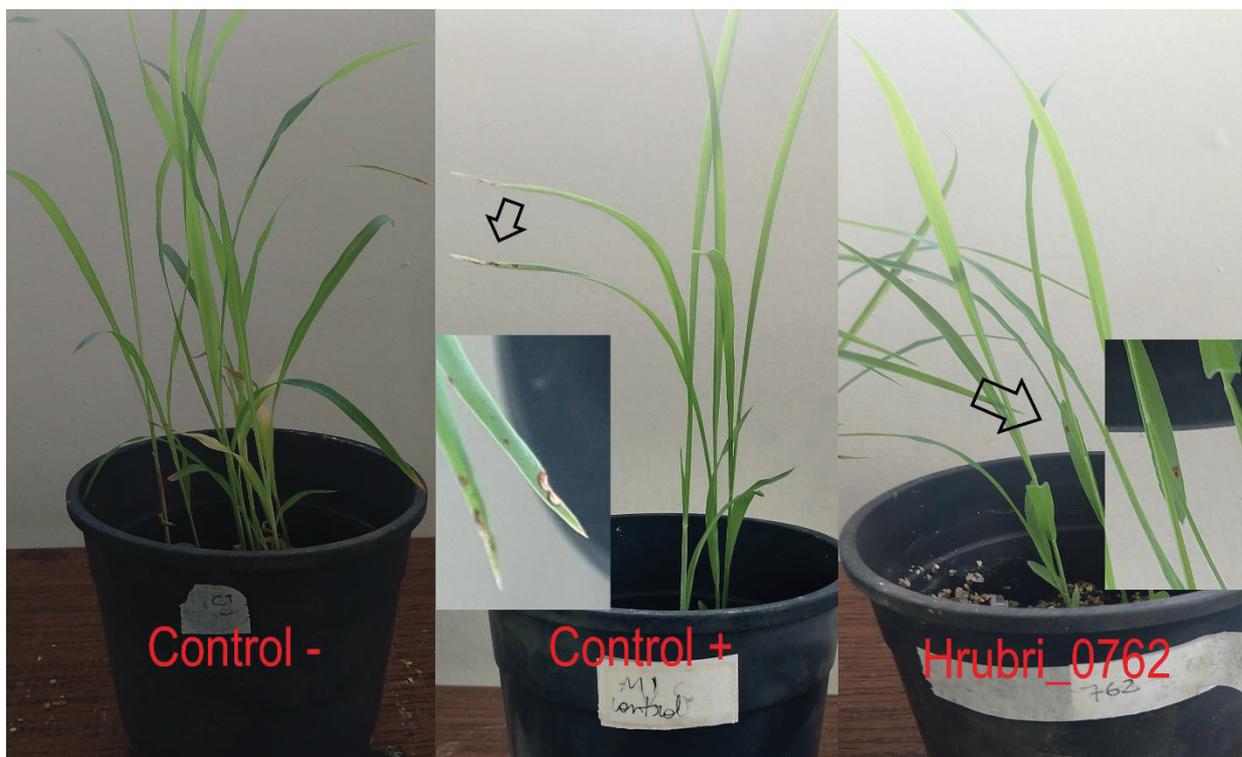


FIGURA 21S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_0762. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_0842

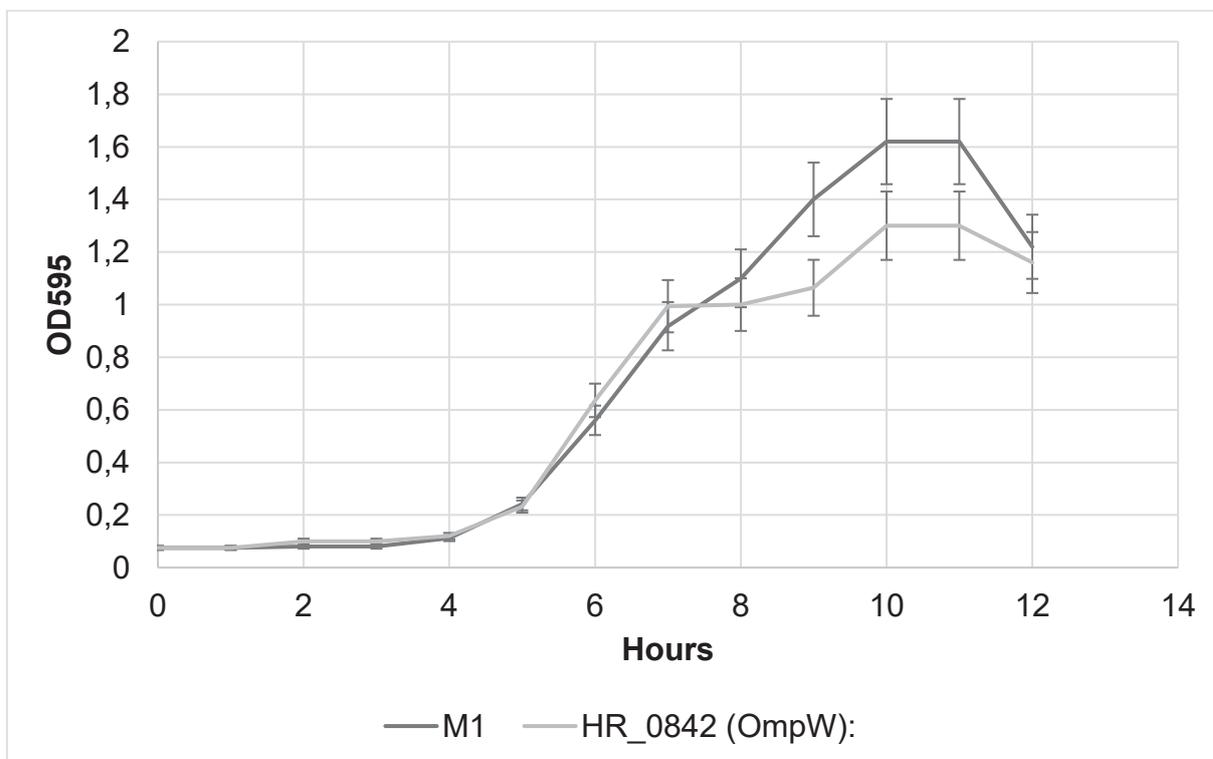


FIGURA 22S: CURVA DE CRESCIMENTO ESTIRPE HRUBRI_0842. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

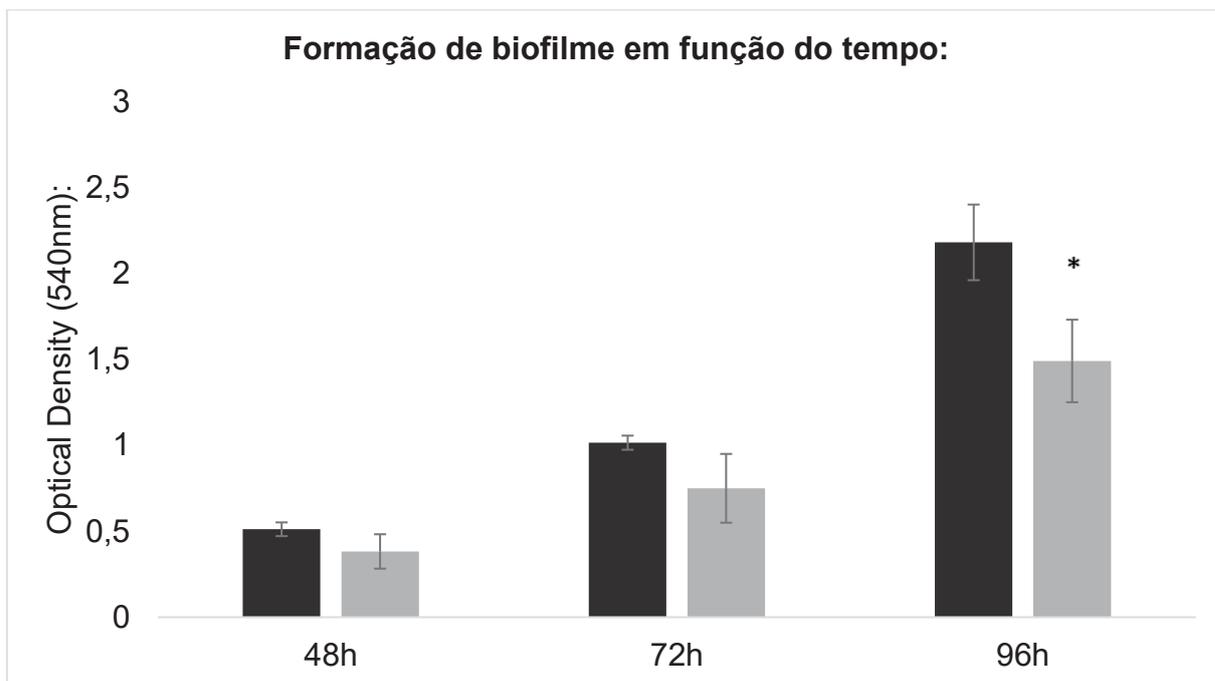


FIGURA 23S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_0842. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

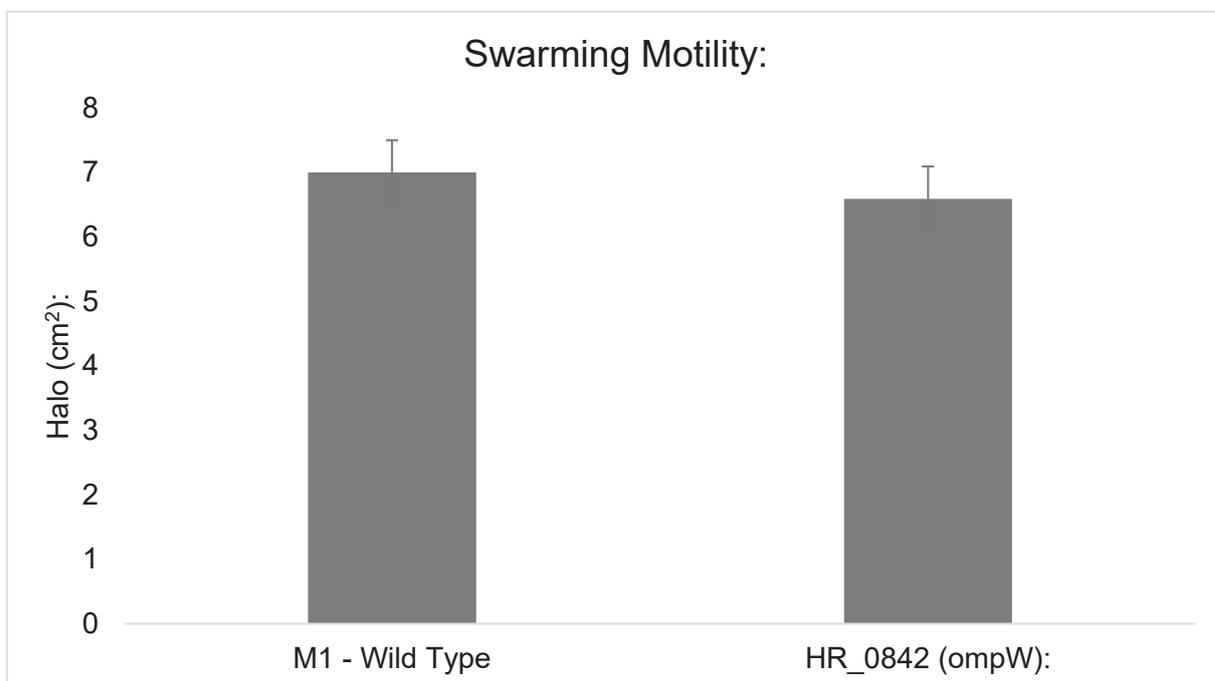


FIGURA 24S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_0842. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

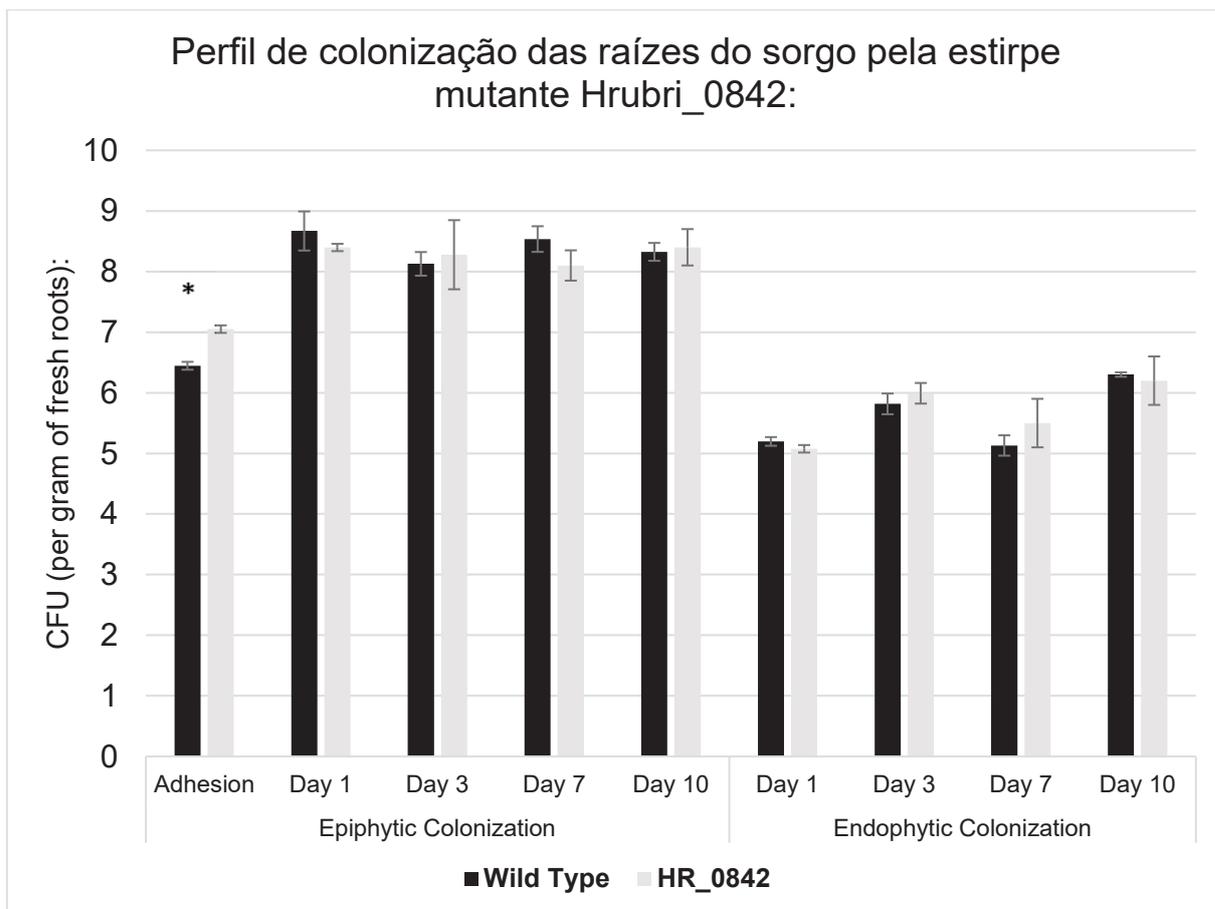


FIGURA 25S: Perfis de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_0842. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

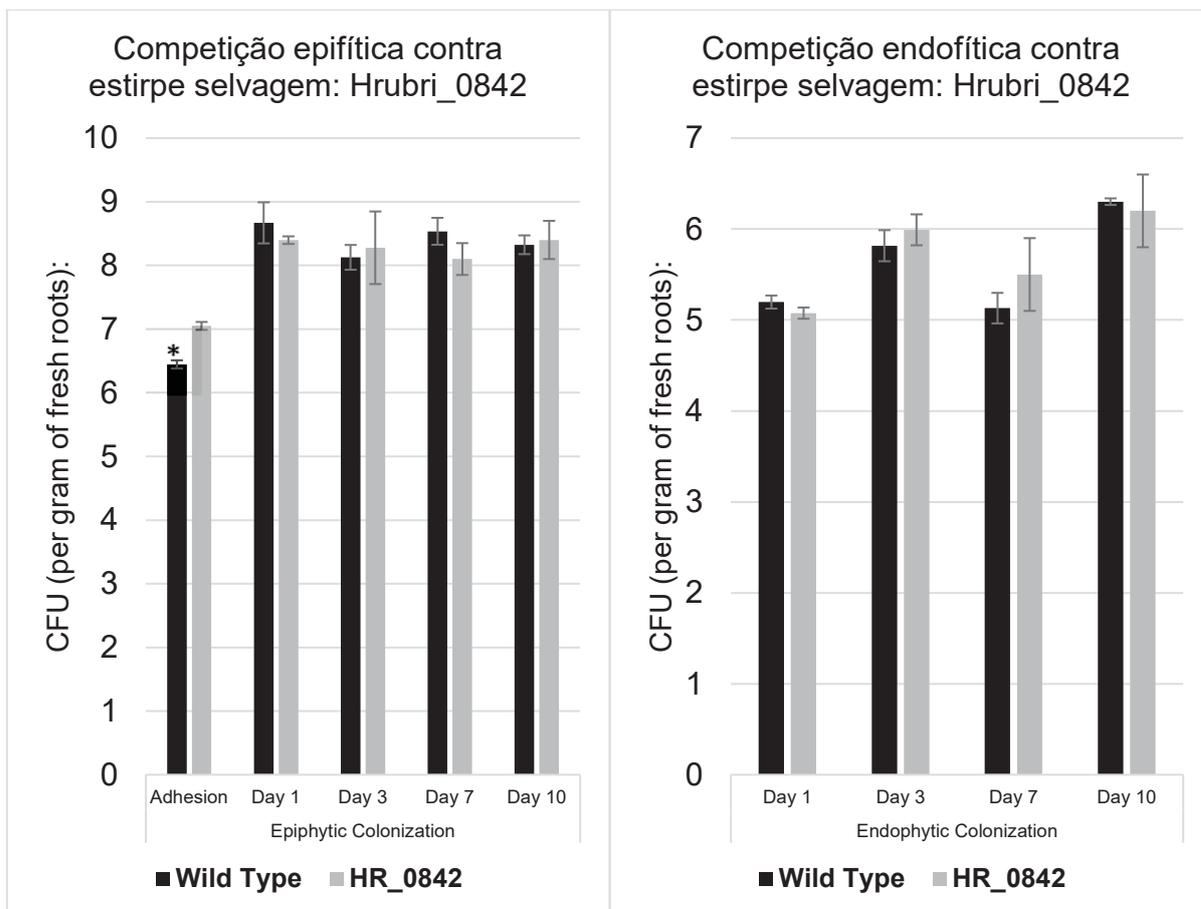


FIGURA 26S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_0842 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

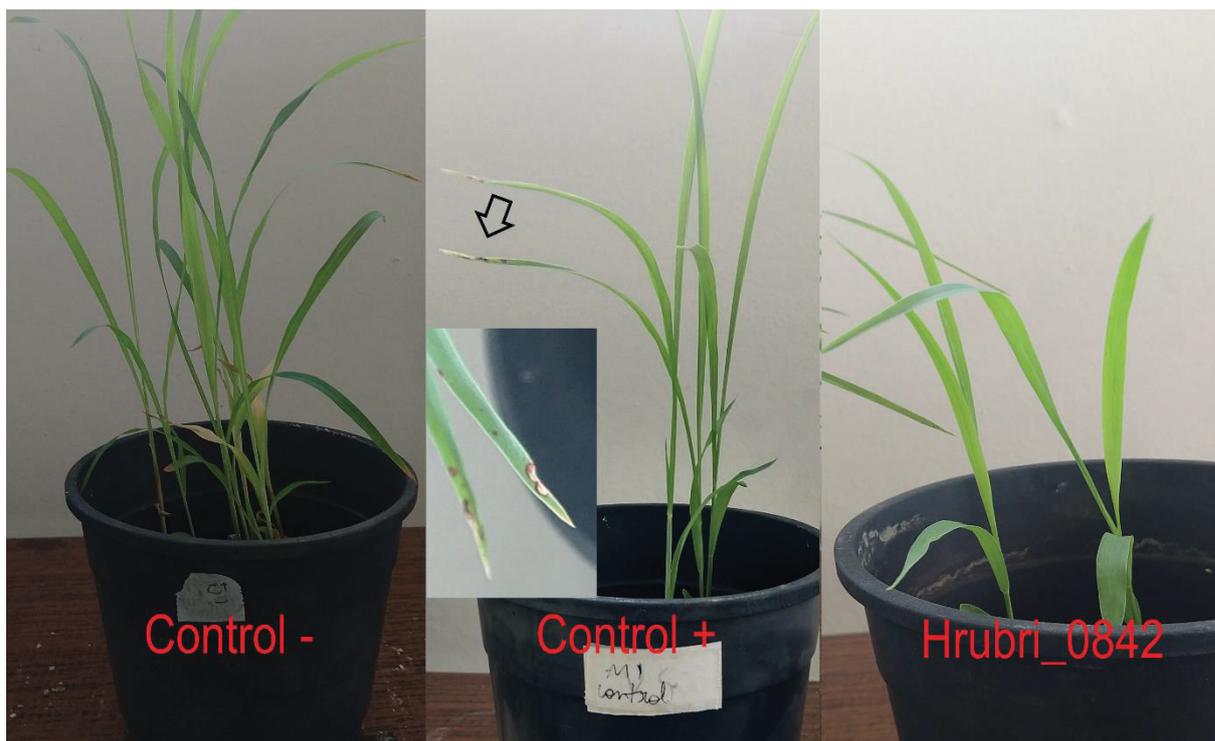


FIGURA 27S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_0842. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_1953

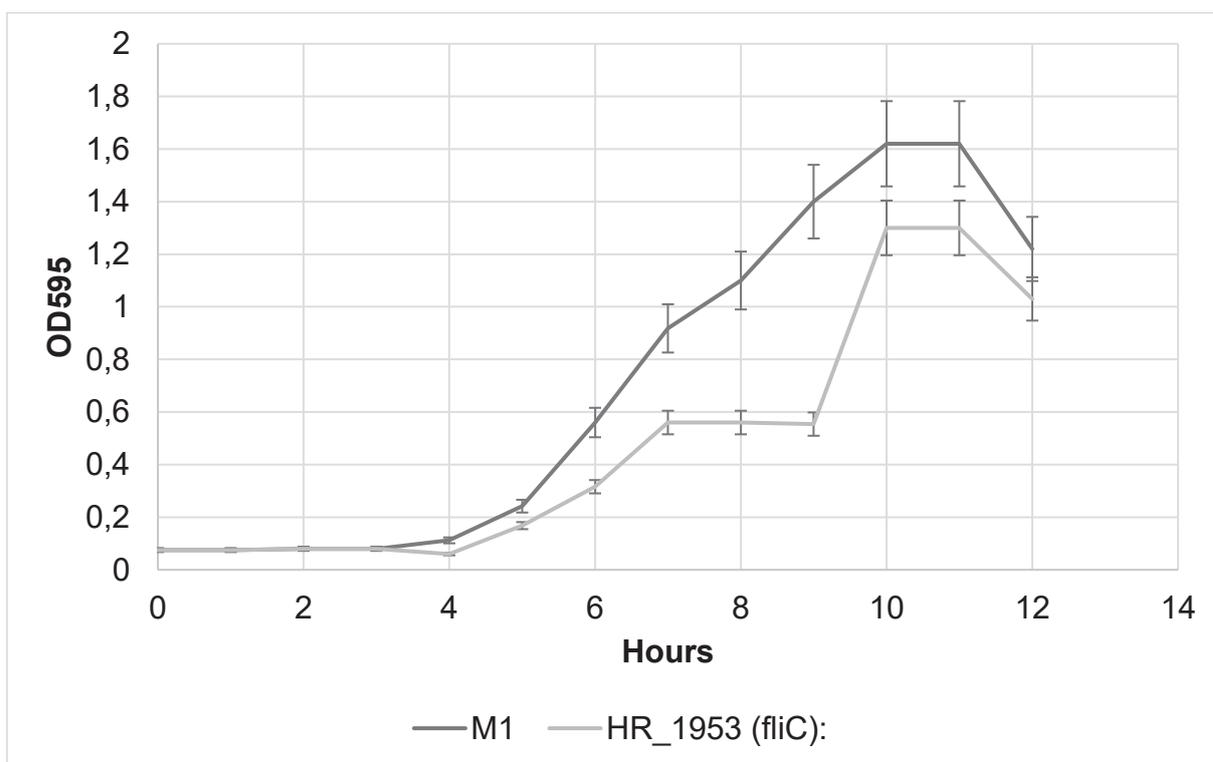


FIGURA 28S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_1953. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

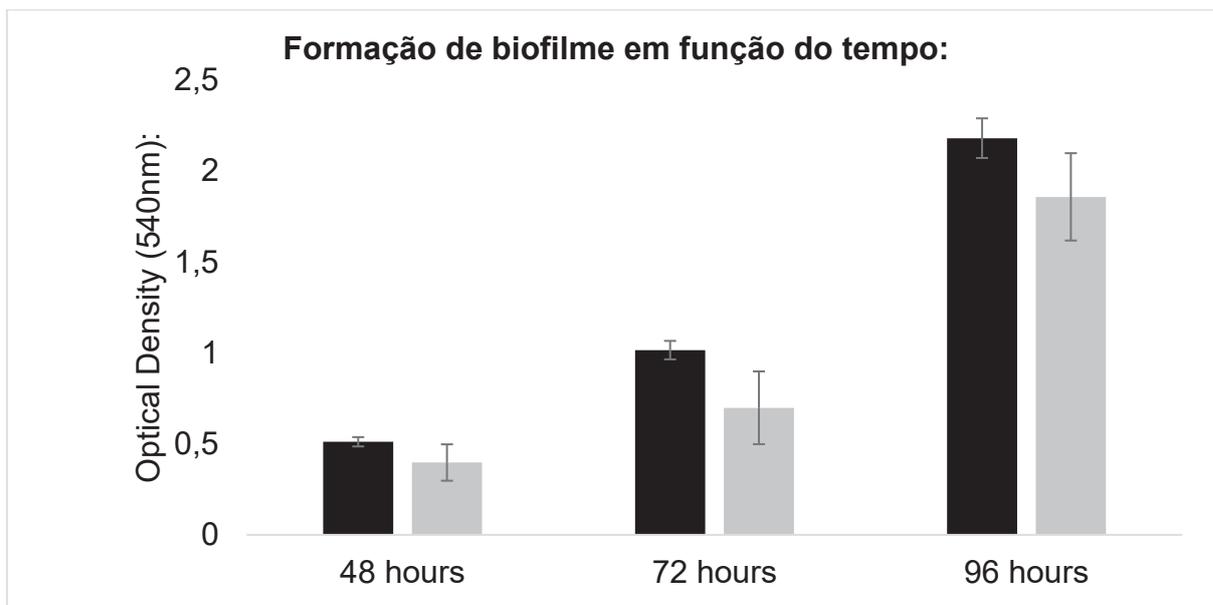


FIGURA 29S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_1953. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

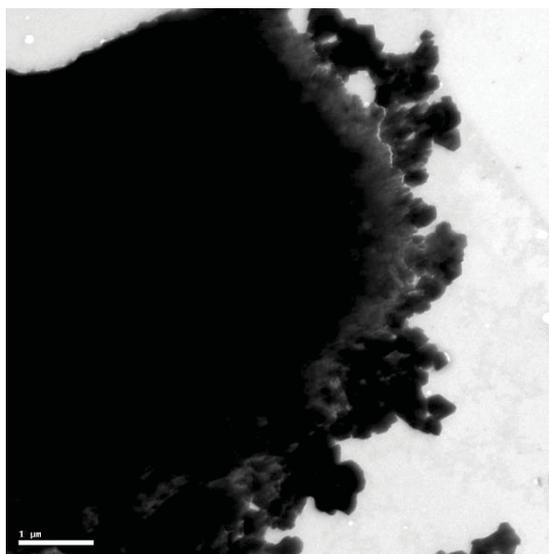


FIGURA 30S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_1953. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódica 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. Essa estirpe apresentou fenótipo de agregação incompatível com a técnica.

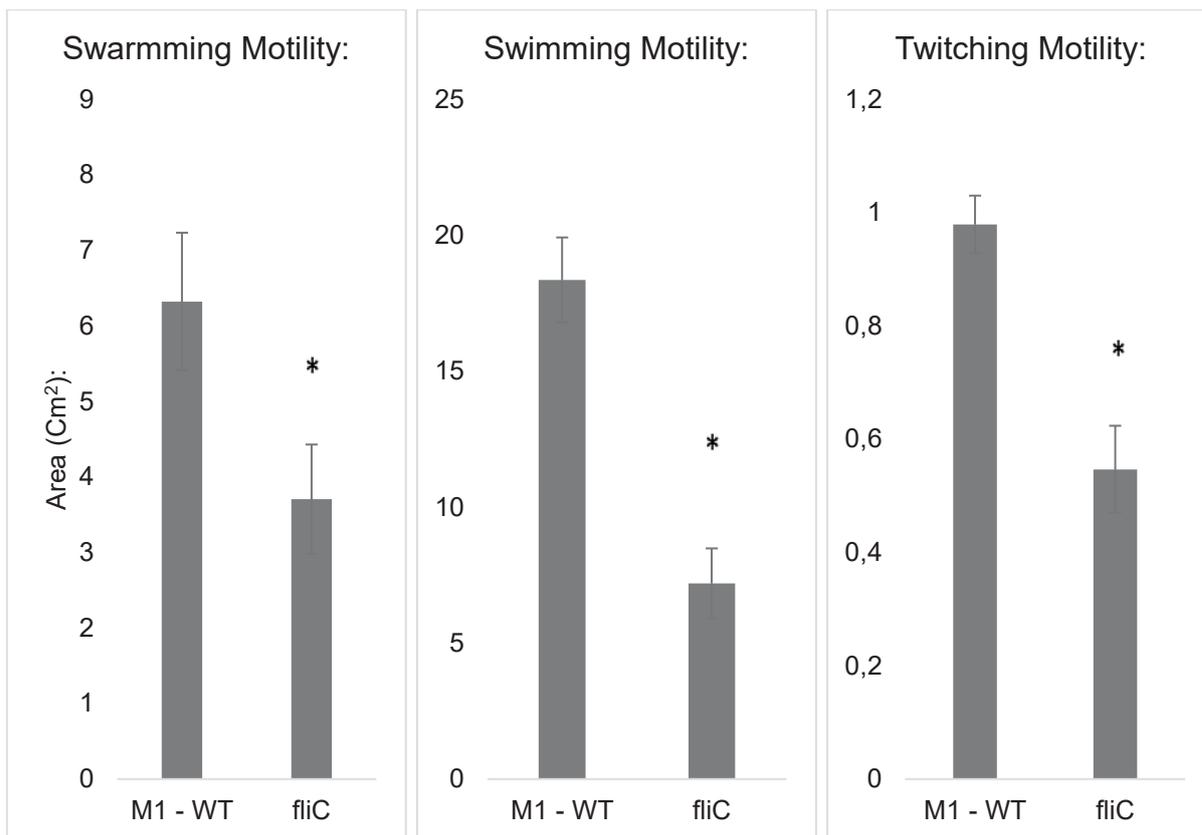


FIGURA 31S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_1953. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

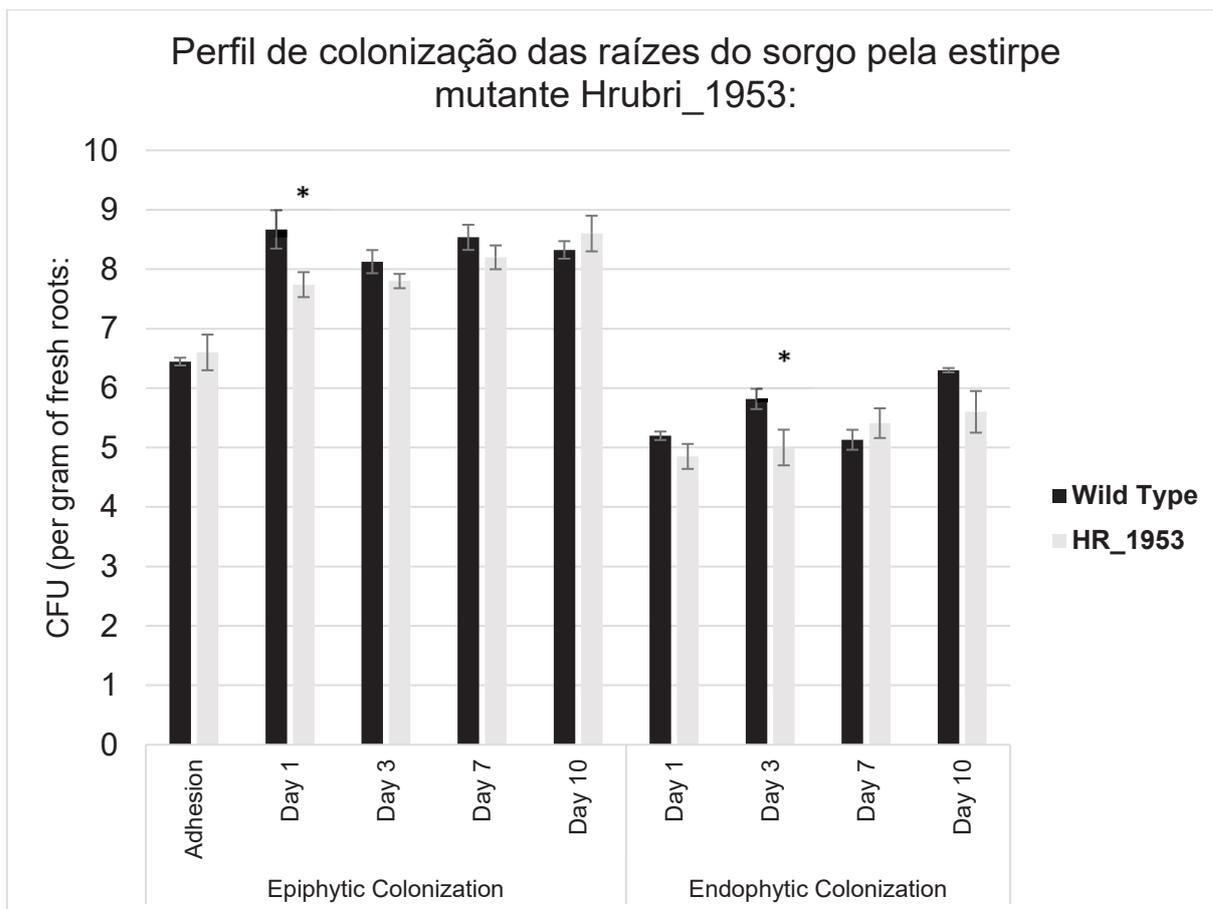


FIGURA 32S: Perfis de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_1953. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

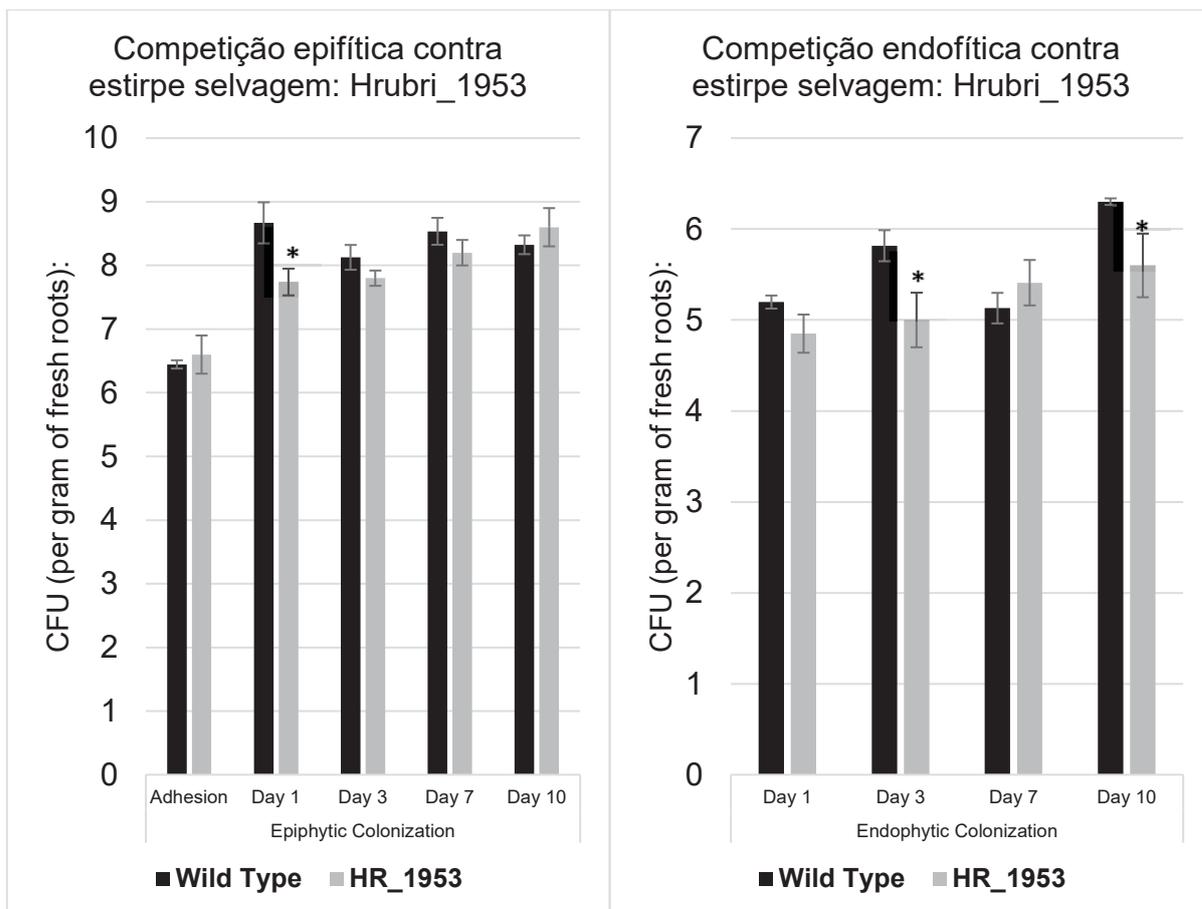


FIGURA 33S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_1953 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

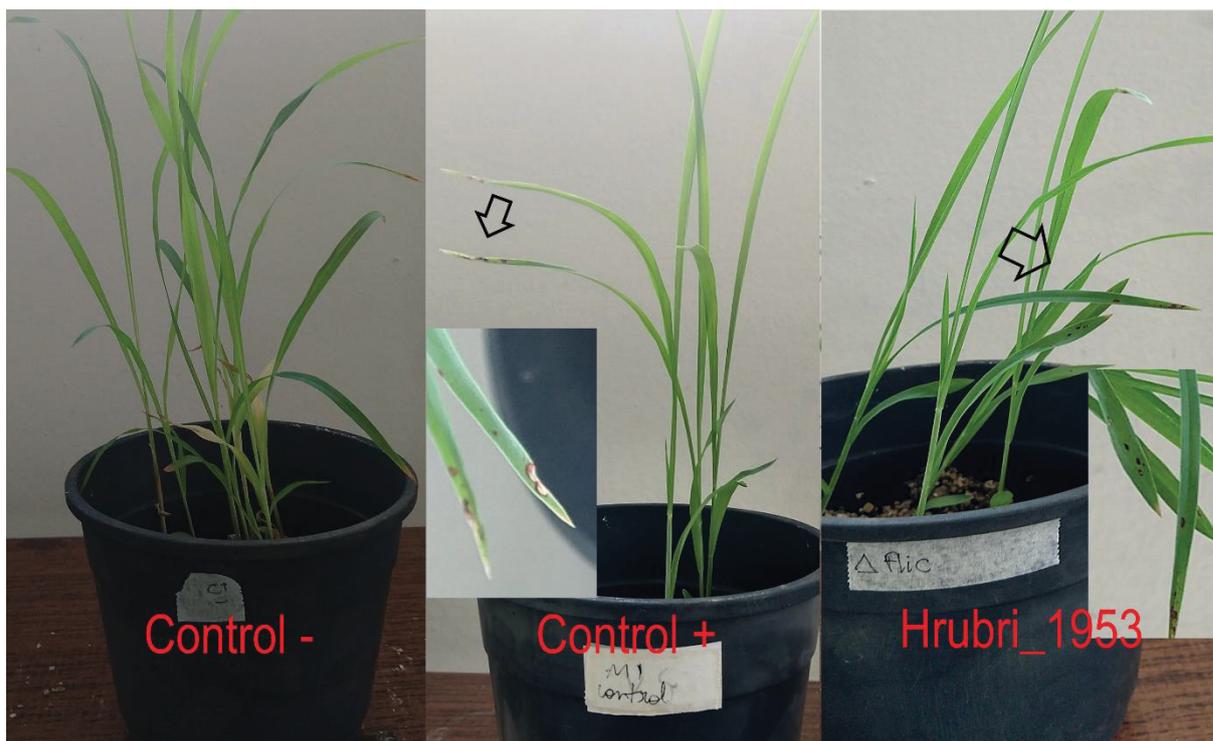


FIGURA 34S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_1953. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 105 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_0835

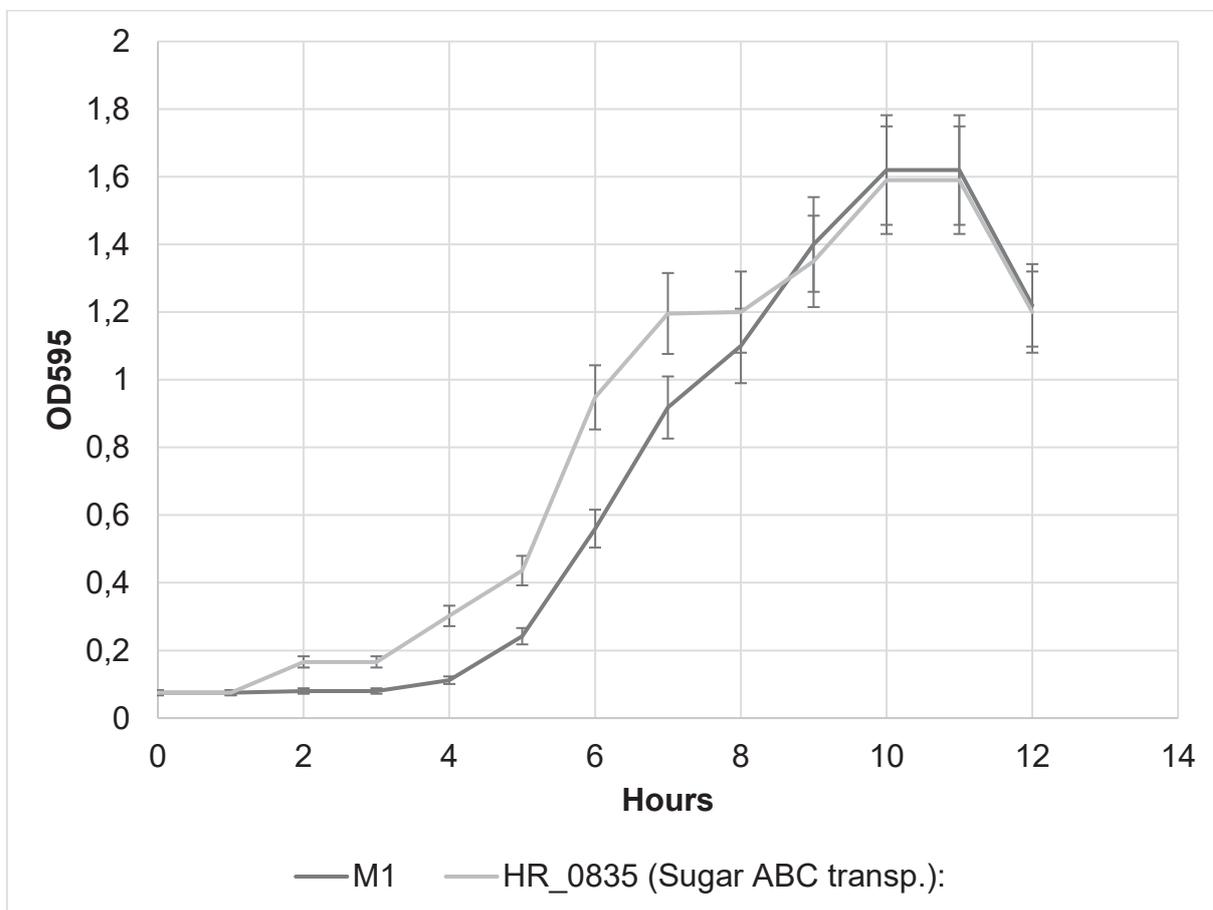


FIGURA 35S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_0835. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

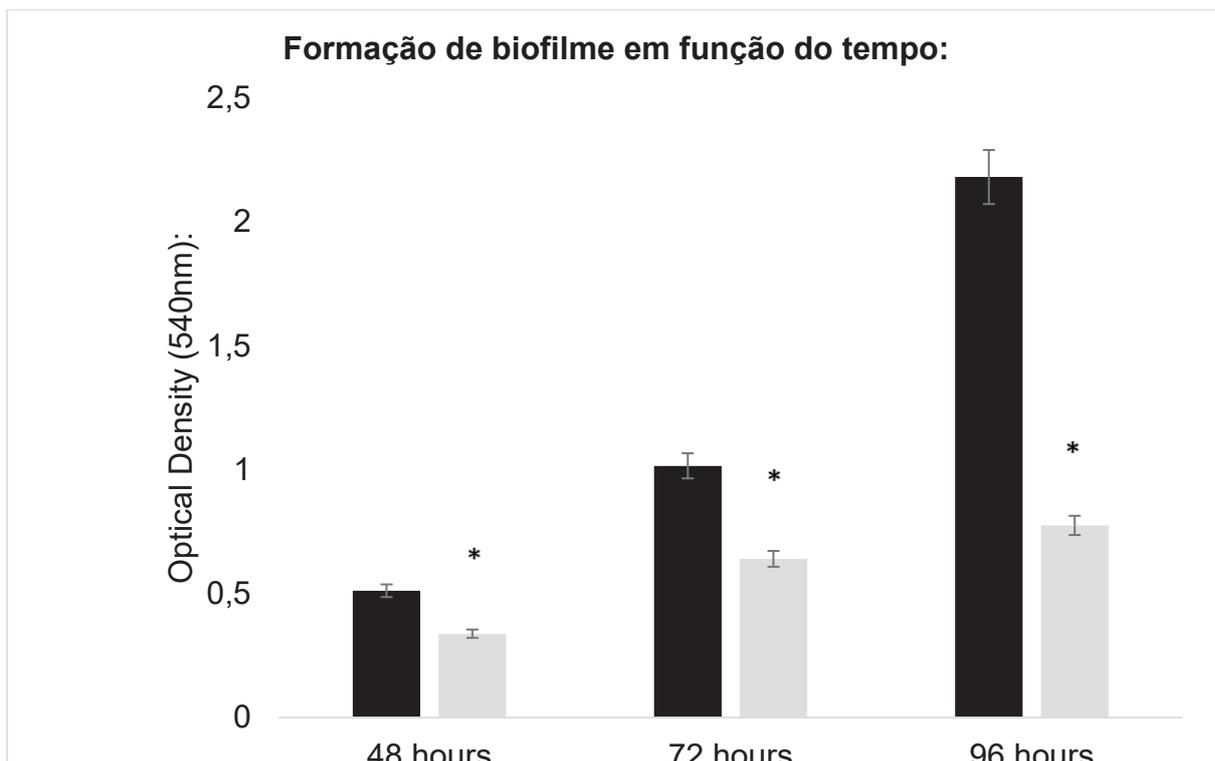


FIGURA 36S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_0835. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

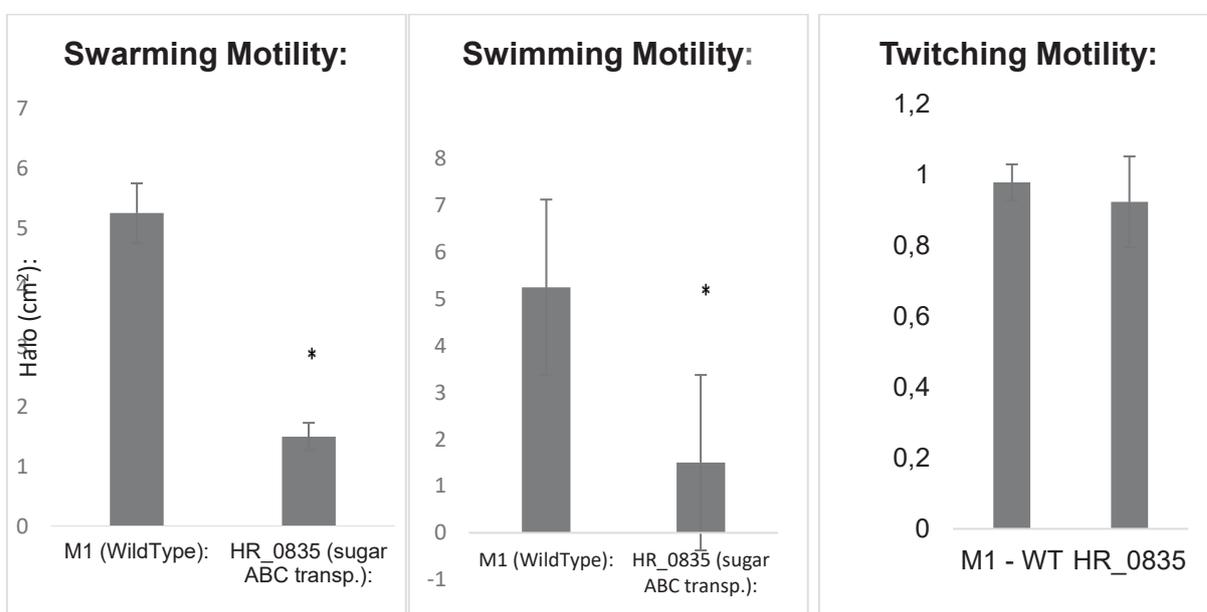


FIGURA 37S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_0835. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

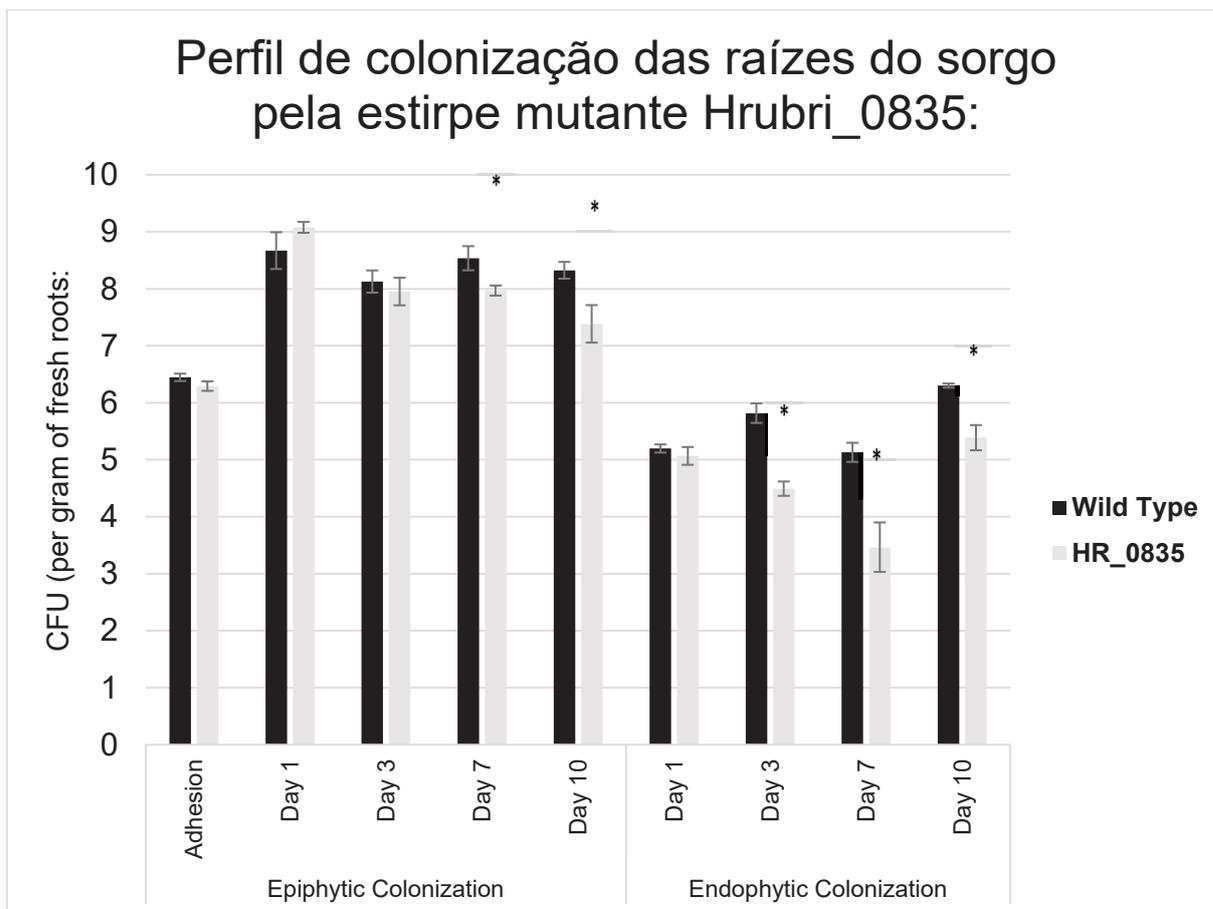


FIGURA 38S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_0835. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

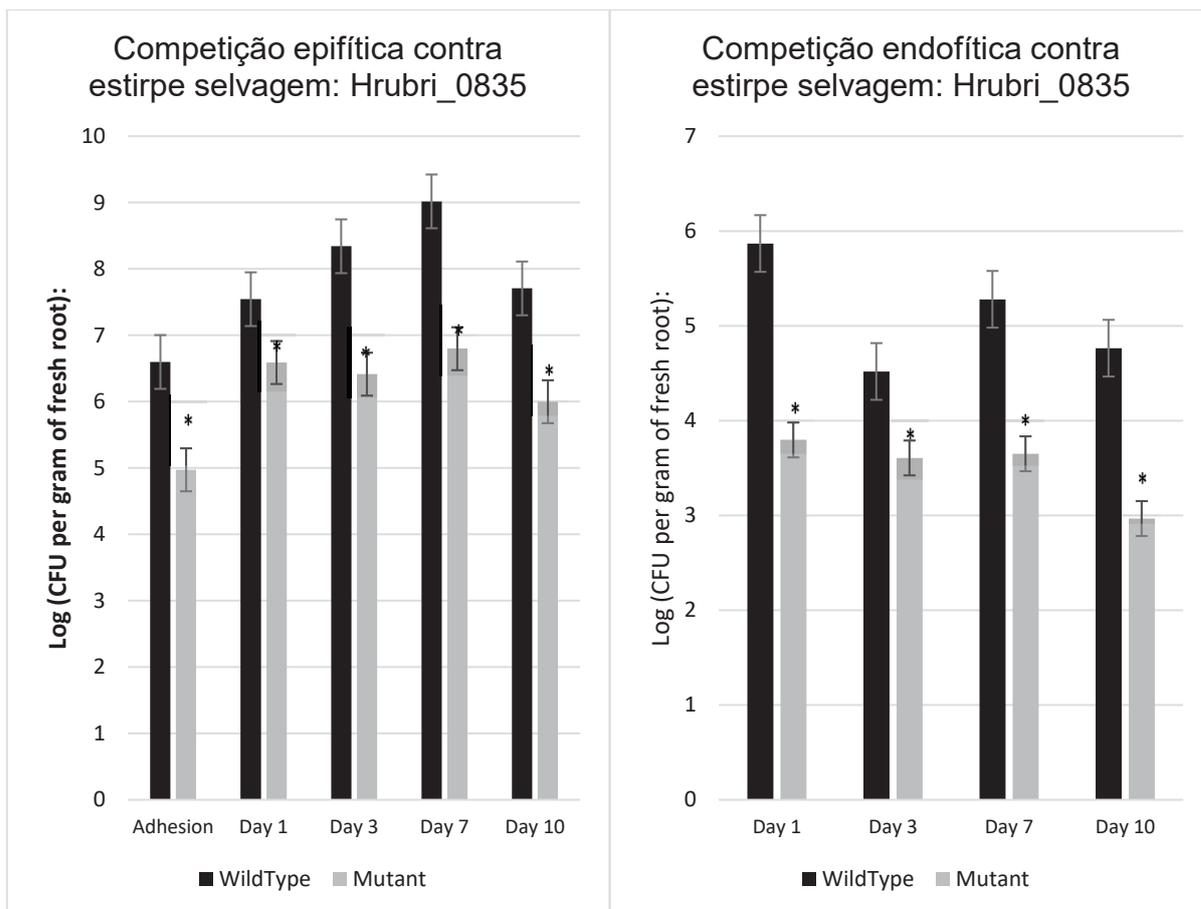


FIGURA 39S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_0835 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

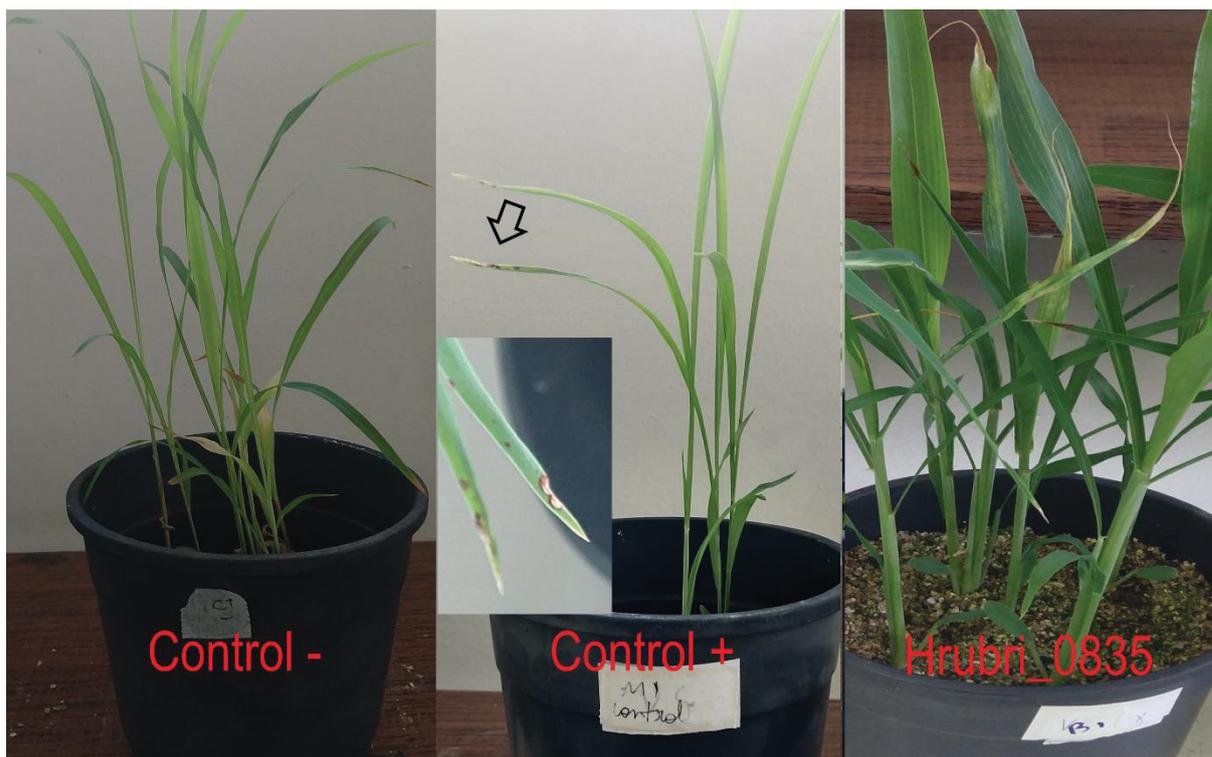


FIGURA 40S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_0835. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_0839

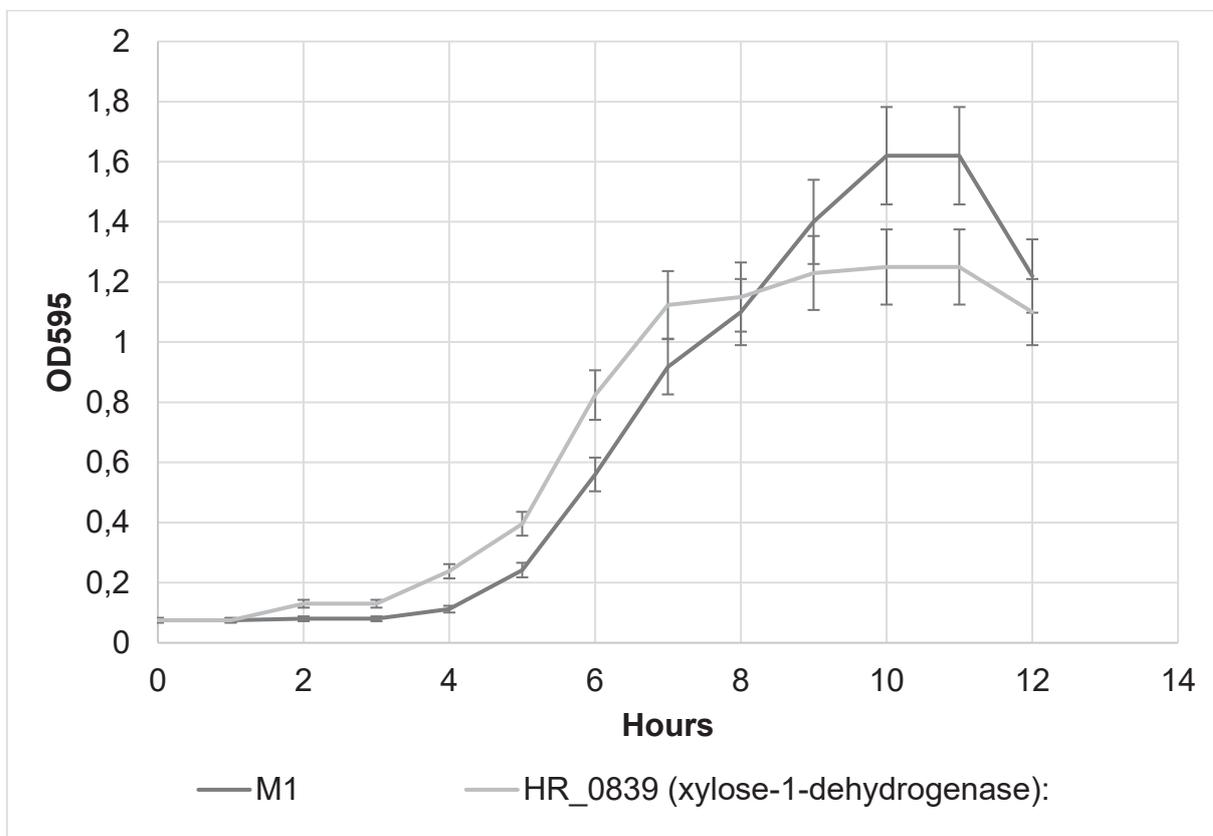


FIGURA 41S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_0839. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

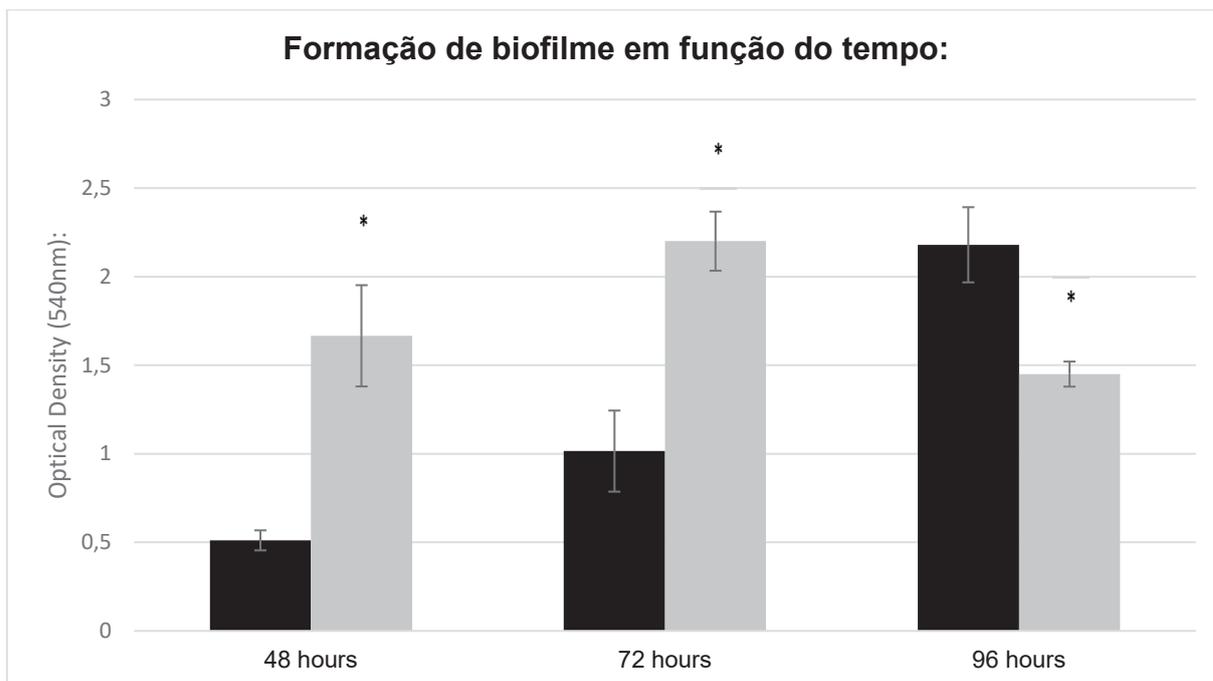


FIGURA 42S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_0839. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05\%$.

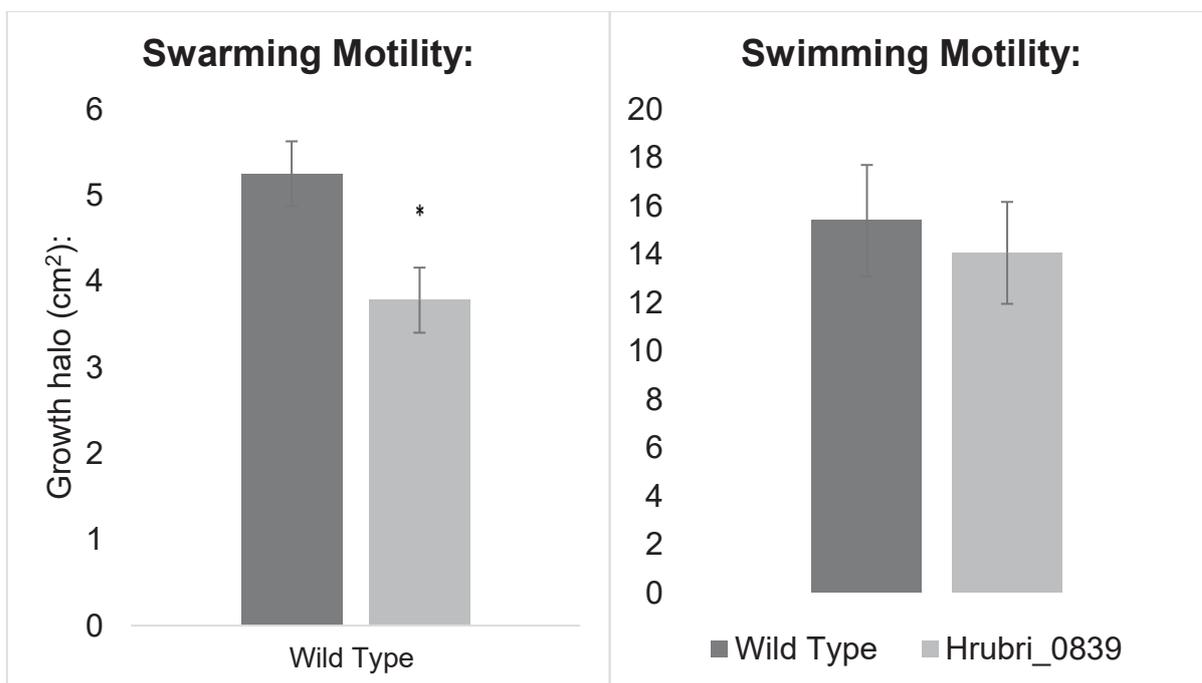


Figura 43S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_0839. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

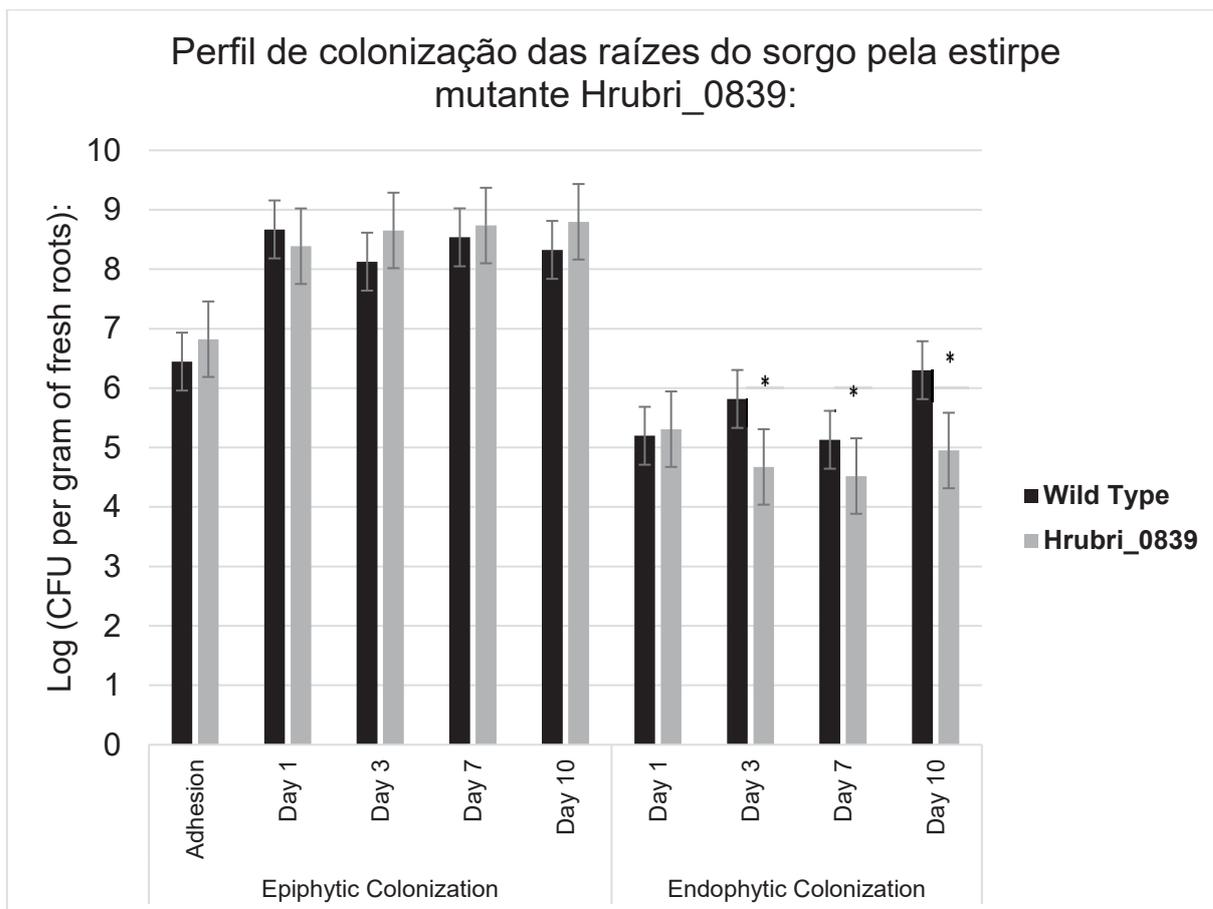


FIGURA 44S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_0839. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

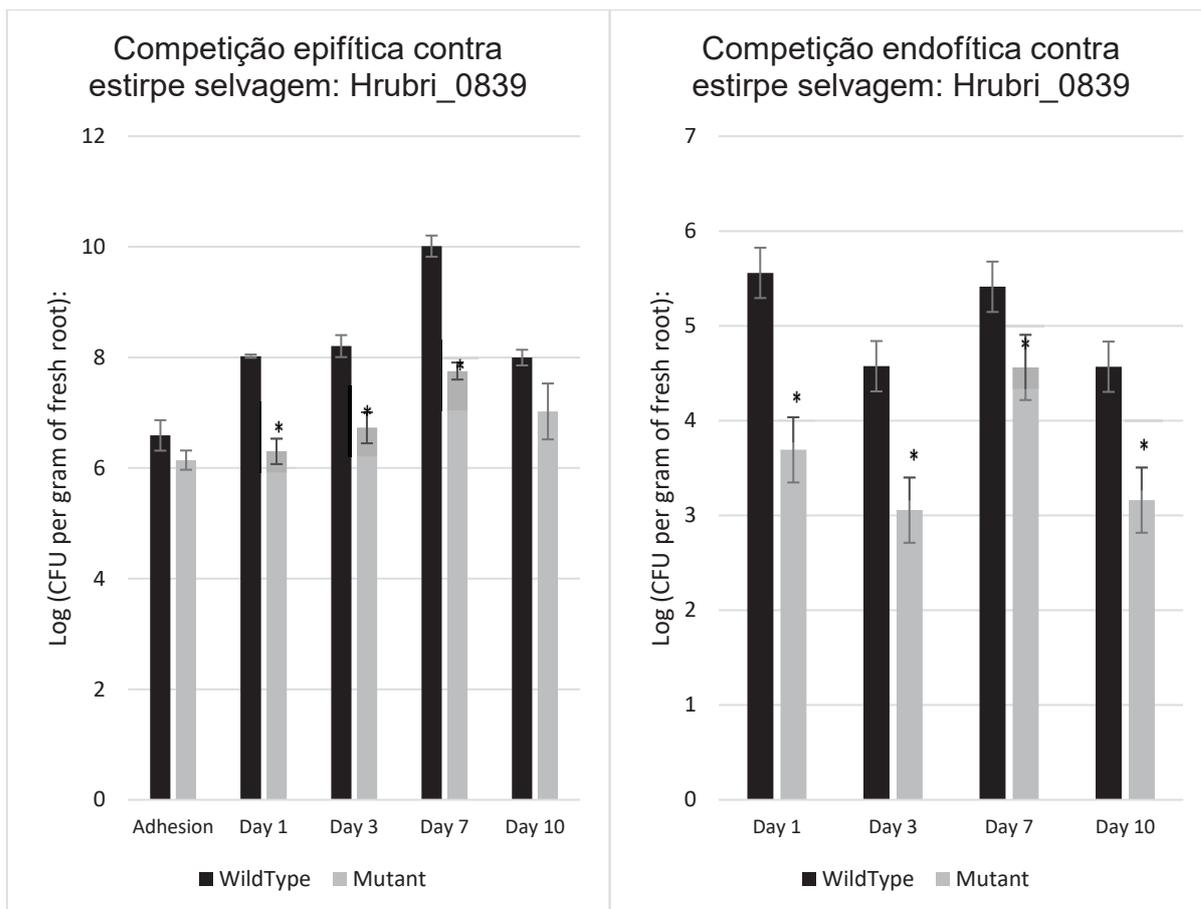


FIGURA 45S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_0839 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

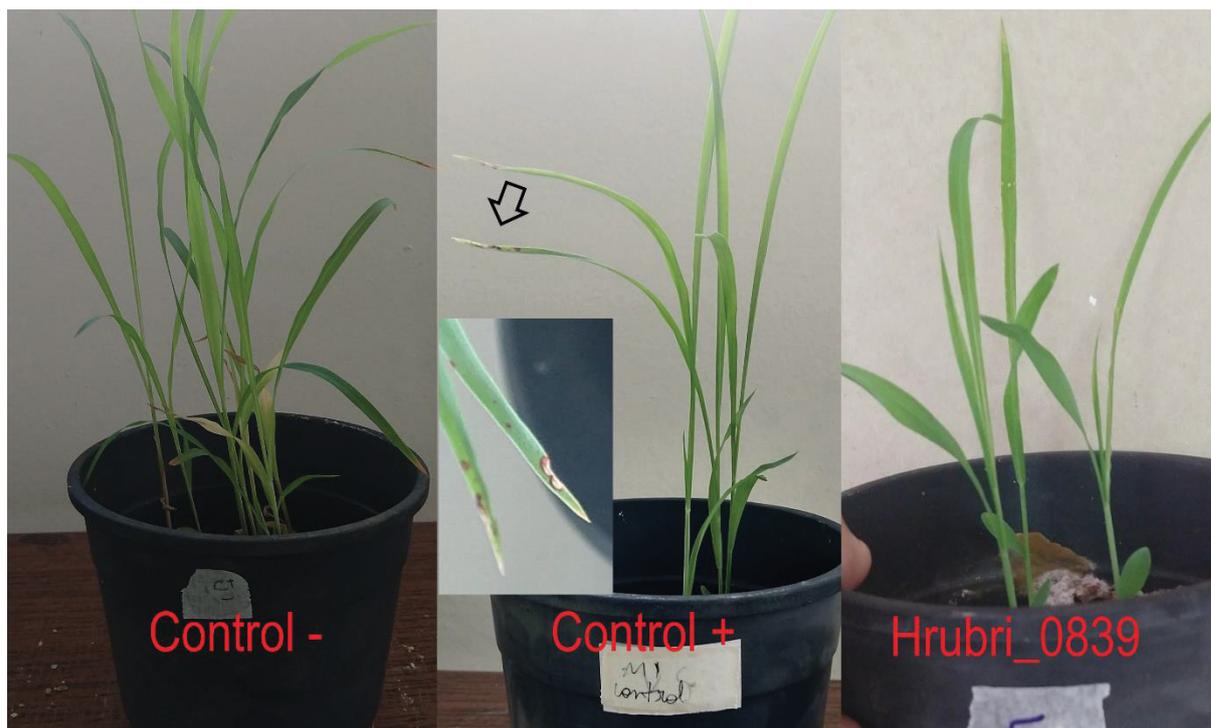


FIGURA 46S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_0839. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_0935

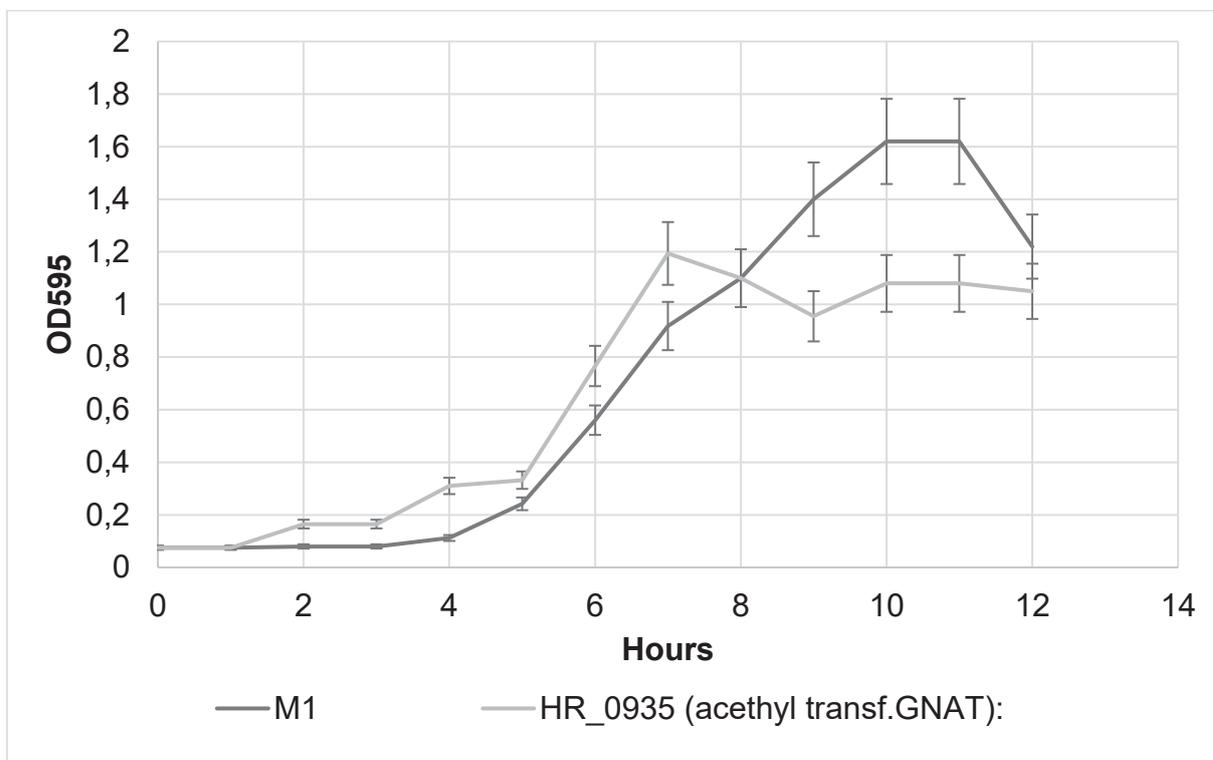


FIGURA 47S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_0935. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

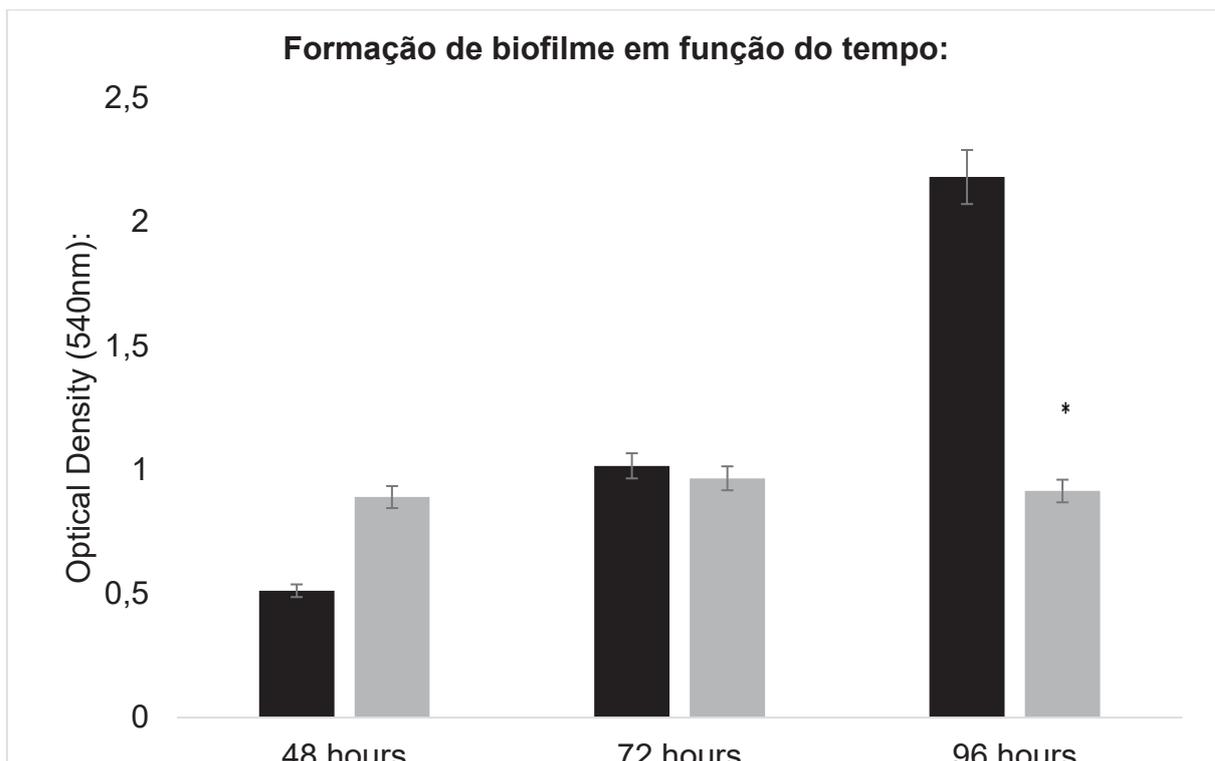


FIGURA 48S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_0935. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

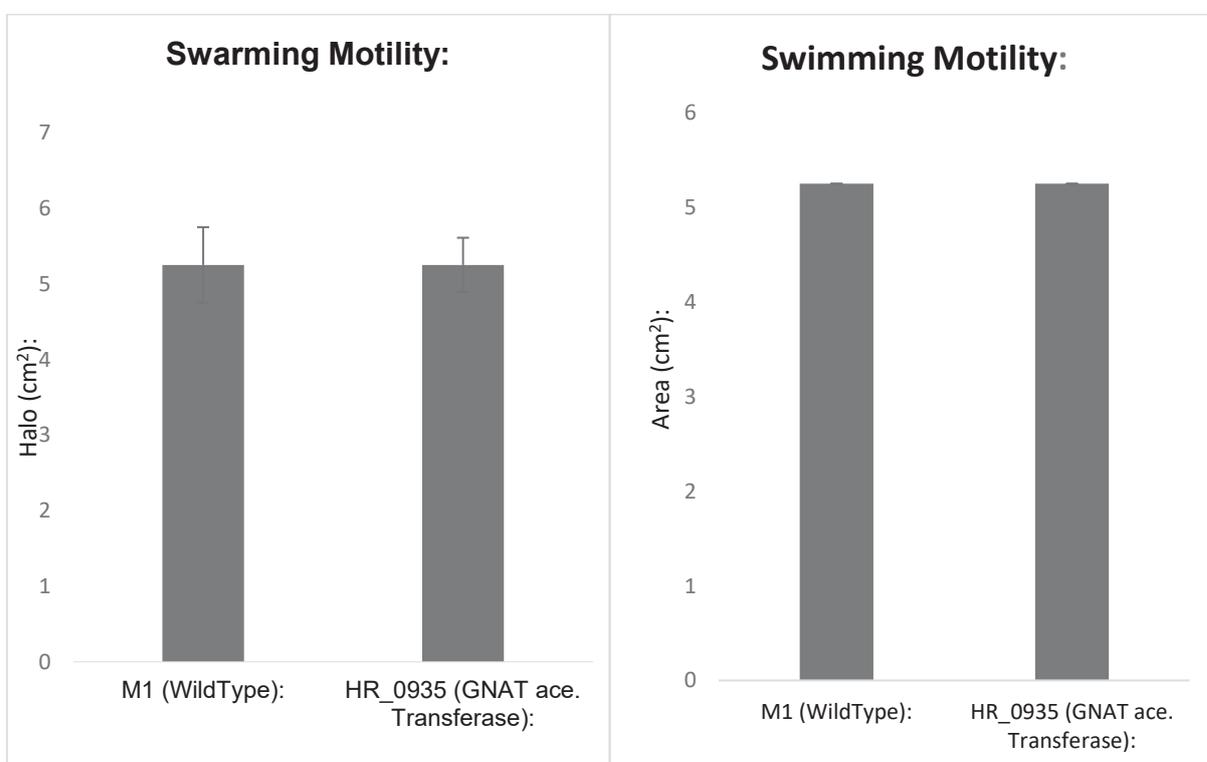


FIGURA 49S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_0935. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe

selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

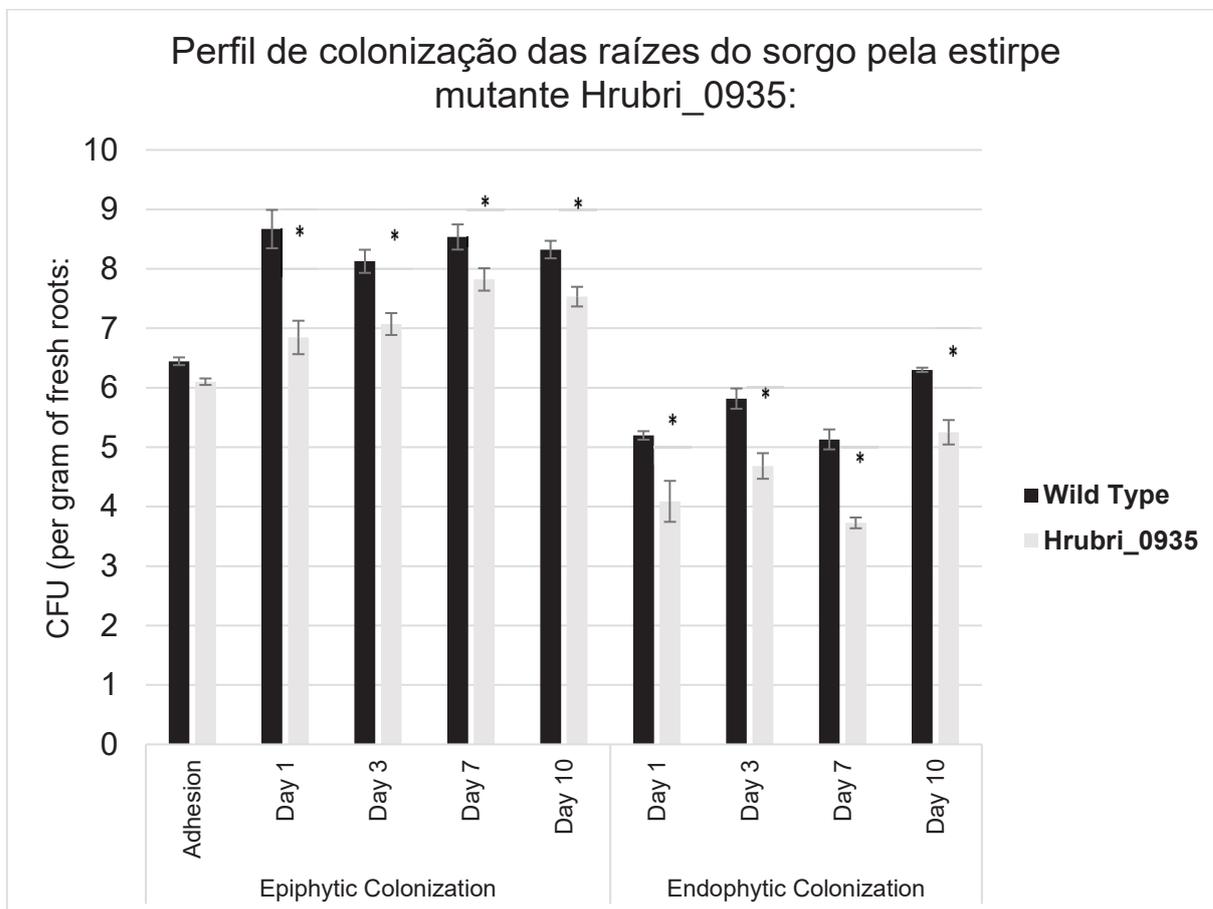


FIGURA 50S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_0935. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

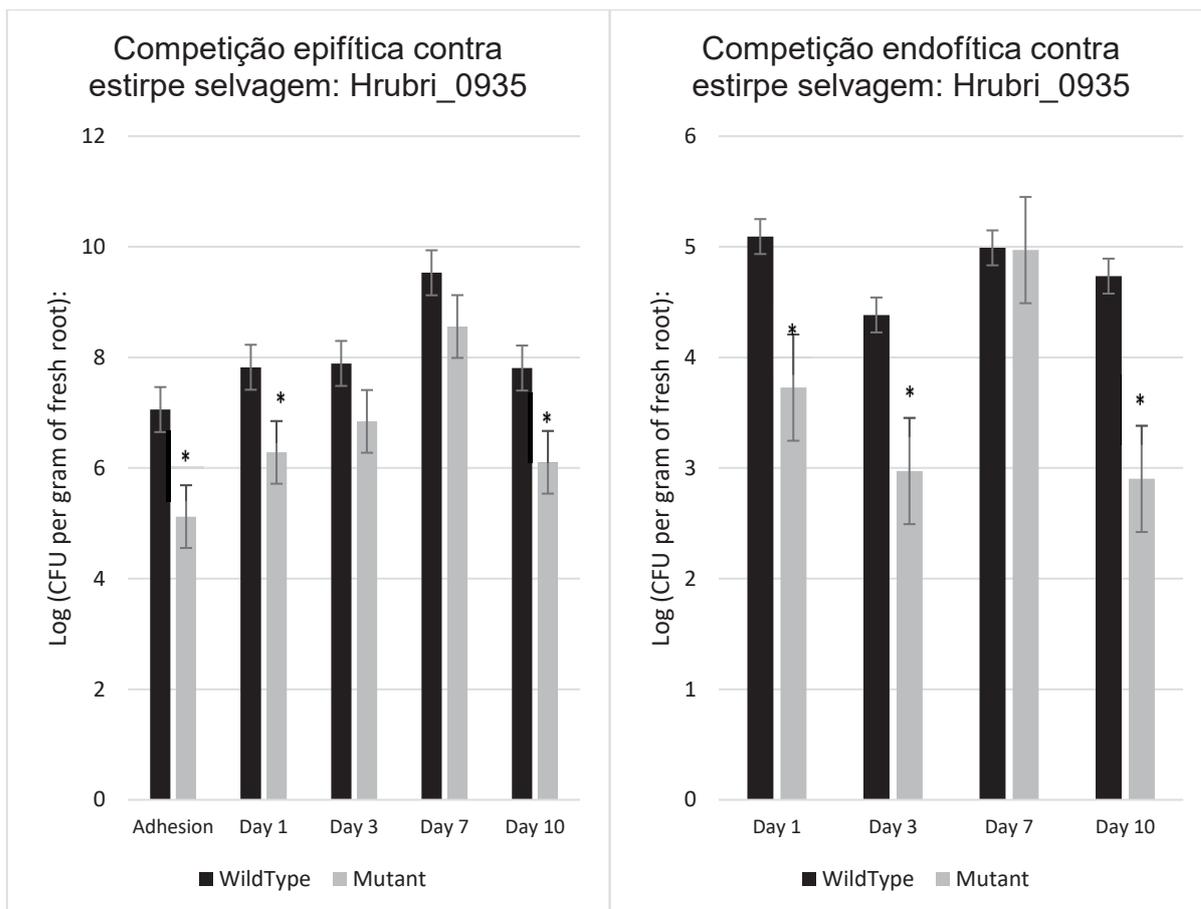


FIGURA 51S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_0935 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

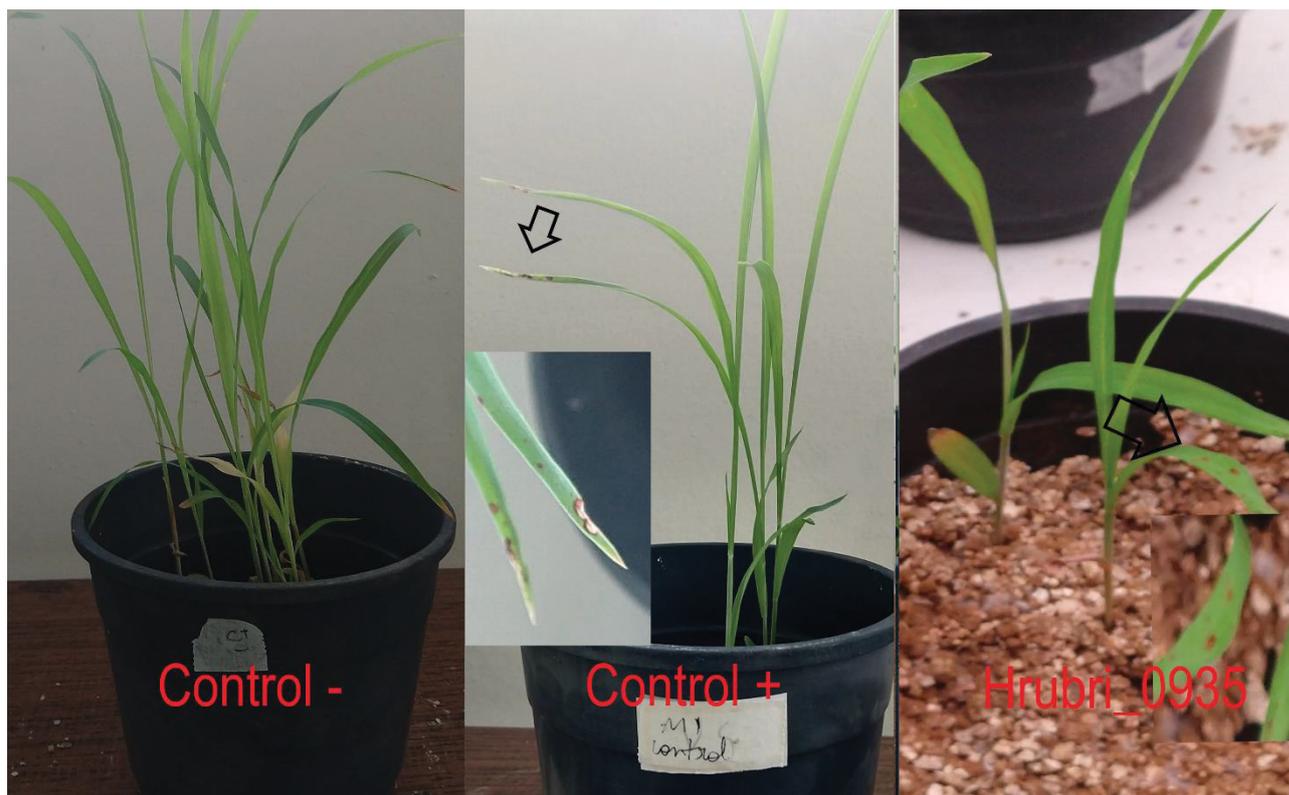


FIGURA 52S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_0935. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_1197

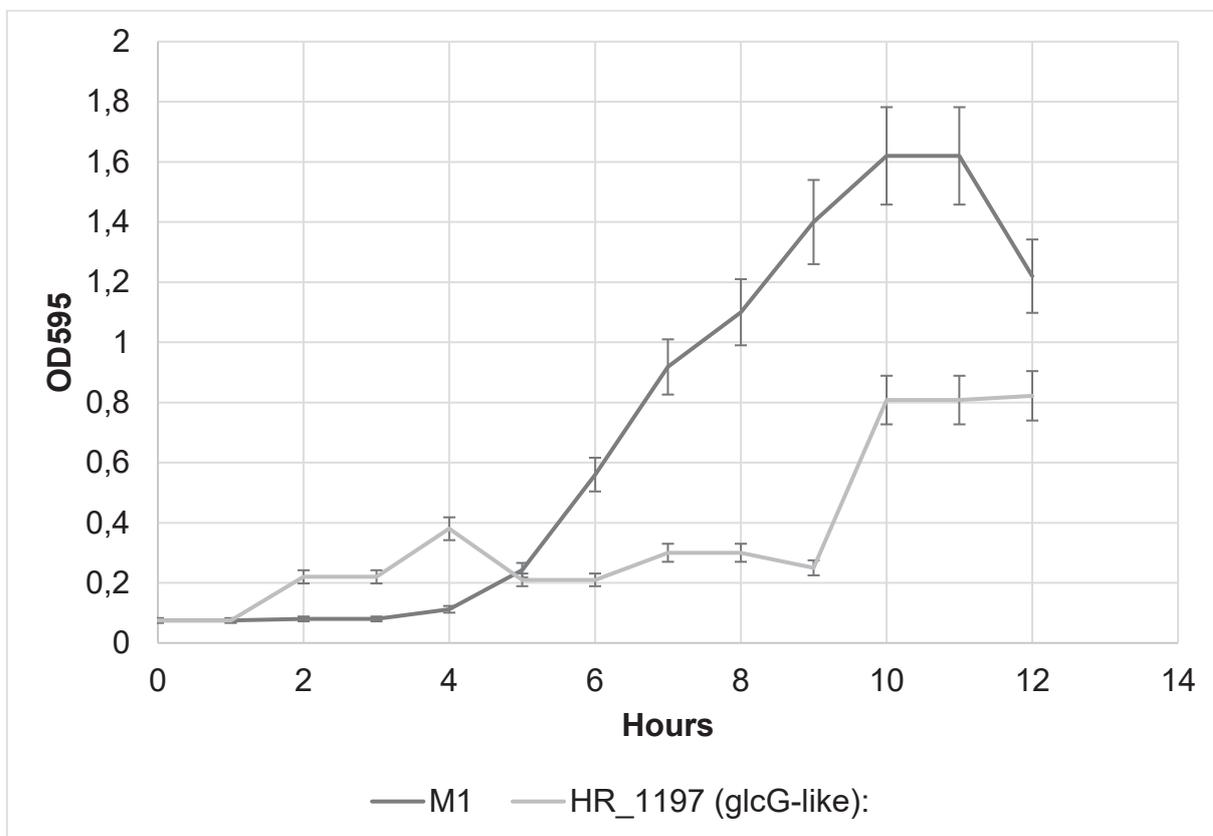


FIGURA 53S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_1197. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

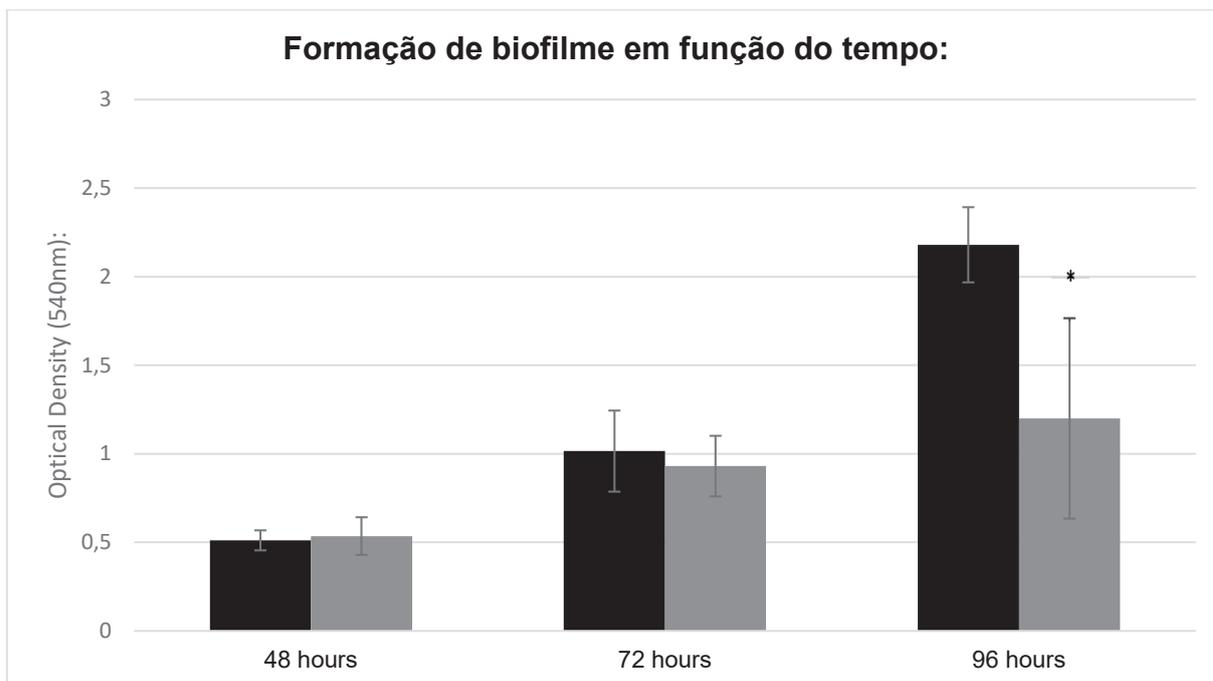


FIGURA 54S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_1197. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

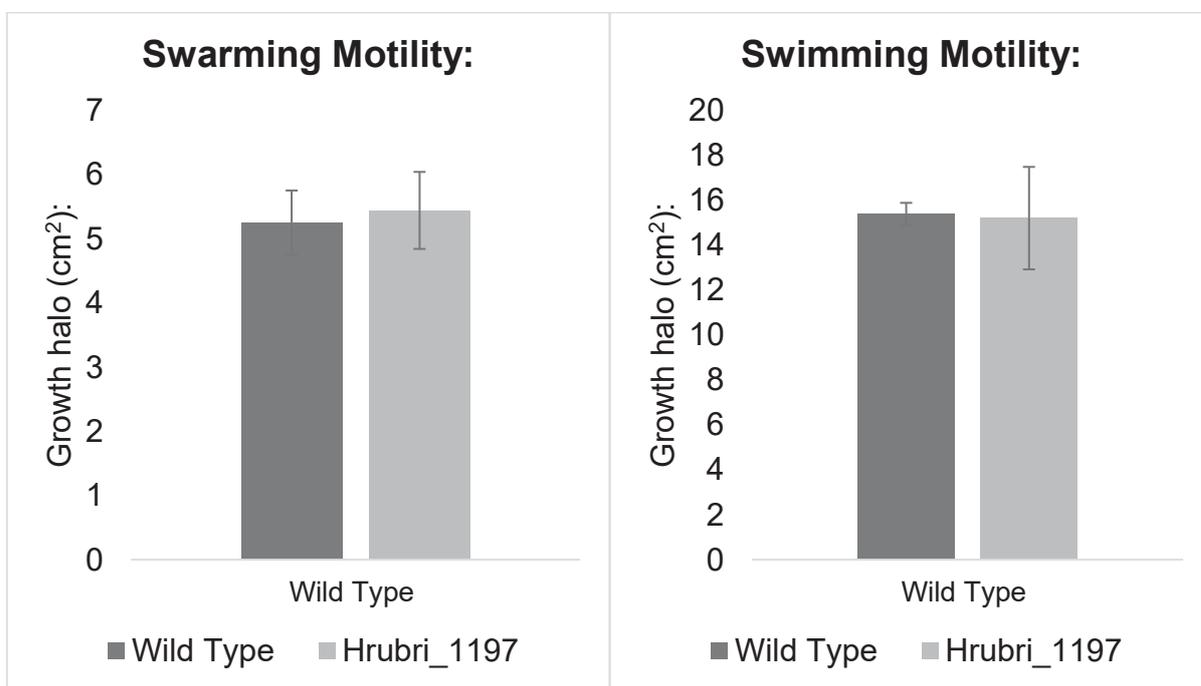


FIGURA 55S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_1197. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (swimming) e 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

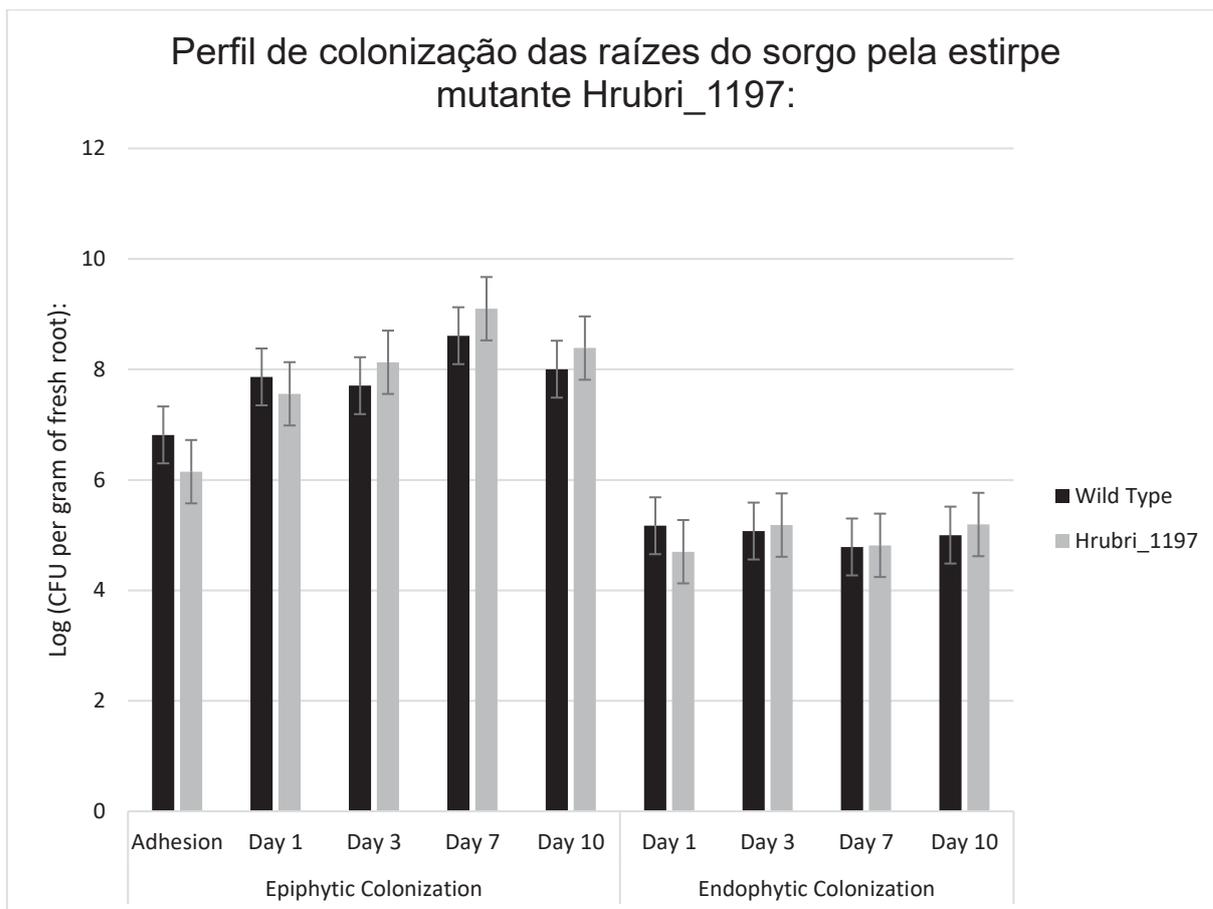


FIGURA 56S: Perfis de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_1197. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

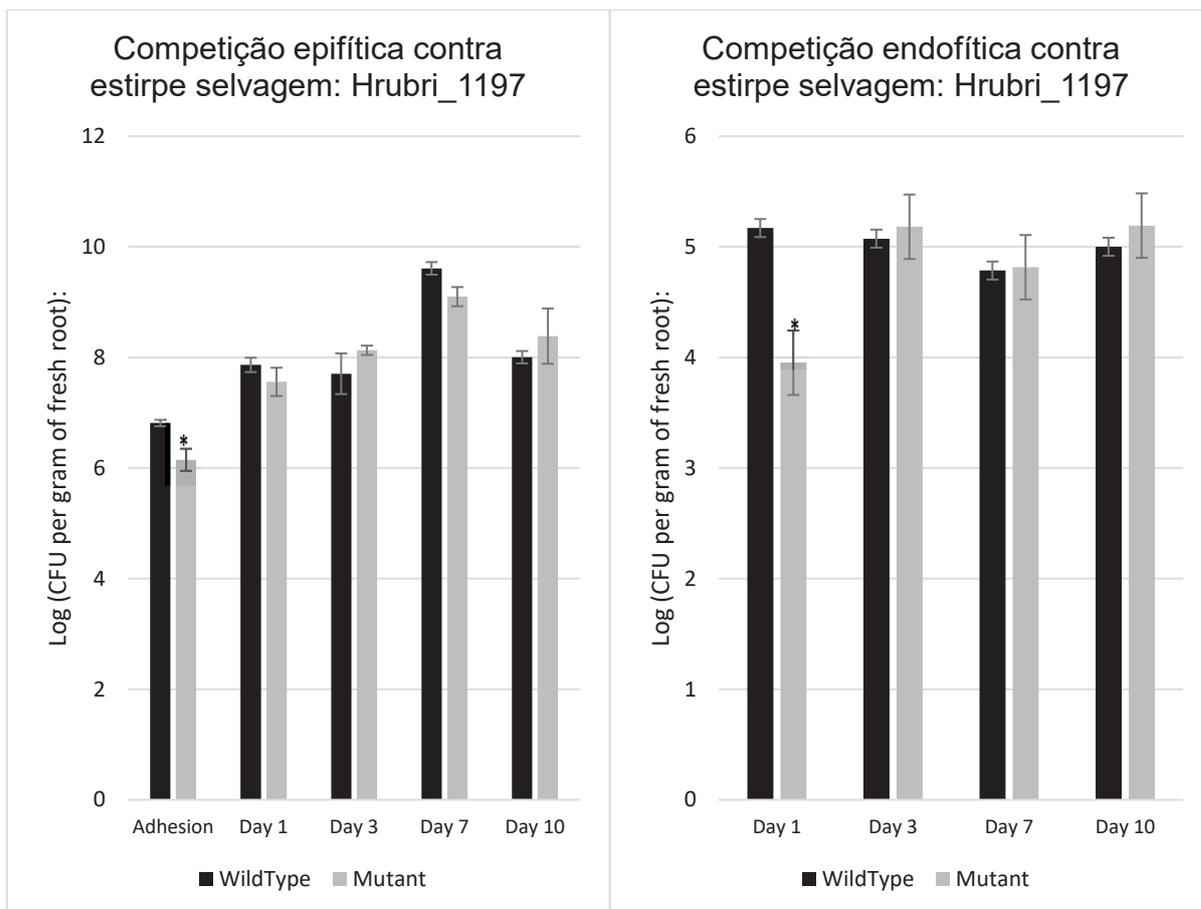


FIGURA 57S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_1197 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.



FIGURA 58S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_1197. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2391

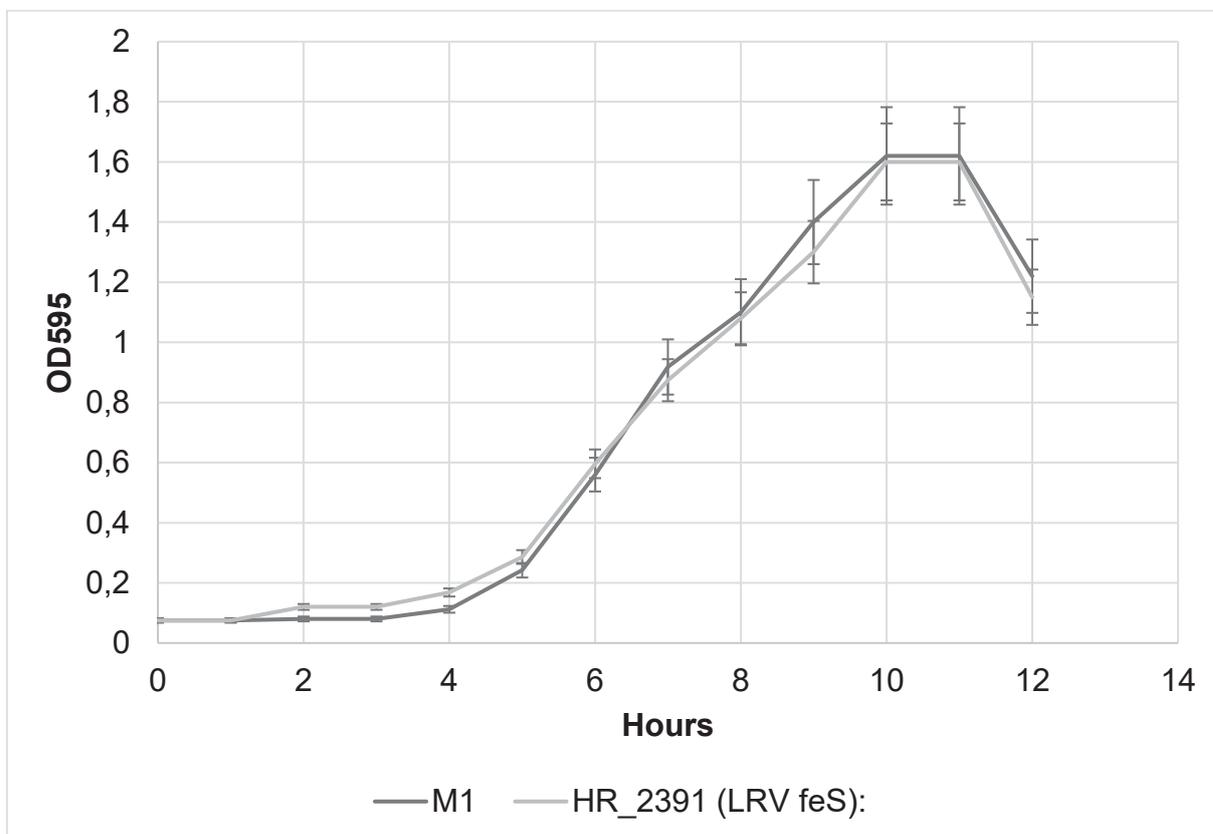


FIGURA 59S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2391. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

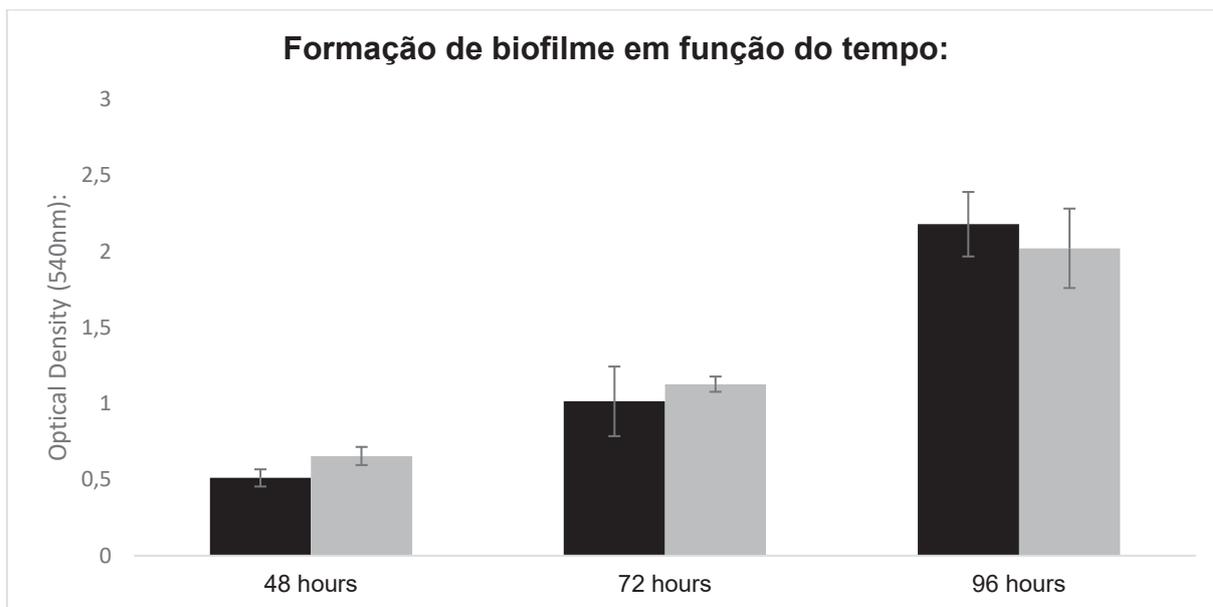


FIGURA 60S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_2391. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

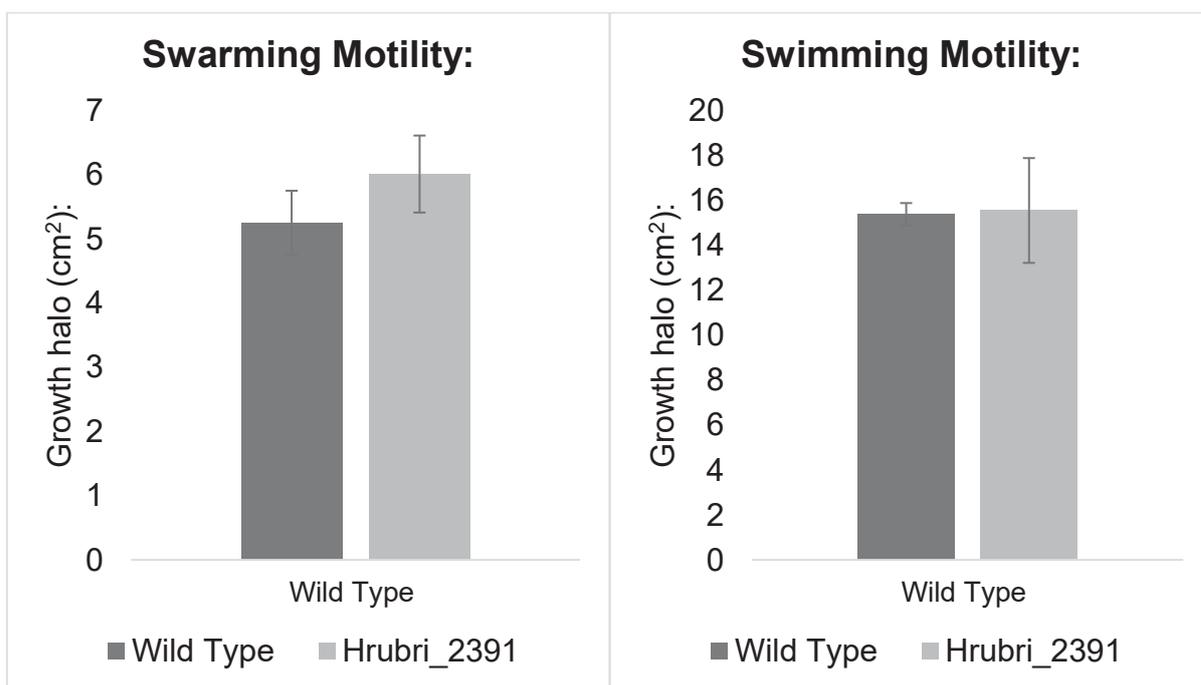


FIGURA 61S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2391. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (swimming) e 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

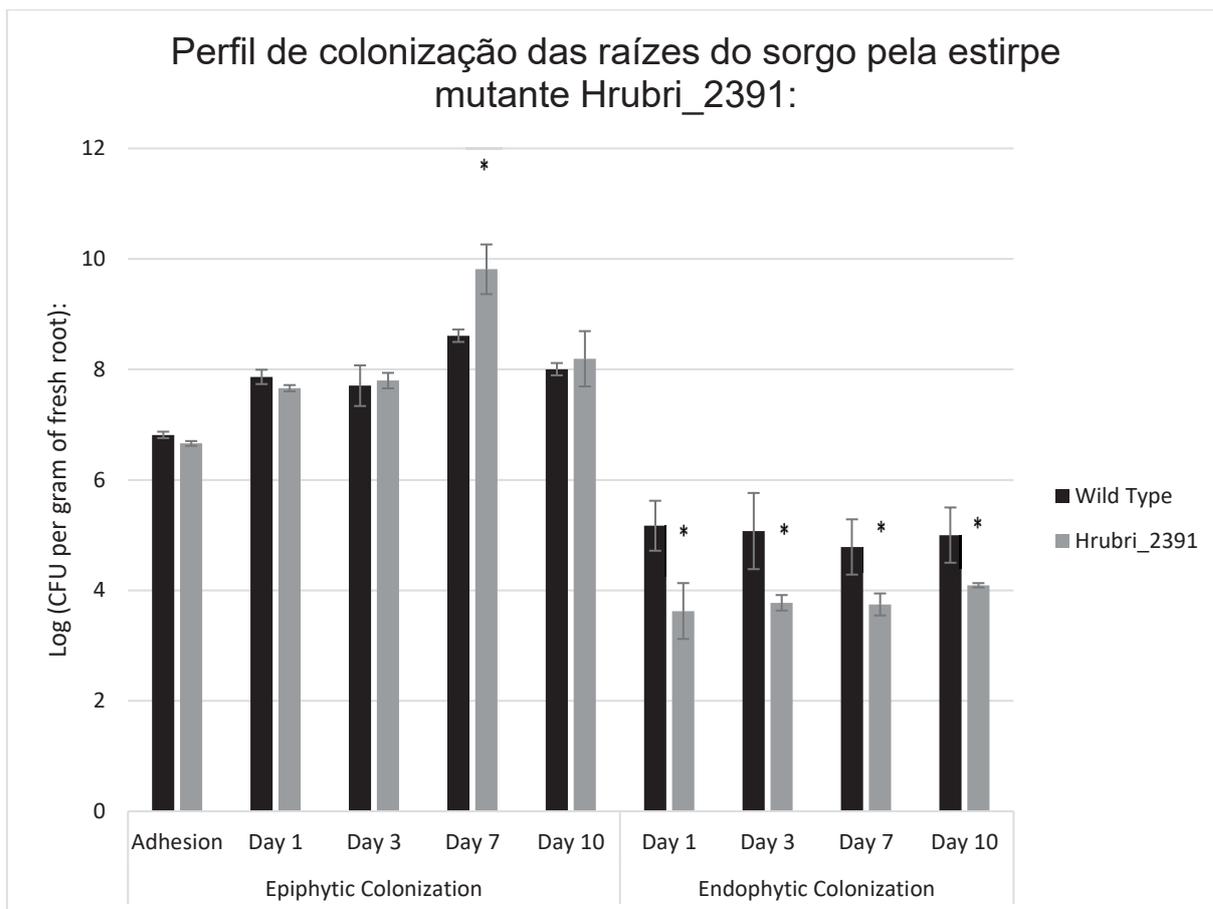


FIGURA 62S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2391. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

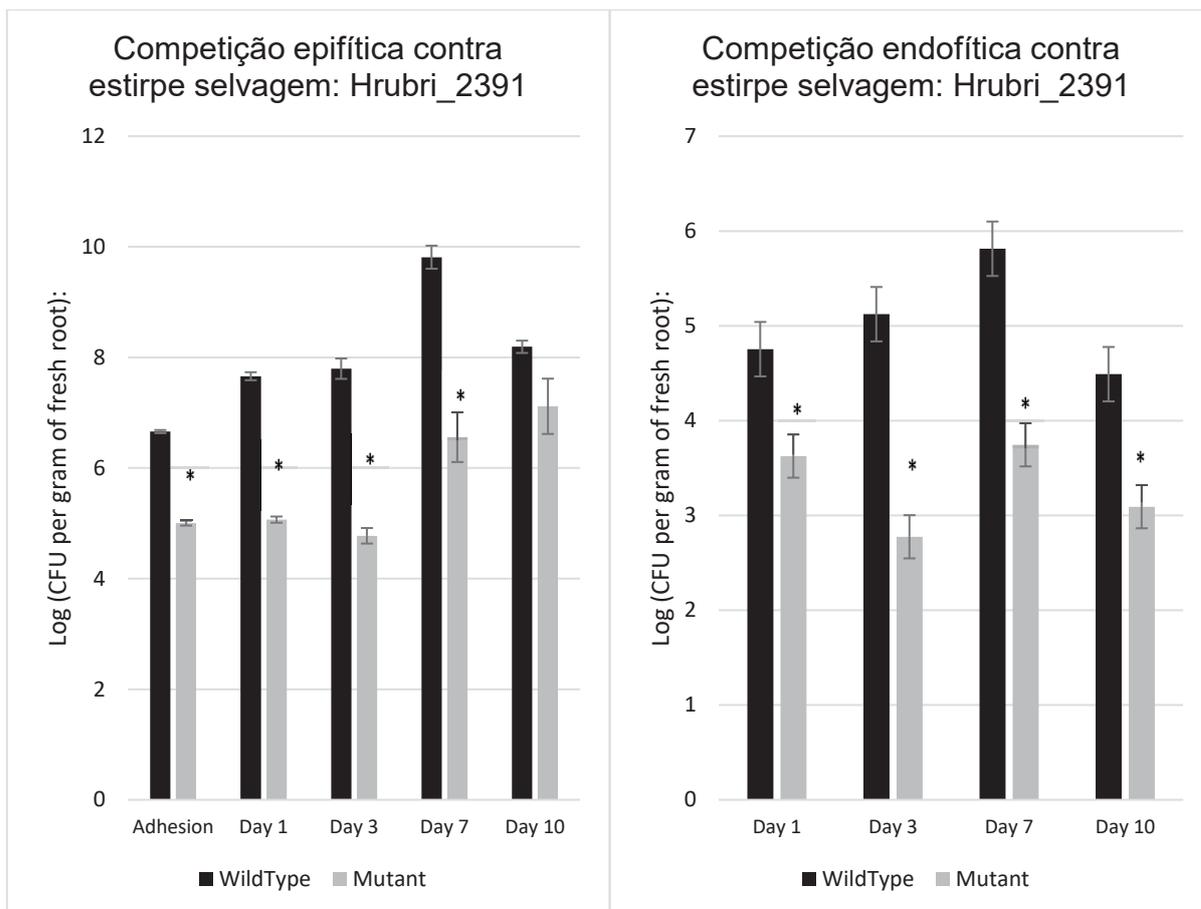


FIGURA 63S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2391 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

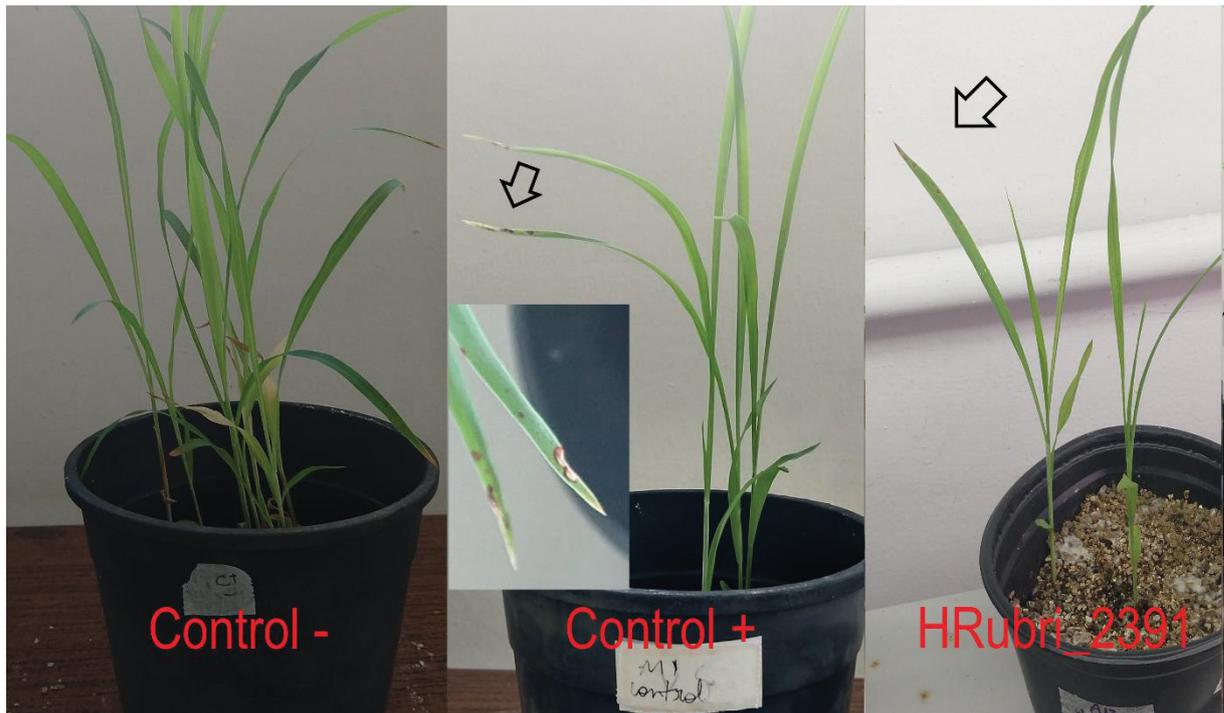


FIGURA 64S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2391. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 105 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2483

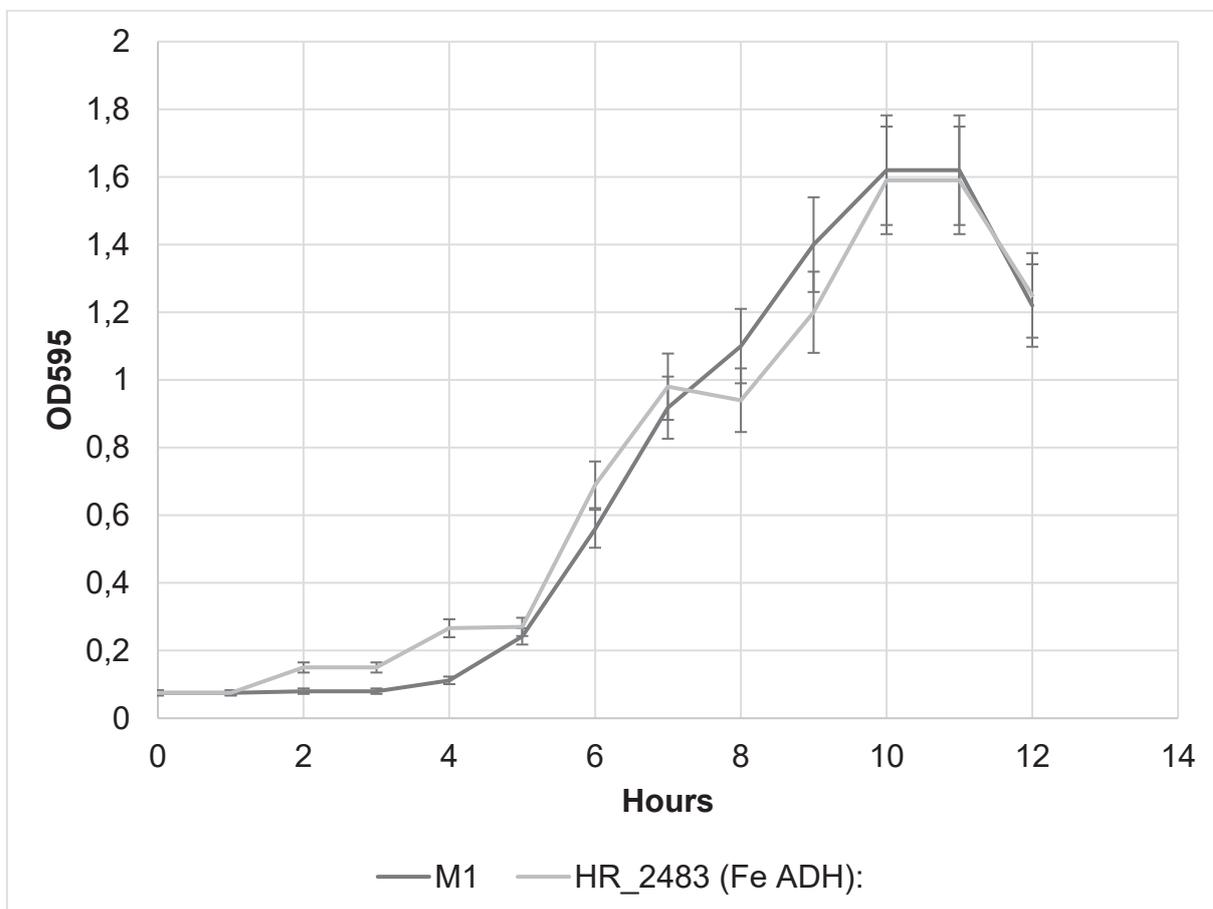


FIGURA 65S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2483. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D. O.₅₉₅ verificada.

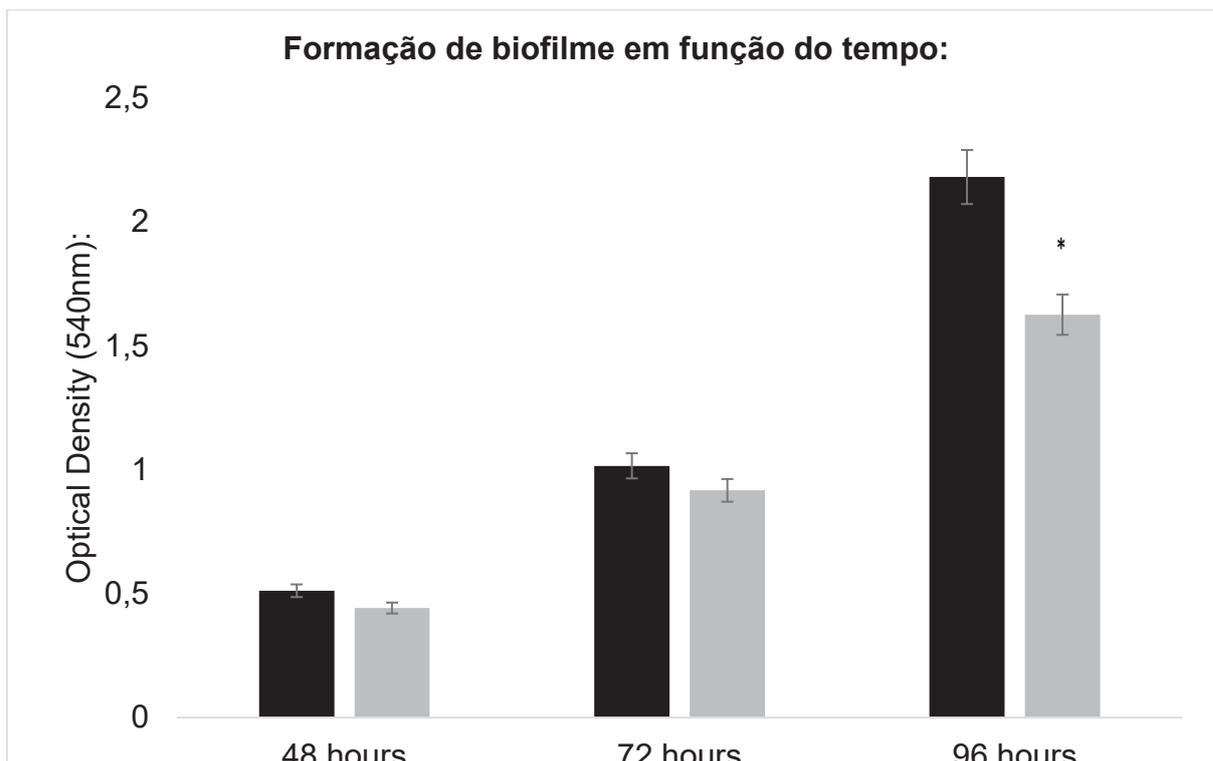


FIGURA 66S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_0935. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

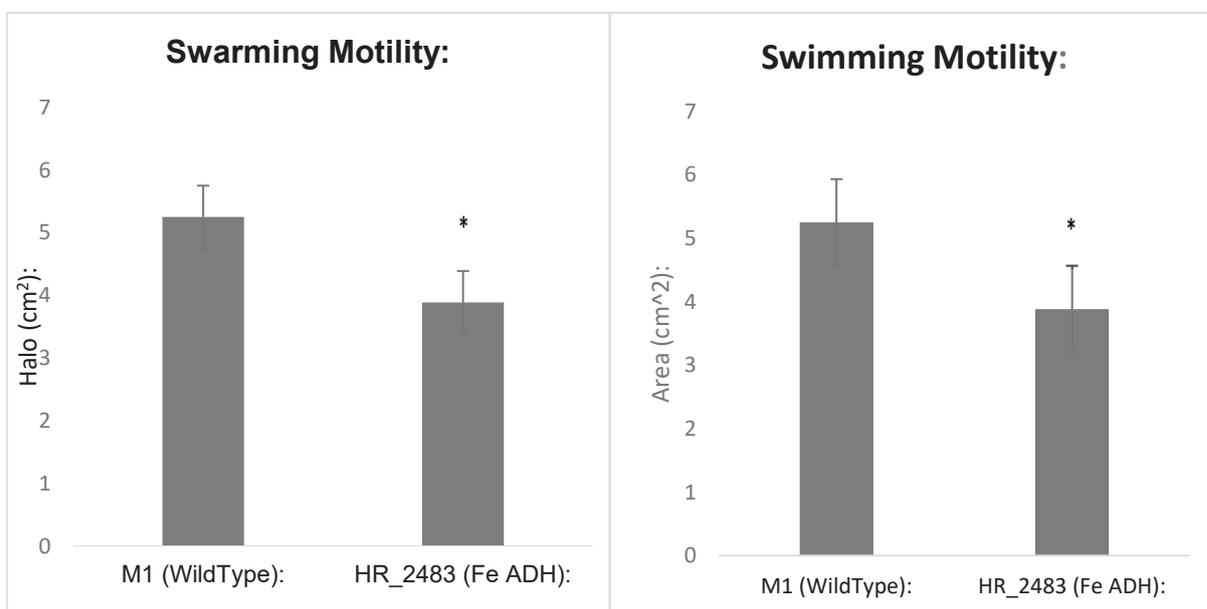


FIGURA 67S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2483. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

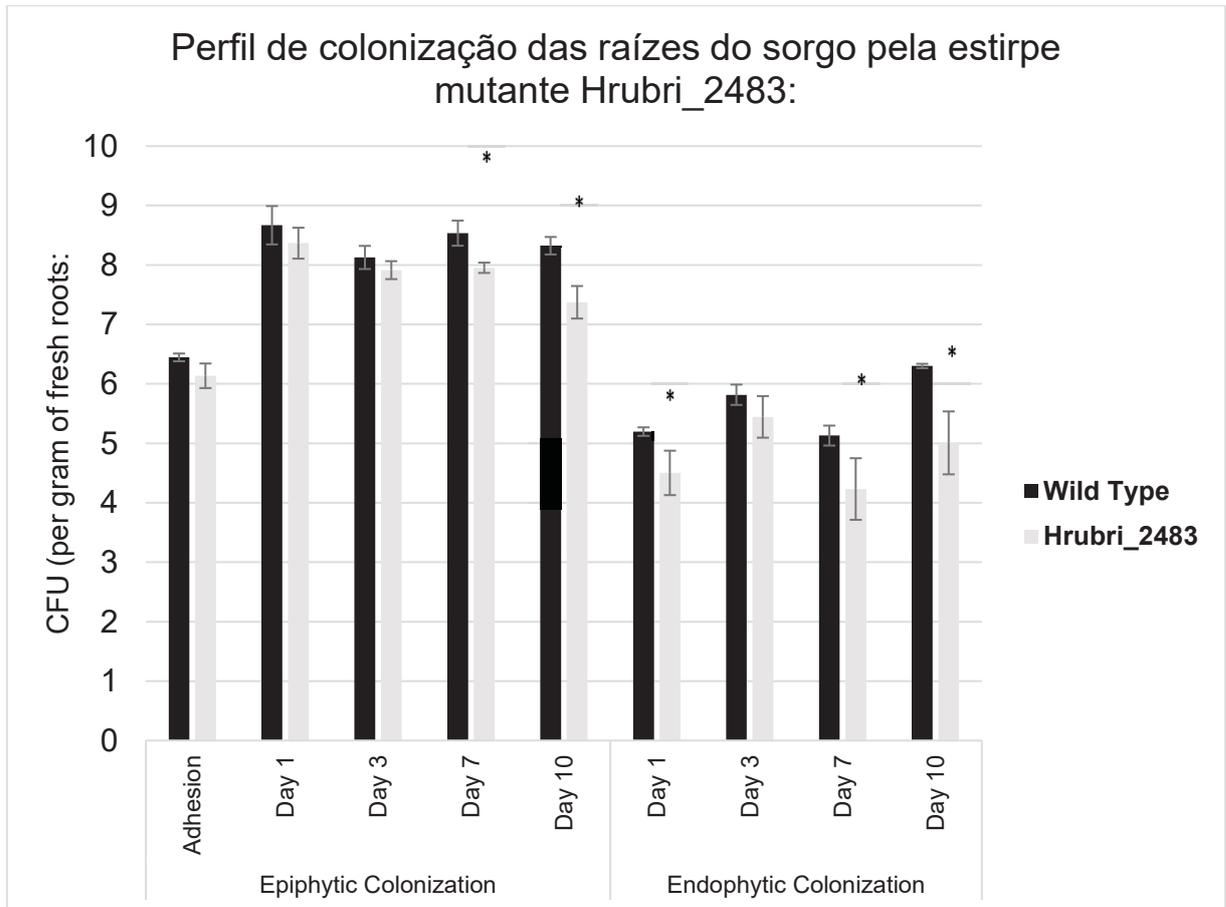


FIGURA 68S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2483. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

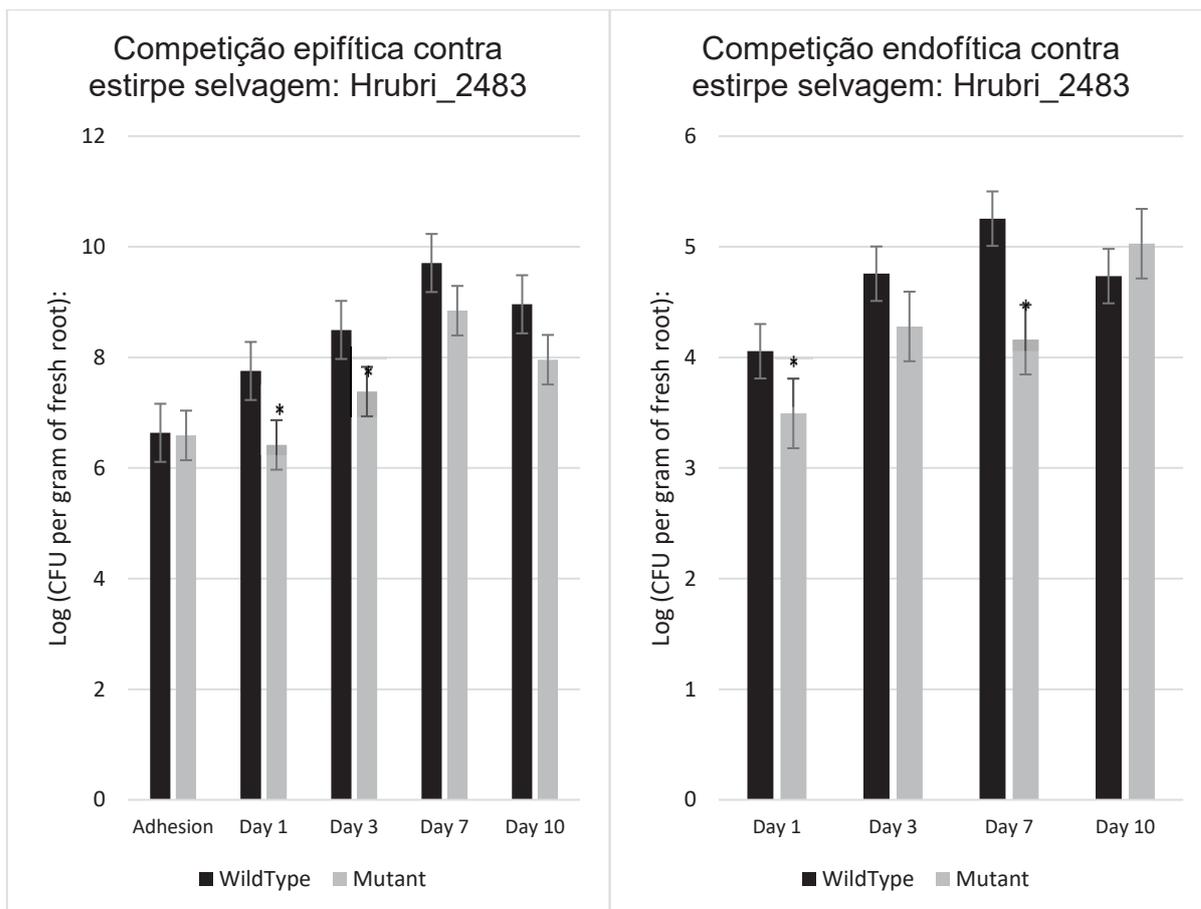


FIGURA 69S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2483 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

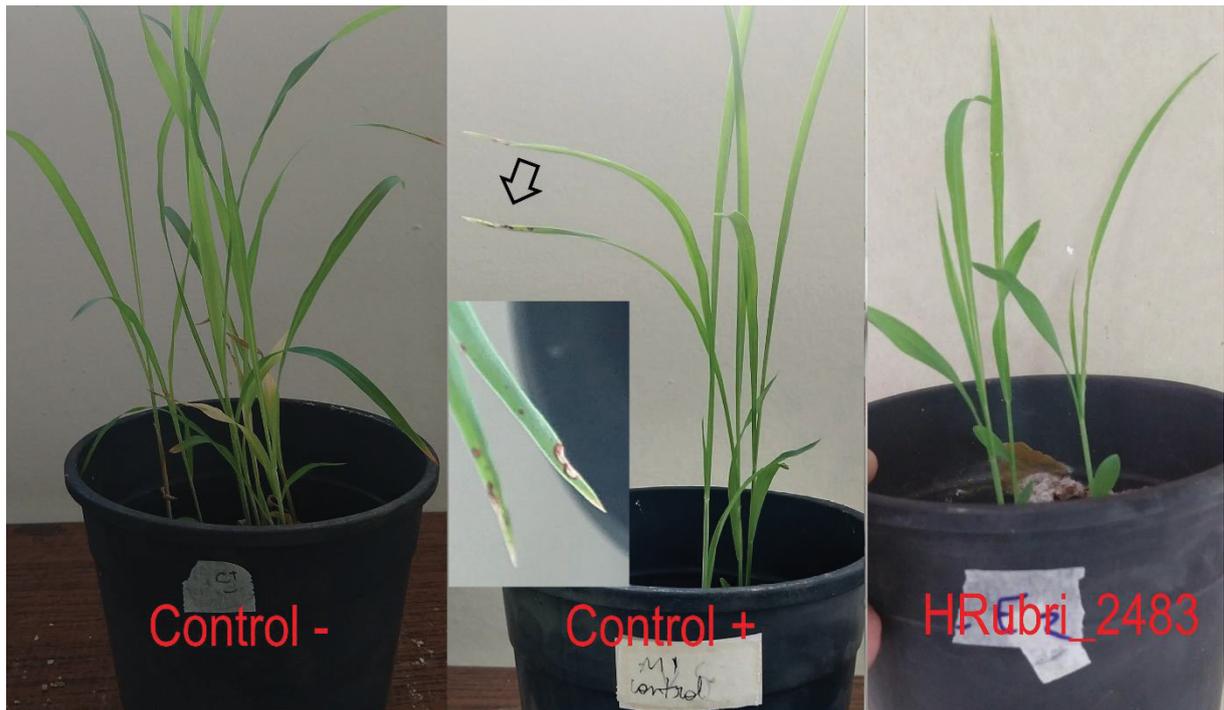


FIGURA 70S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2483. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2585

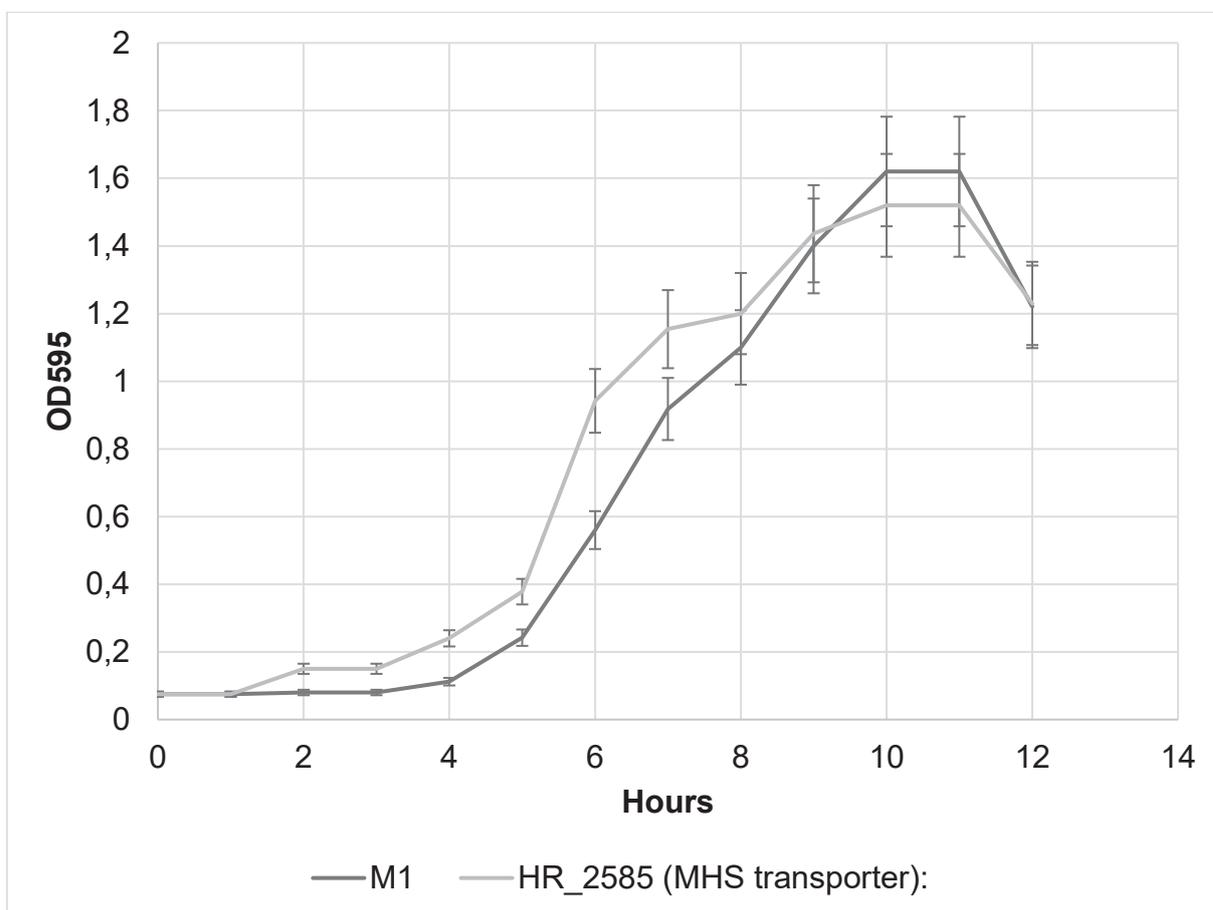


FIGURA 71S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2585. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

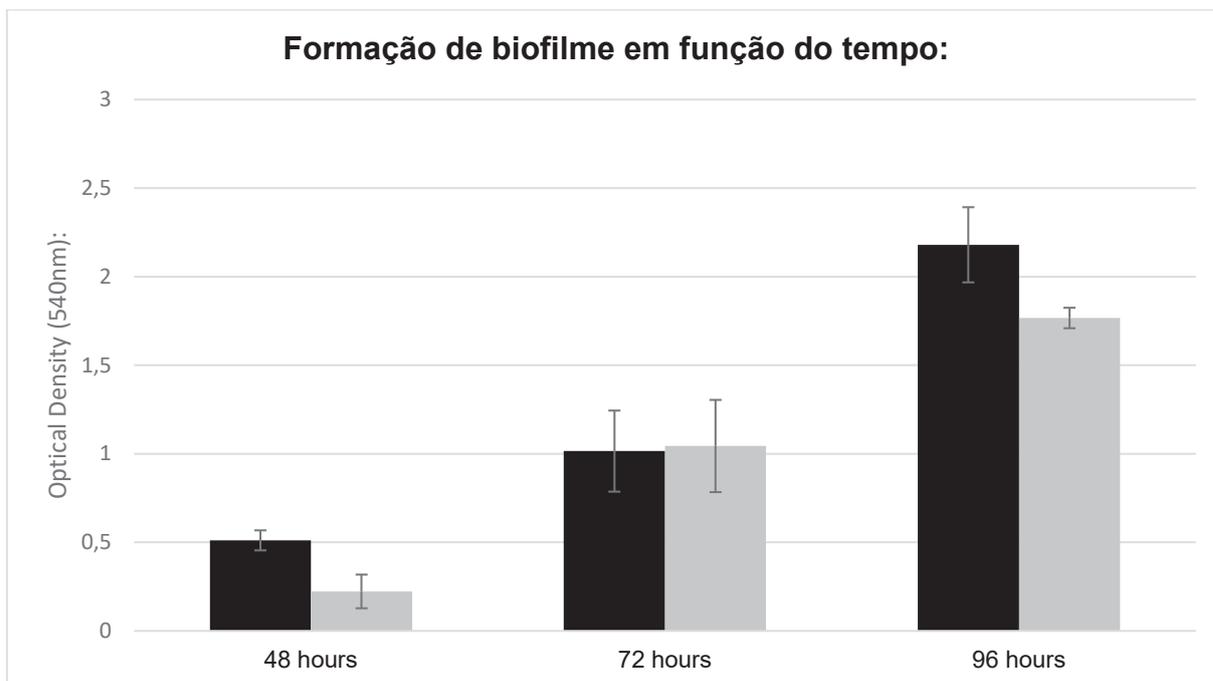


FIGURA 72S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_2585. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

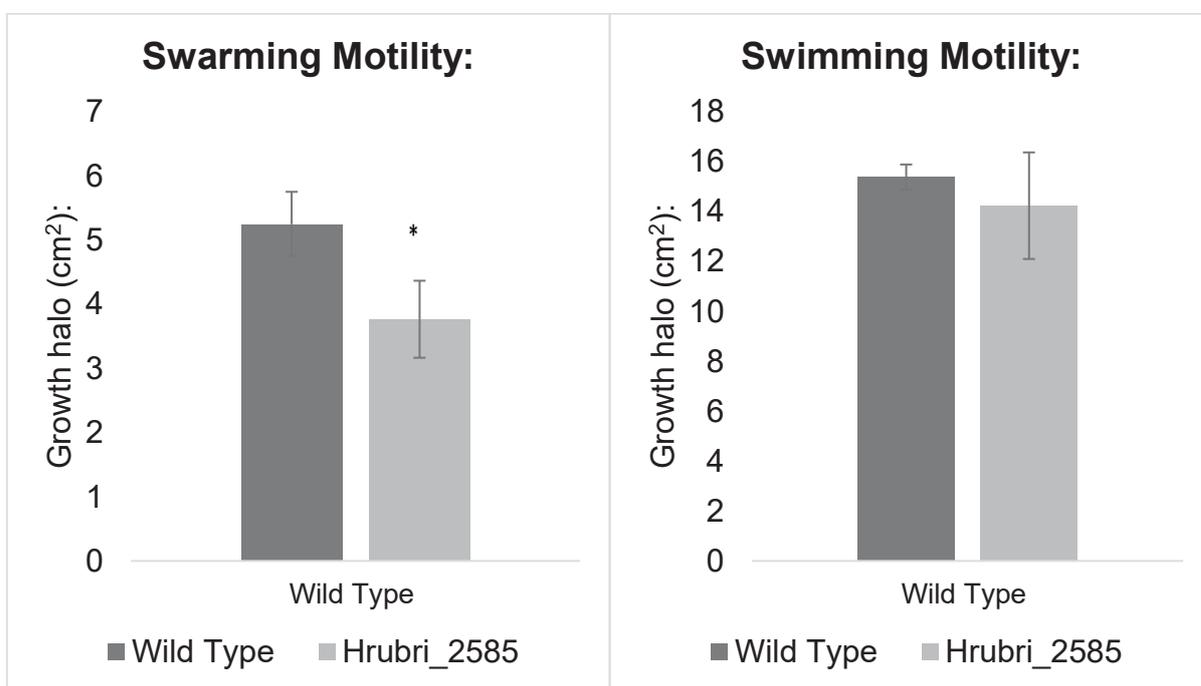


FIGURA 73S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2585. A esquerda temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar e a direita temos a motilidade tipo “swimming” feita em 0,15% de ágar, ambas em meio NfB malato. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (swimming) e 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

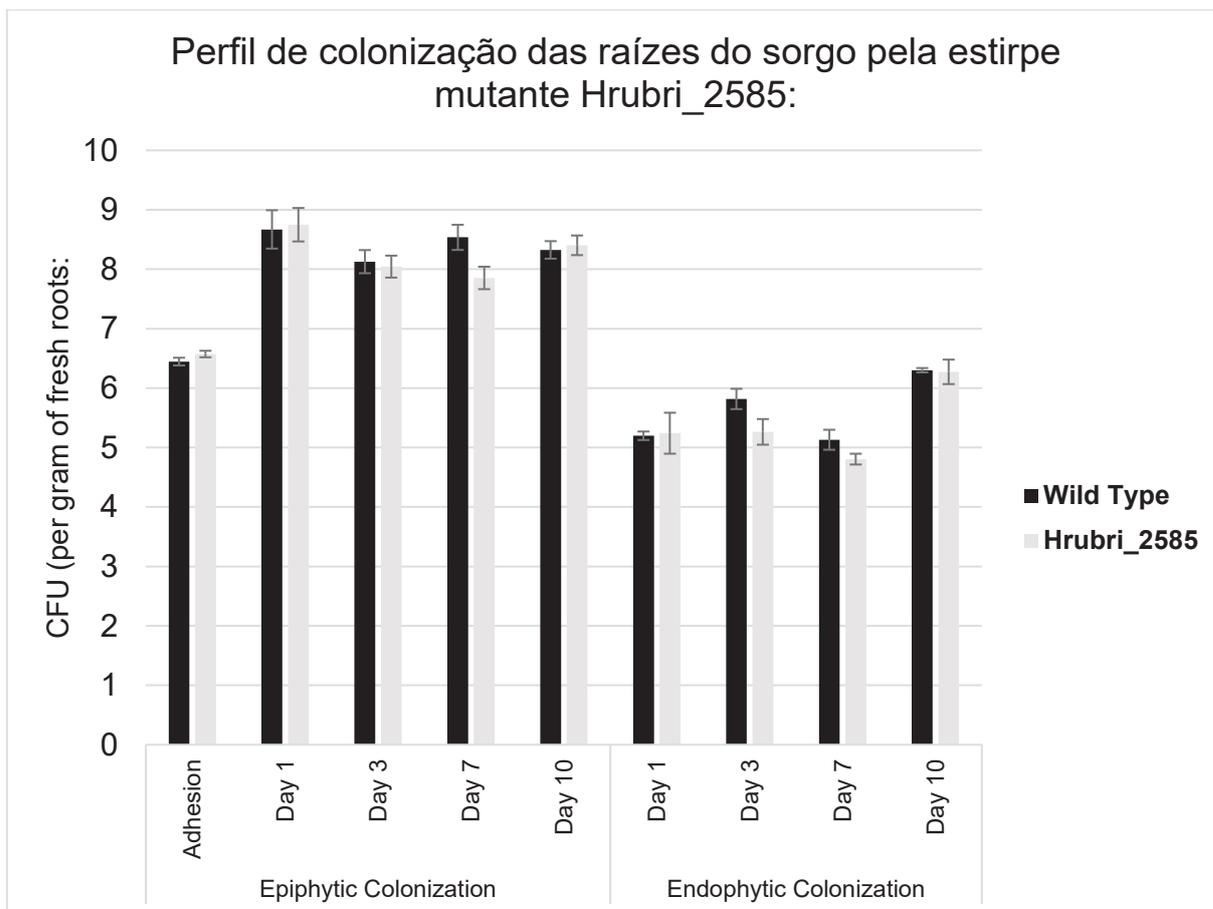


FIGURA 74S: Perfis de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2585. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

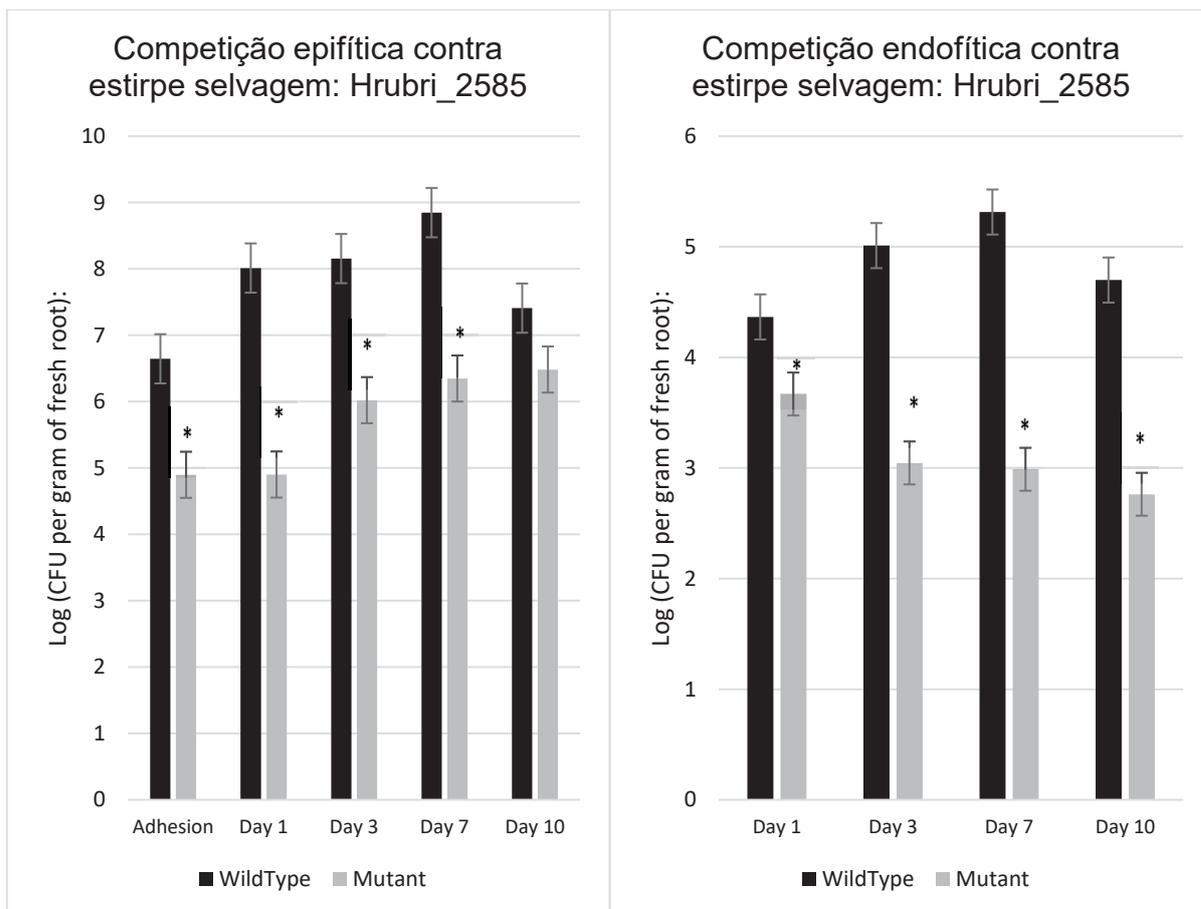


FIGURA 75S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2585 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

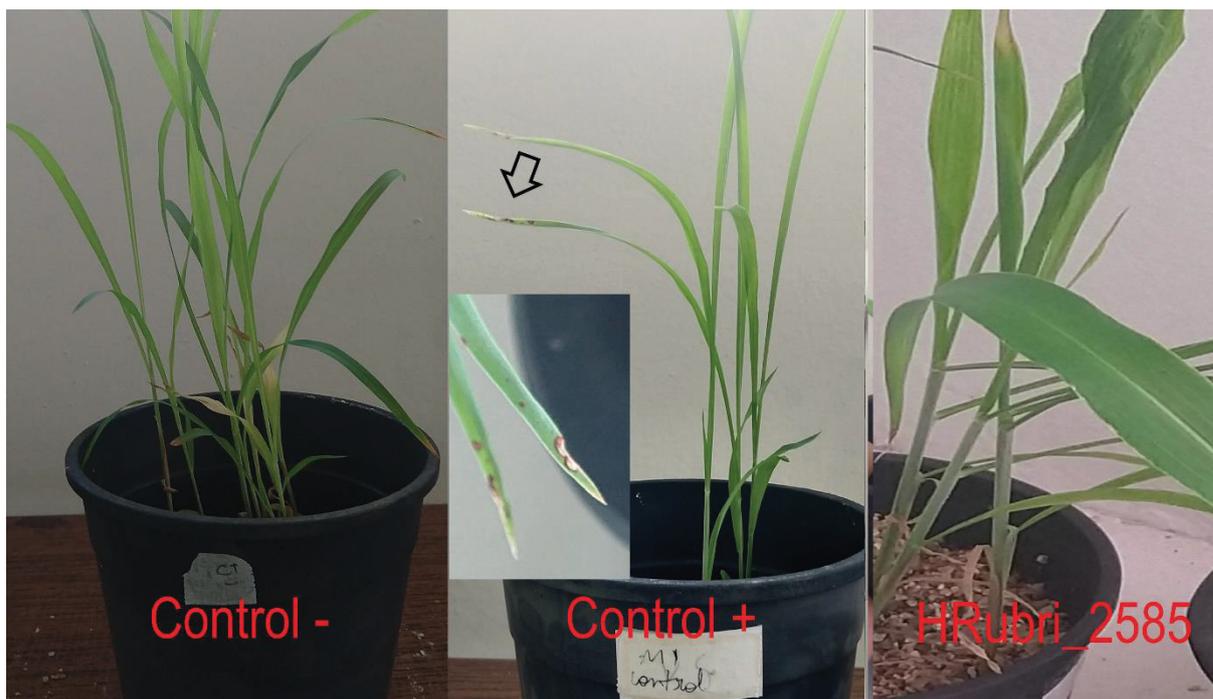


FIGURA 76S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2585. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2937

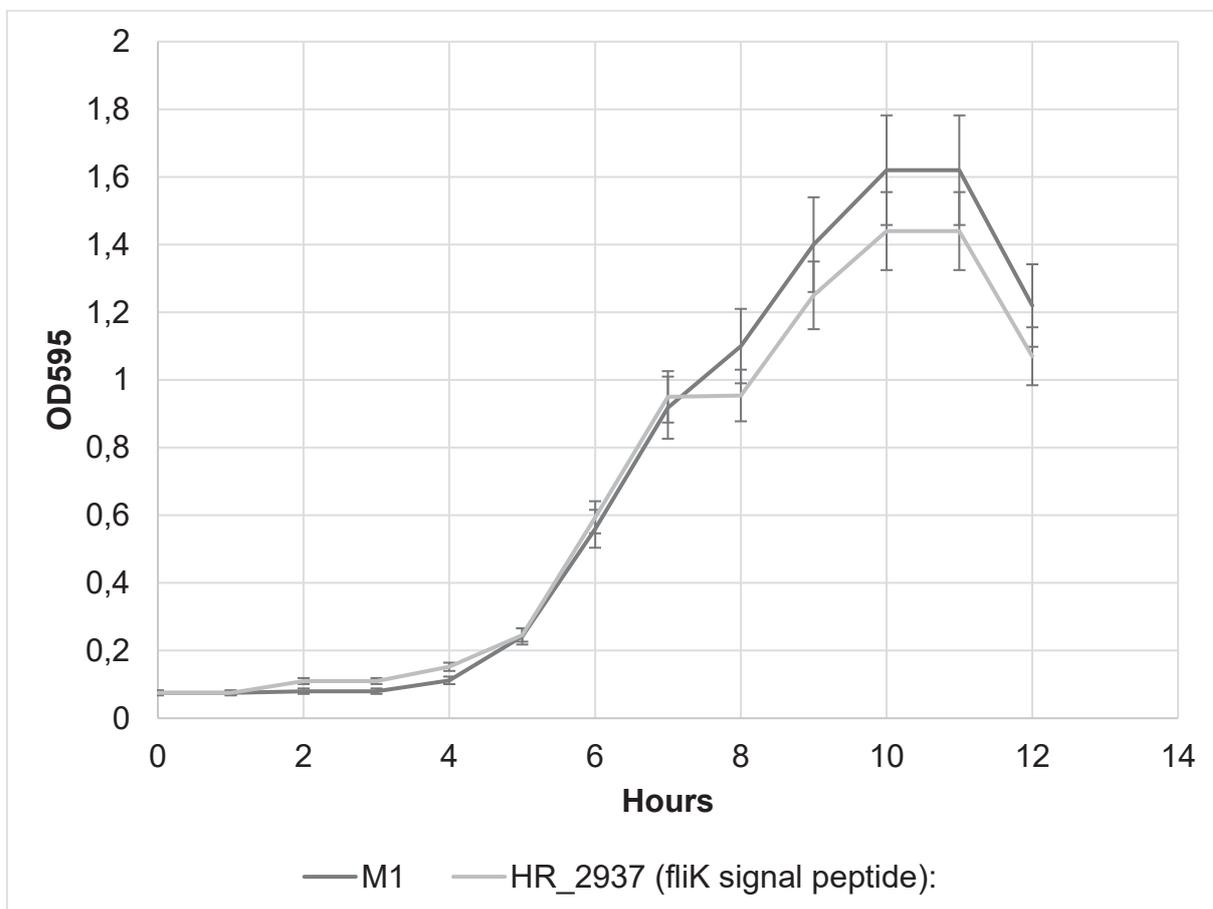


FIGURA 77S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2937. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

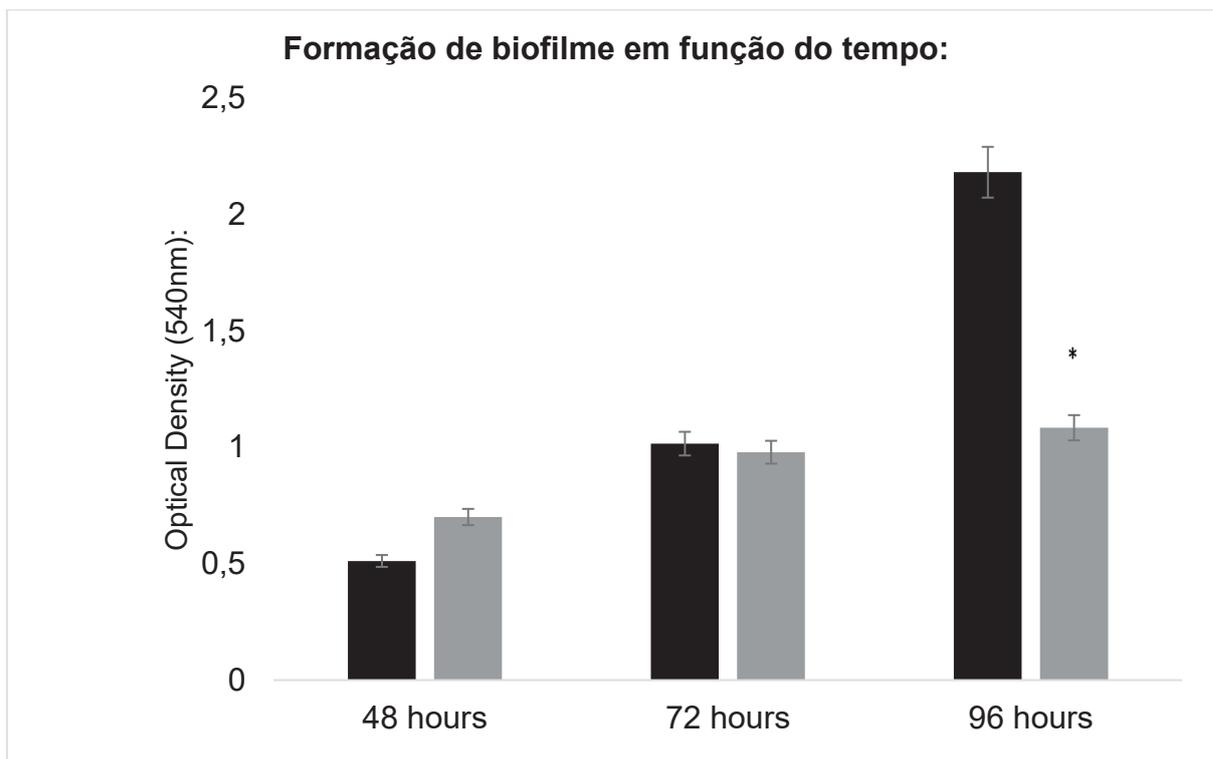


FIGURA 78S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_2937. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

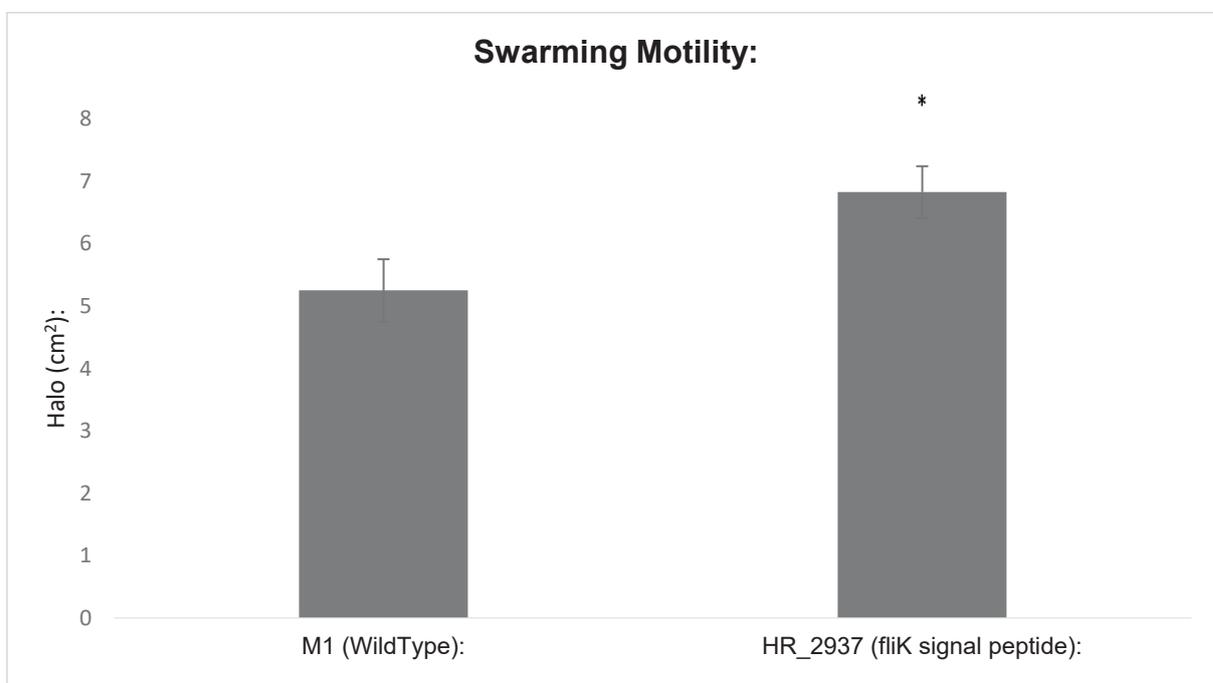


FIGURA 79S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2937. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (*swimming*) e 48 horas (*swarming*). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

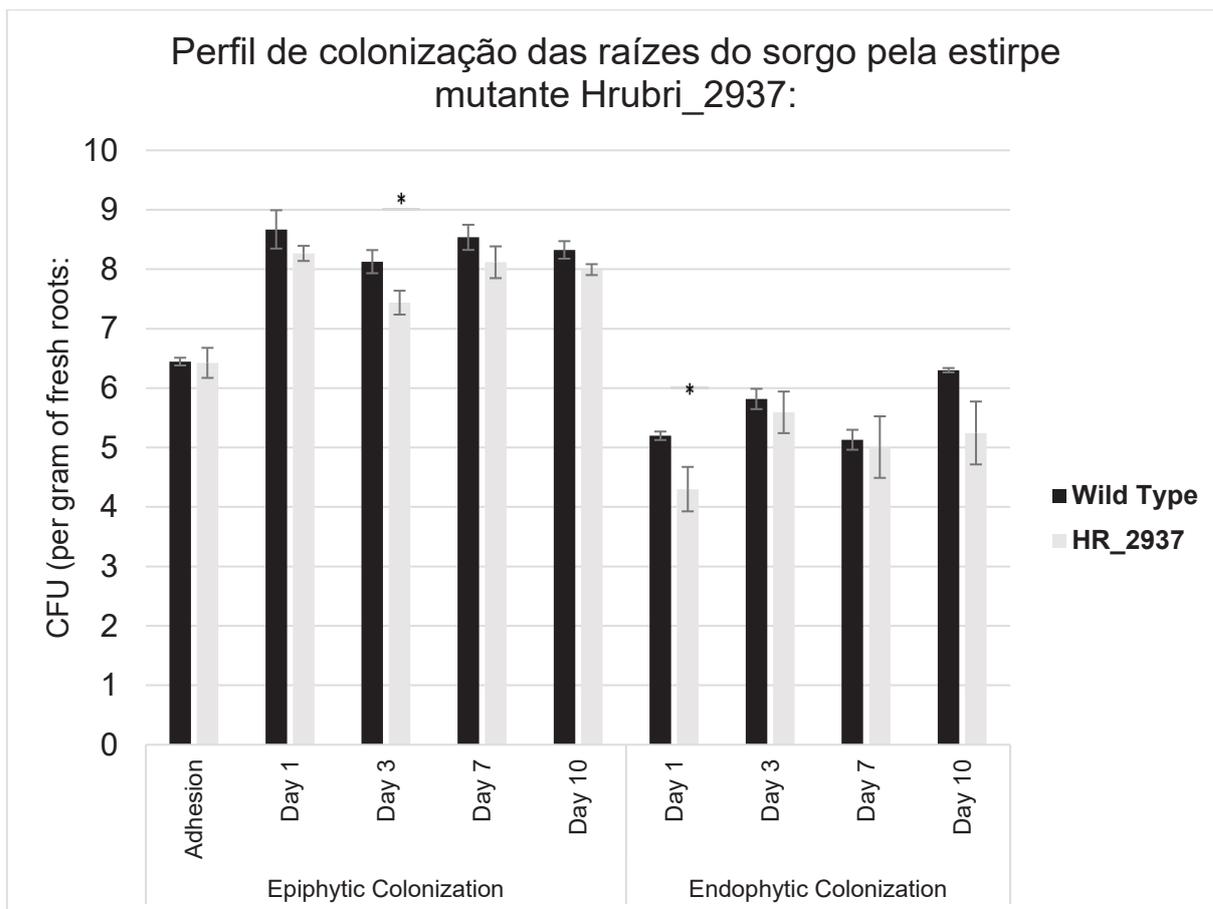


FIGURA 80S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2937. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

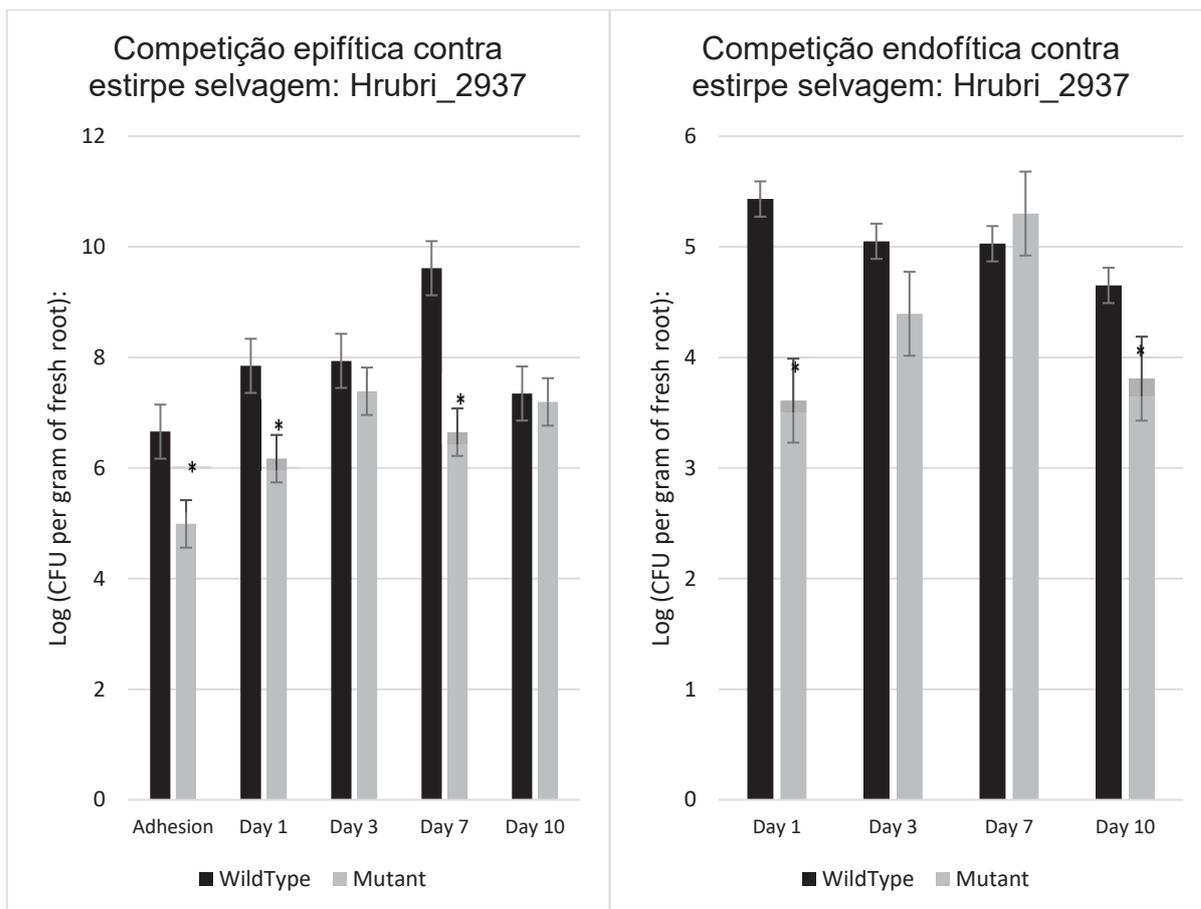


FIGURA 81S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2937 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

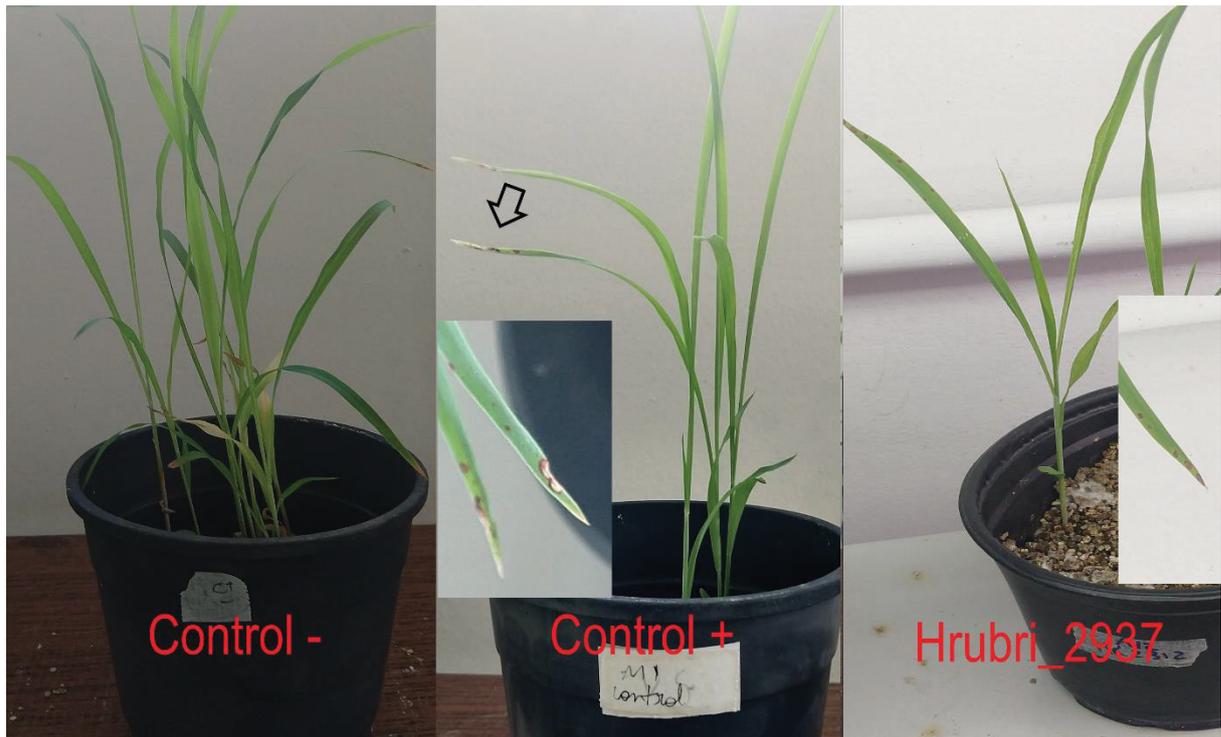


FIGURA 82S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2937. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_3783

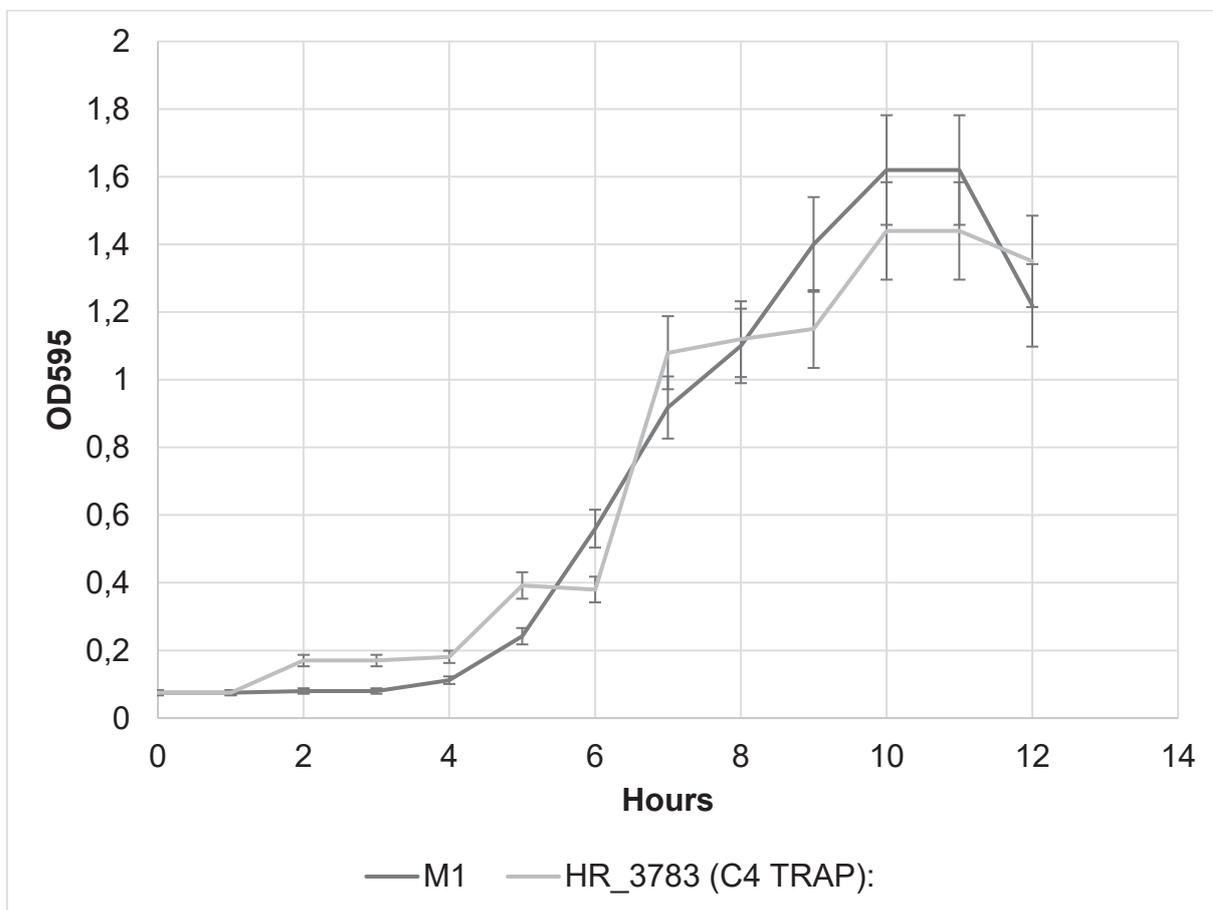


FIGURA 83S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_3783. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

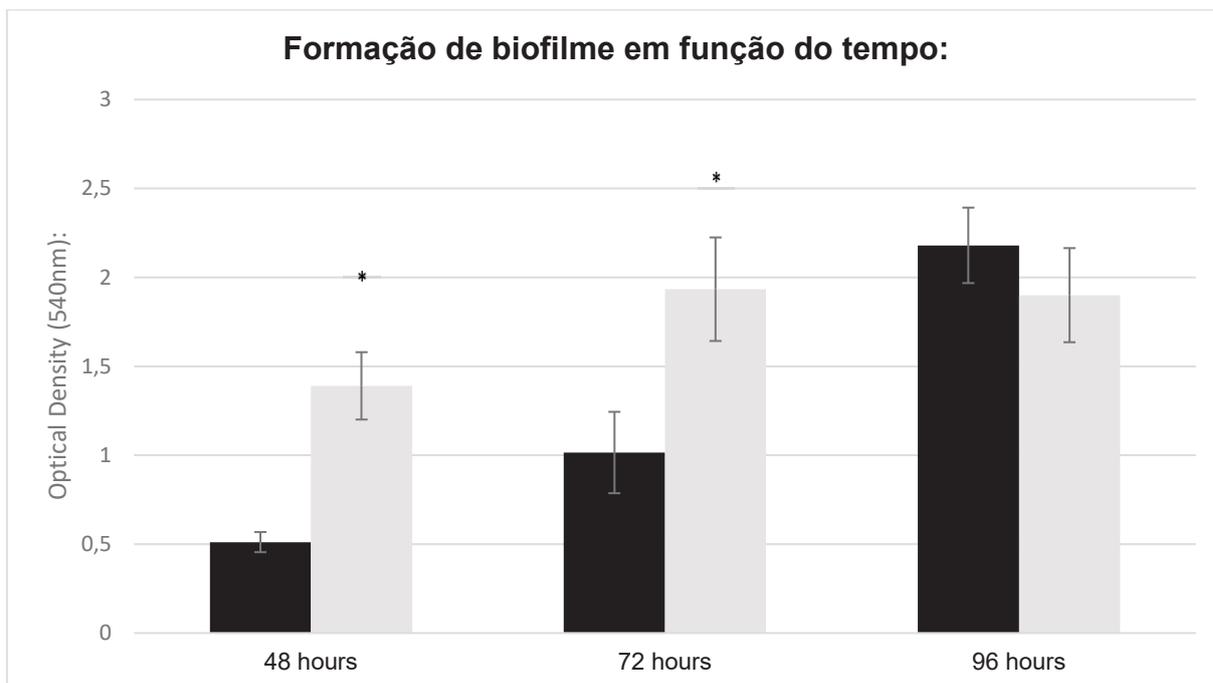


FIGURA 84S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_3783. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

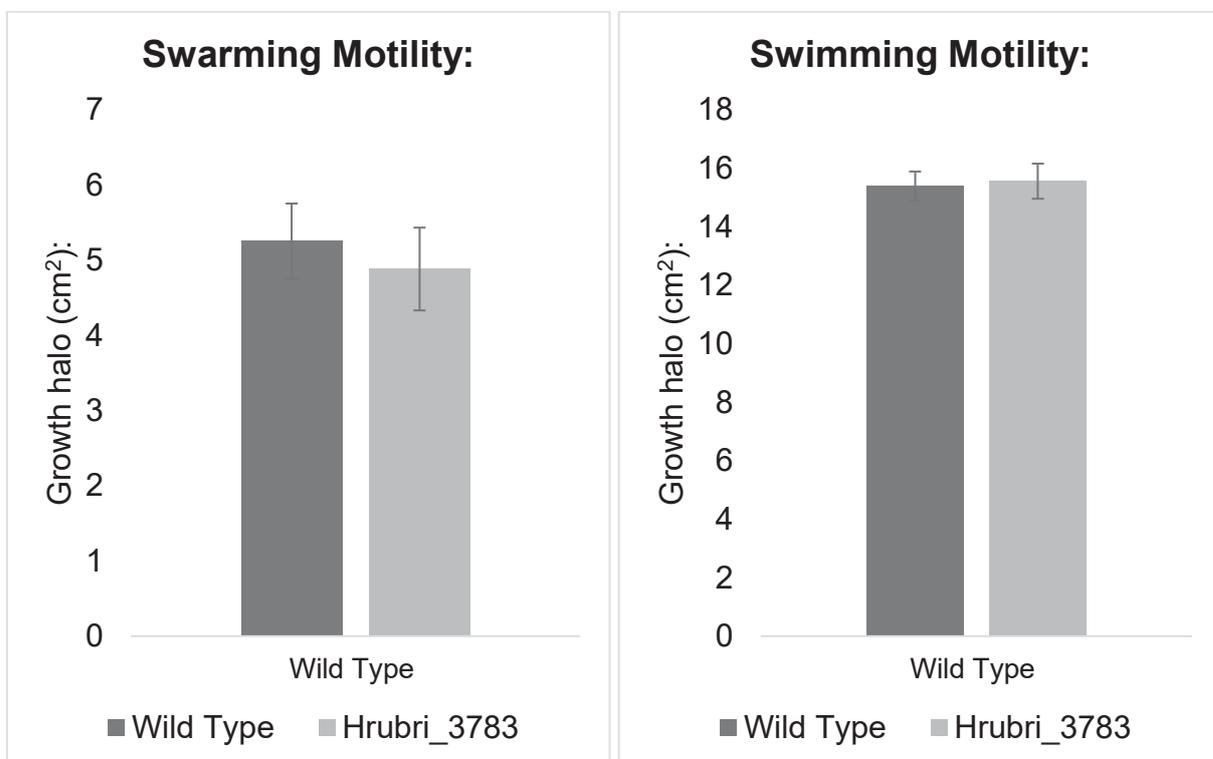


FIGURA 85S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_3783. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (swimming) e 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

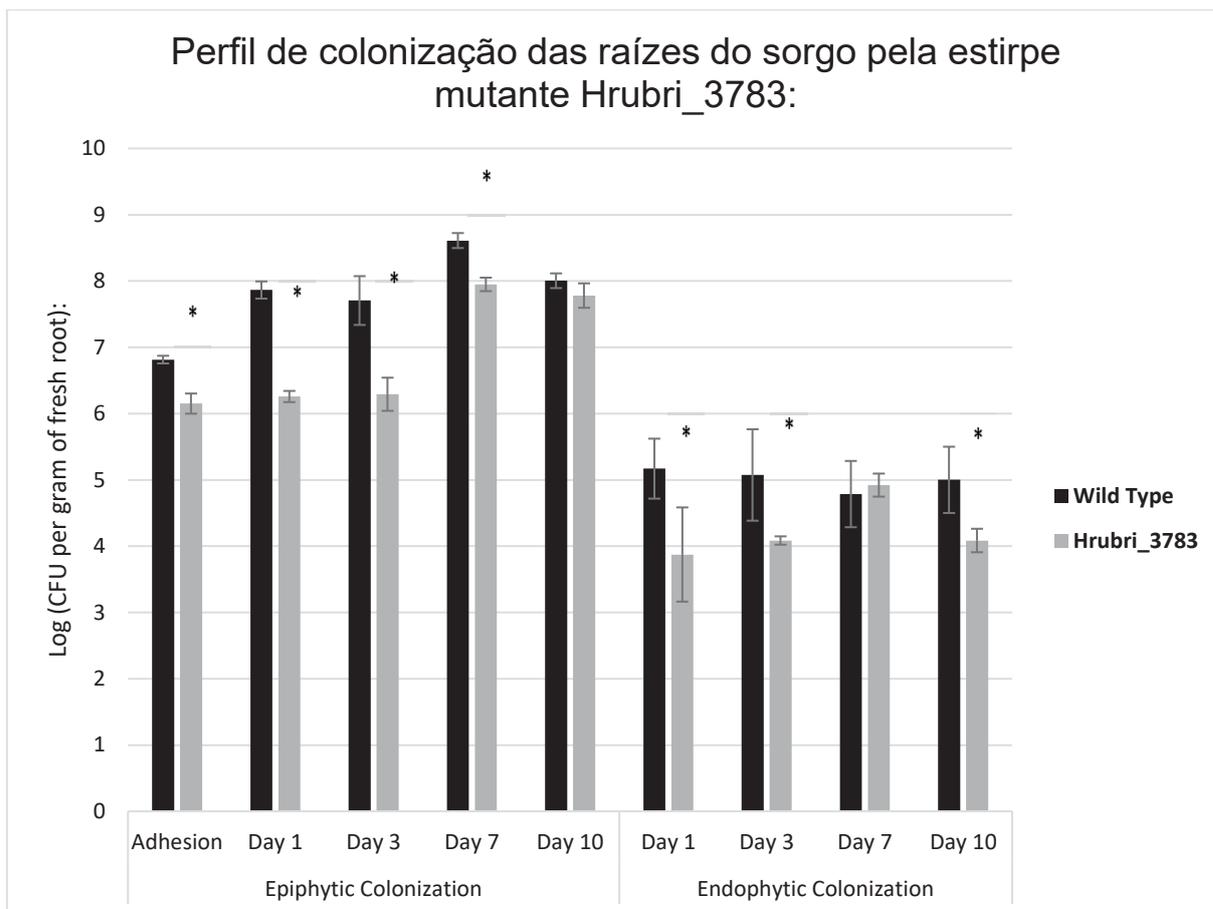


FIGURA 86S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_3783. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

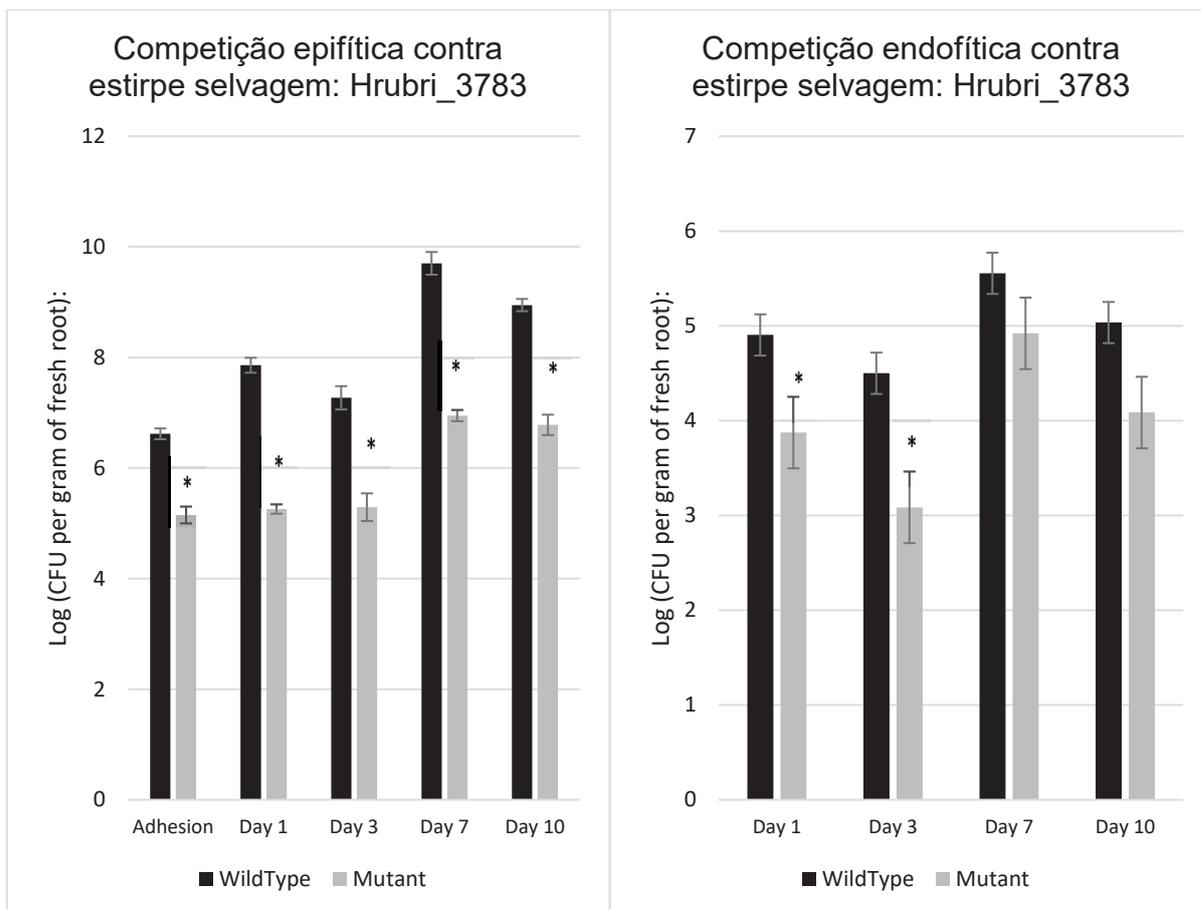


FIGURA 87S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_3783 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

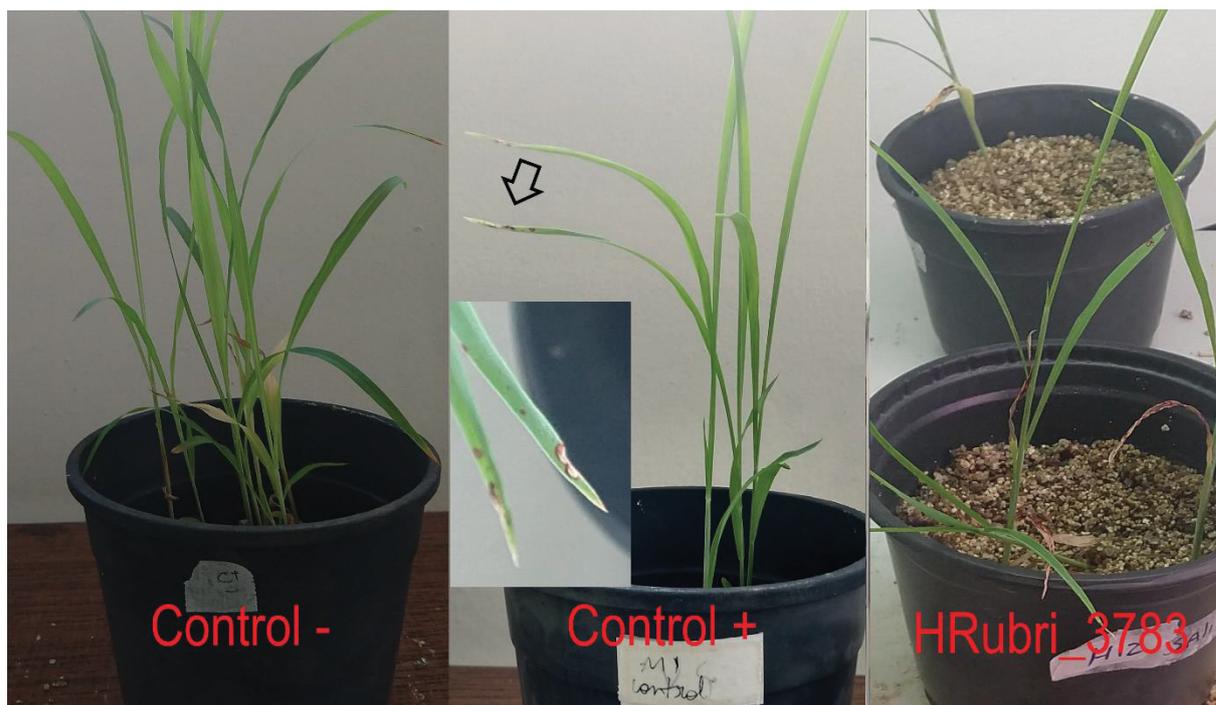


FIGURA 88S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_3783. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_3948

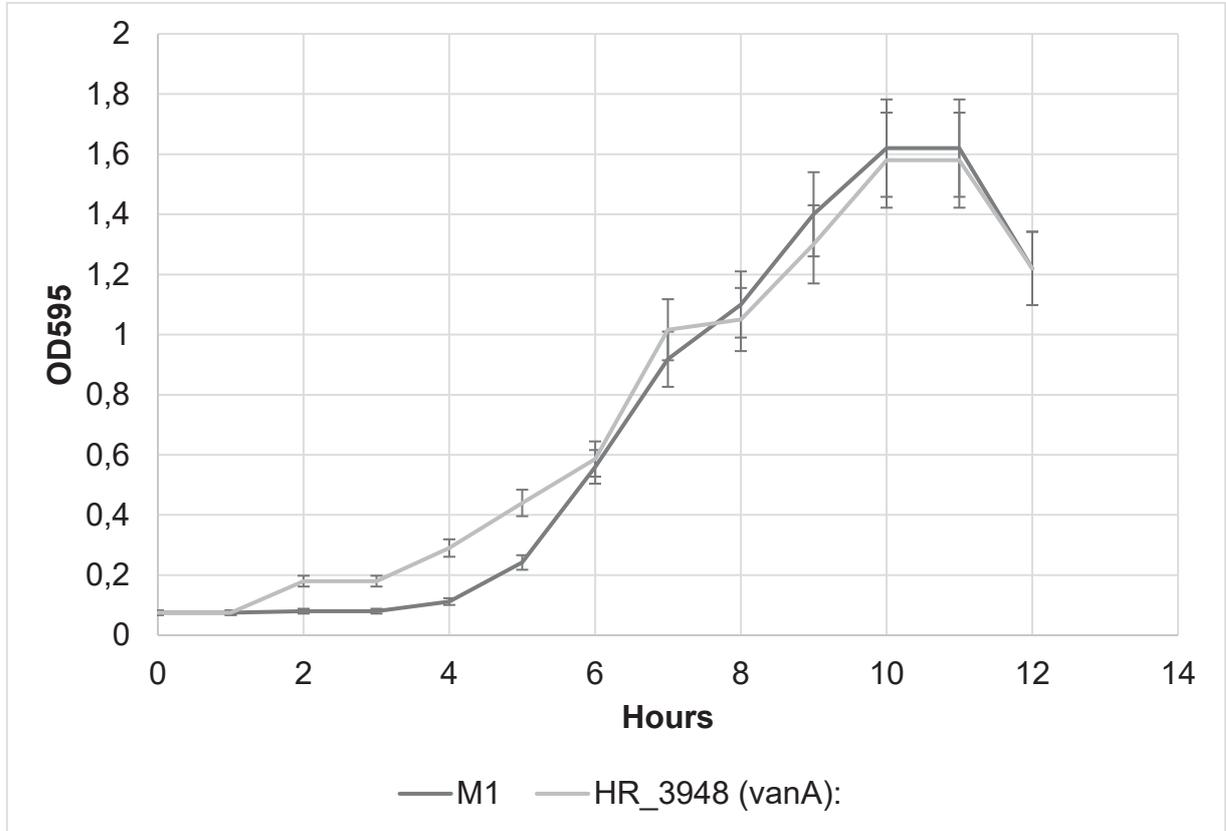


FIGURA 89S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_3948. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

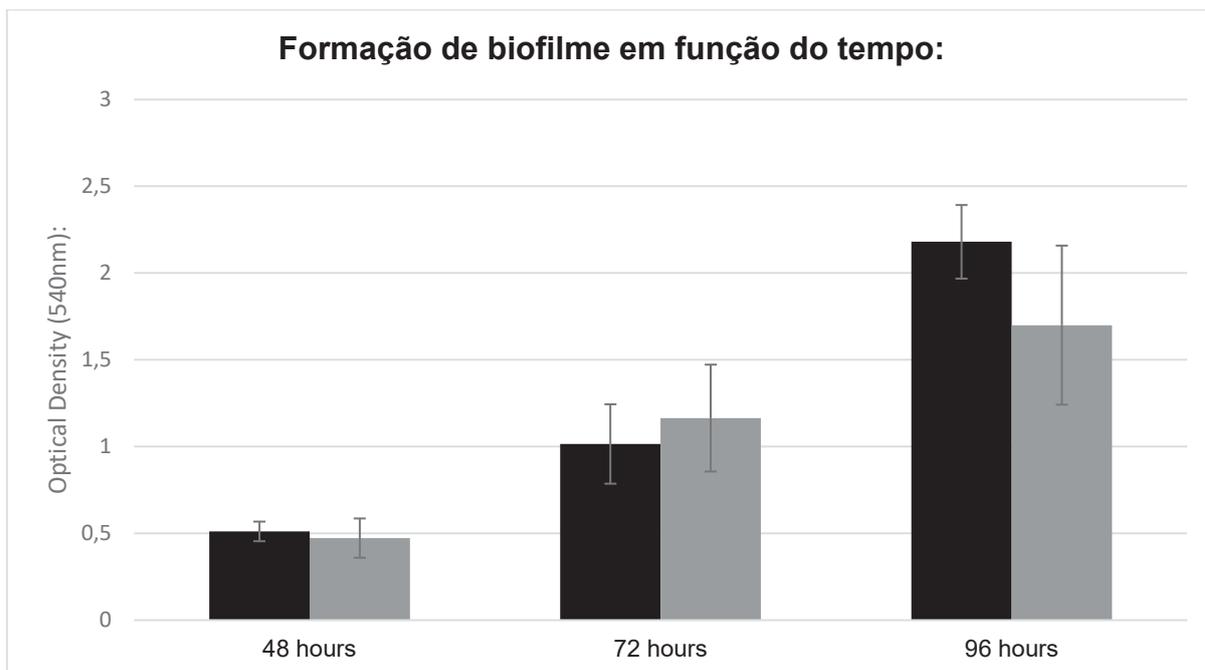


FIGURA 90S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_3948. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

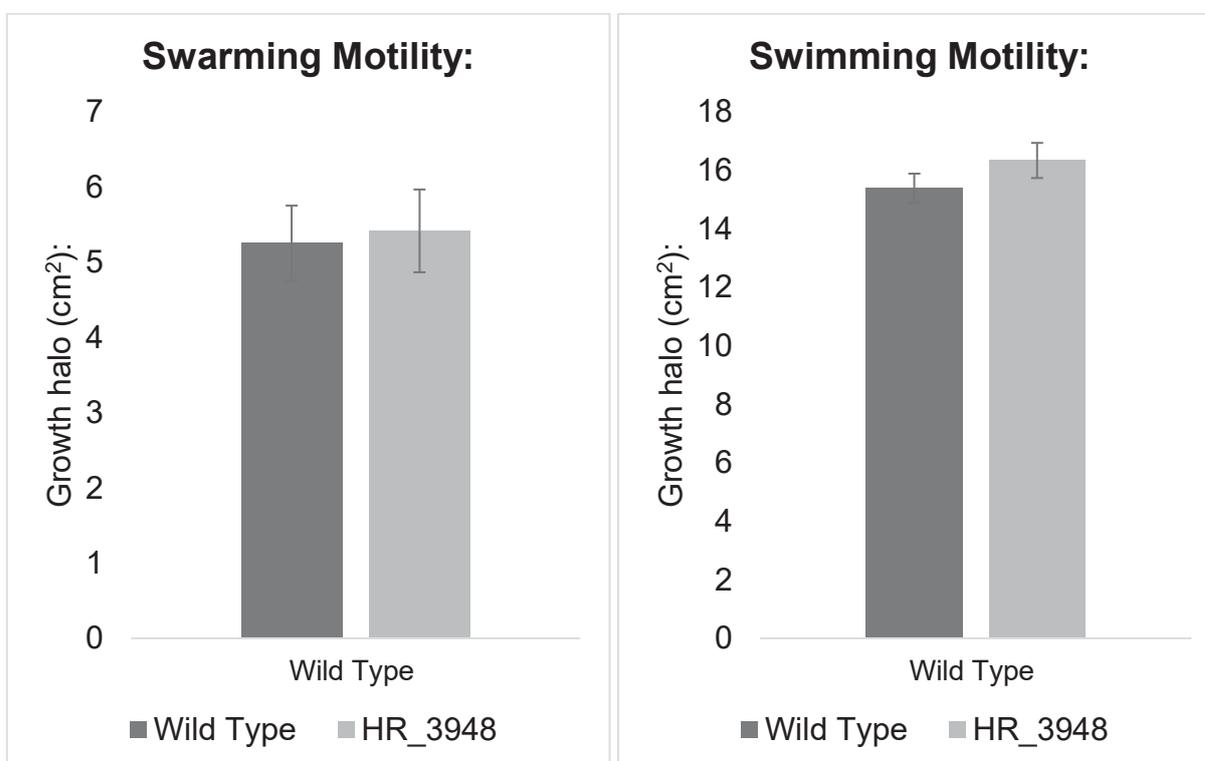


FIGURA 91S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_3783. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 18 horas (swimming) e 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

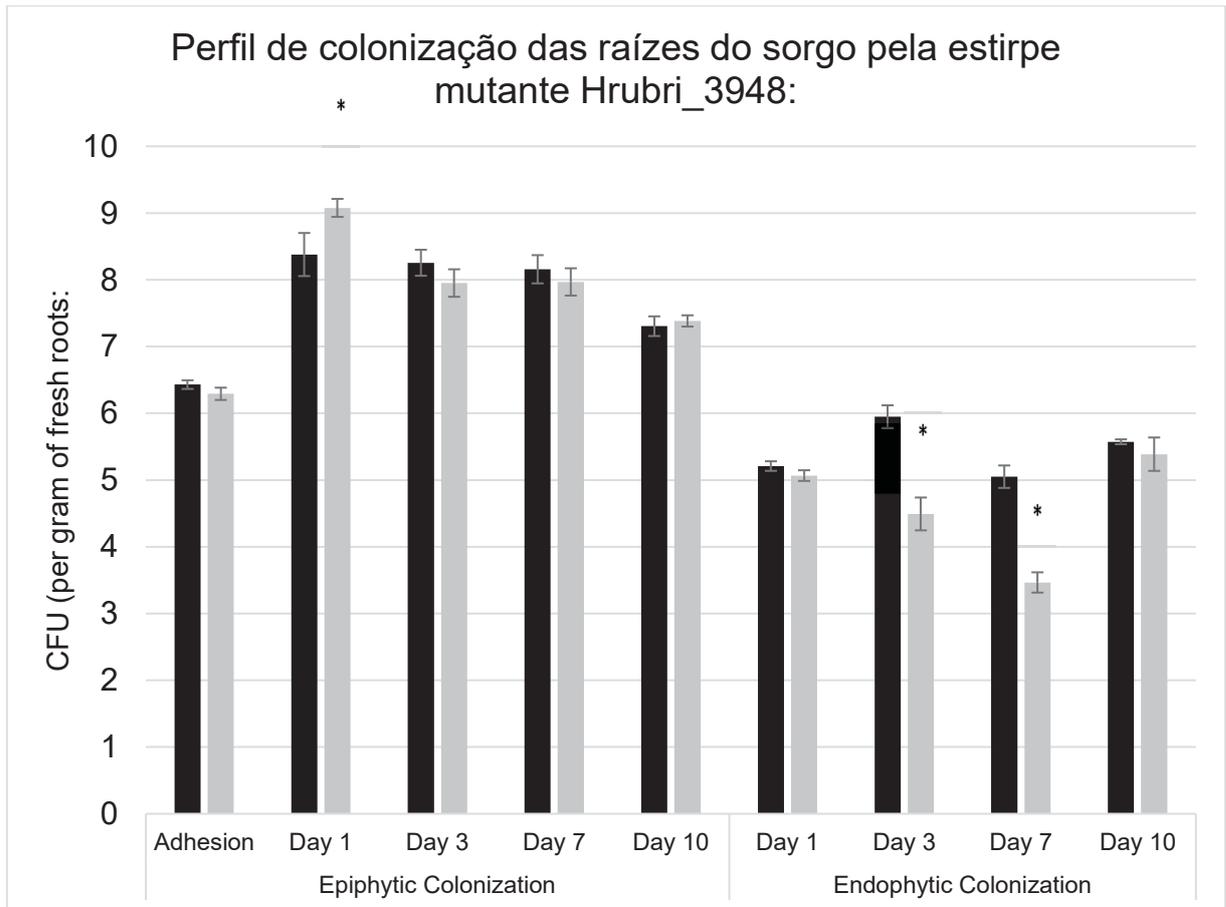


FIGURA 92S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_3948. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

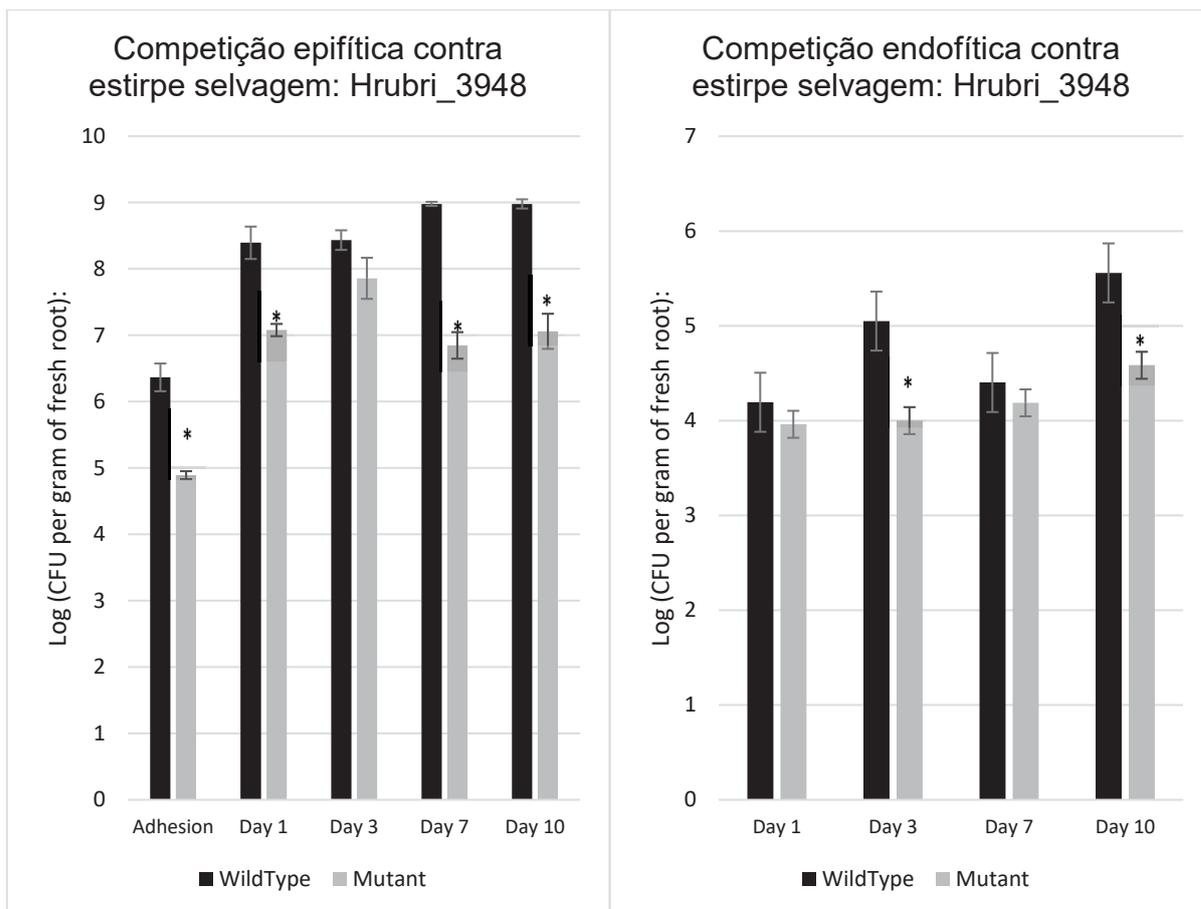


FIGURA 93S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_3948 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

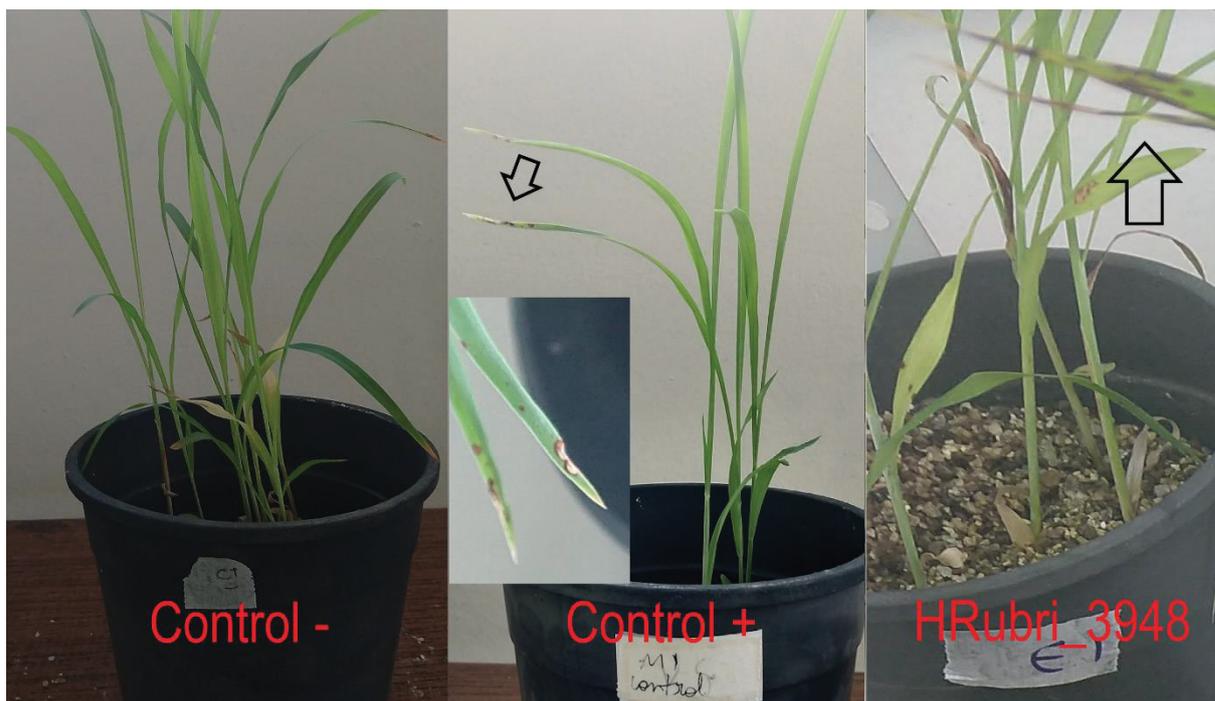


FIGURA 94S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_3948. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

S3. PARTE II – SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO VI:

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2309

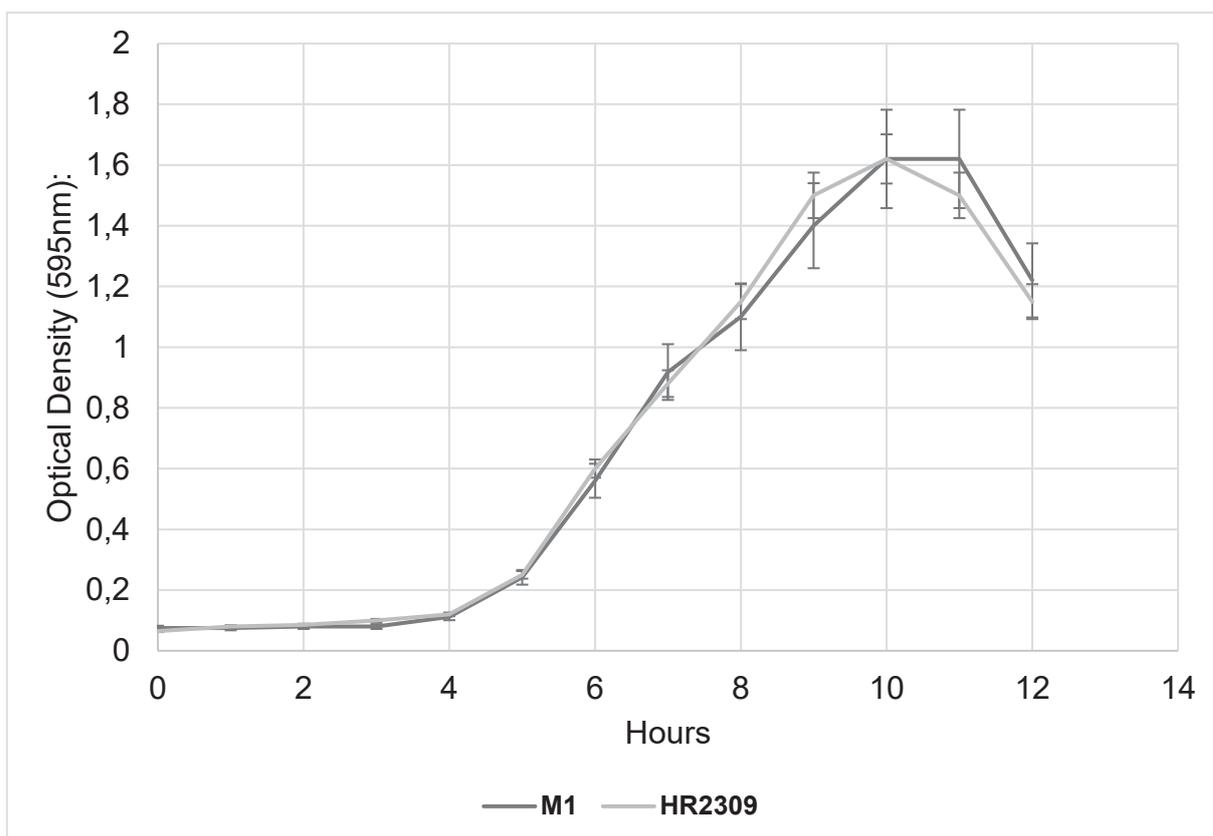


FIGURA 95S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2309. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

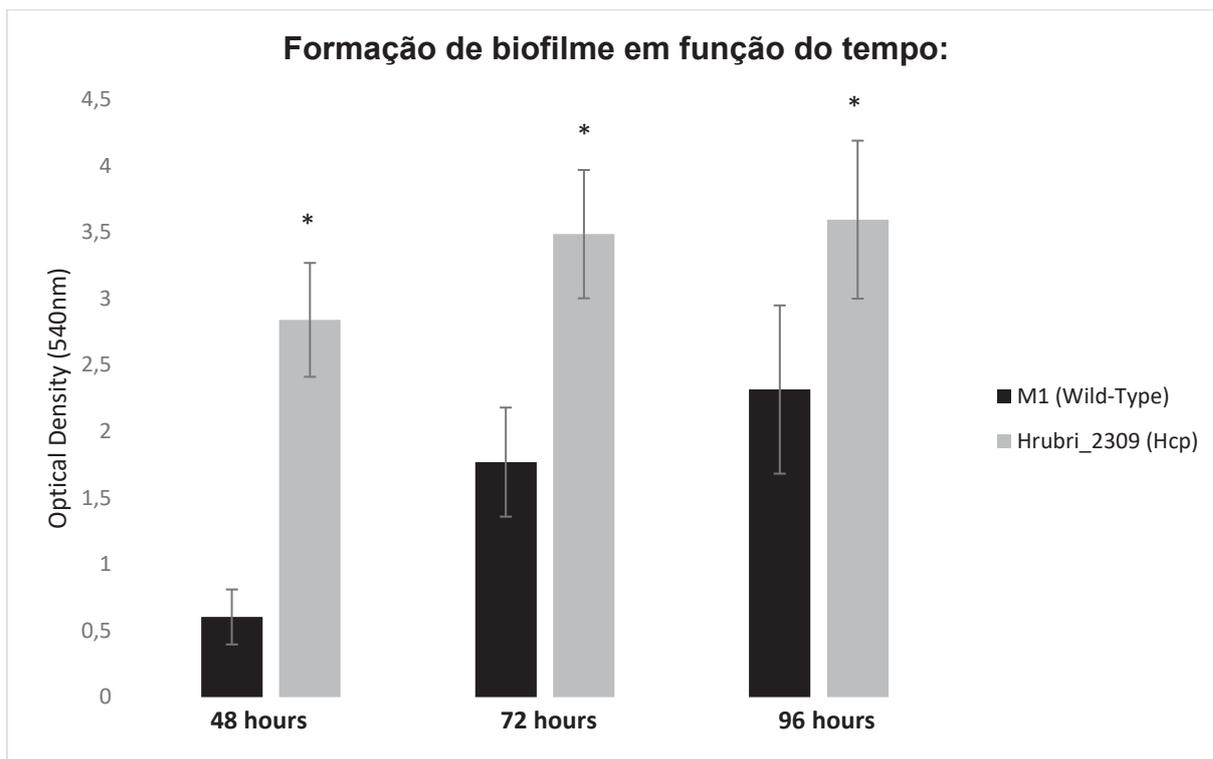


FIGURA 96S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_2309. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

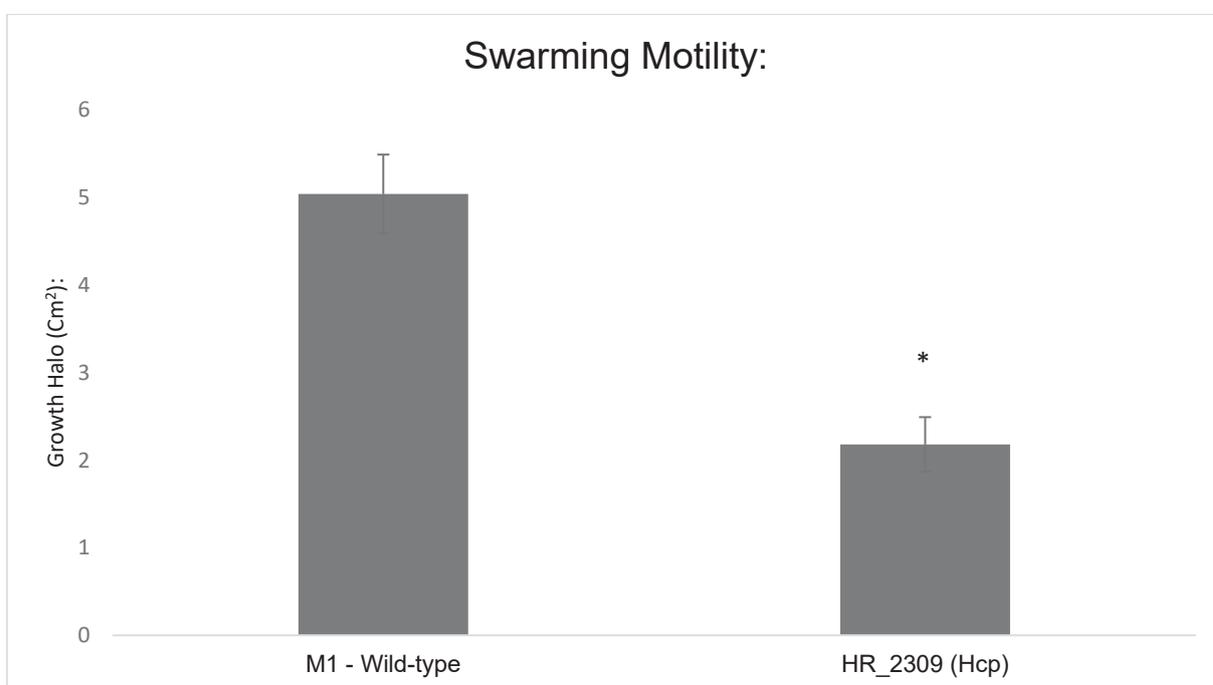


FIGURA 97S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2309. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

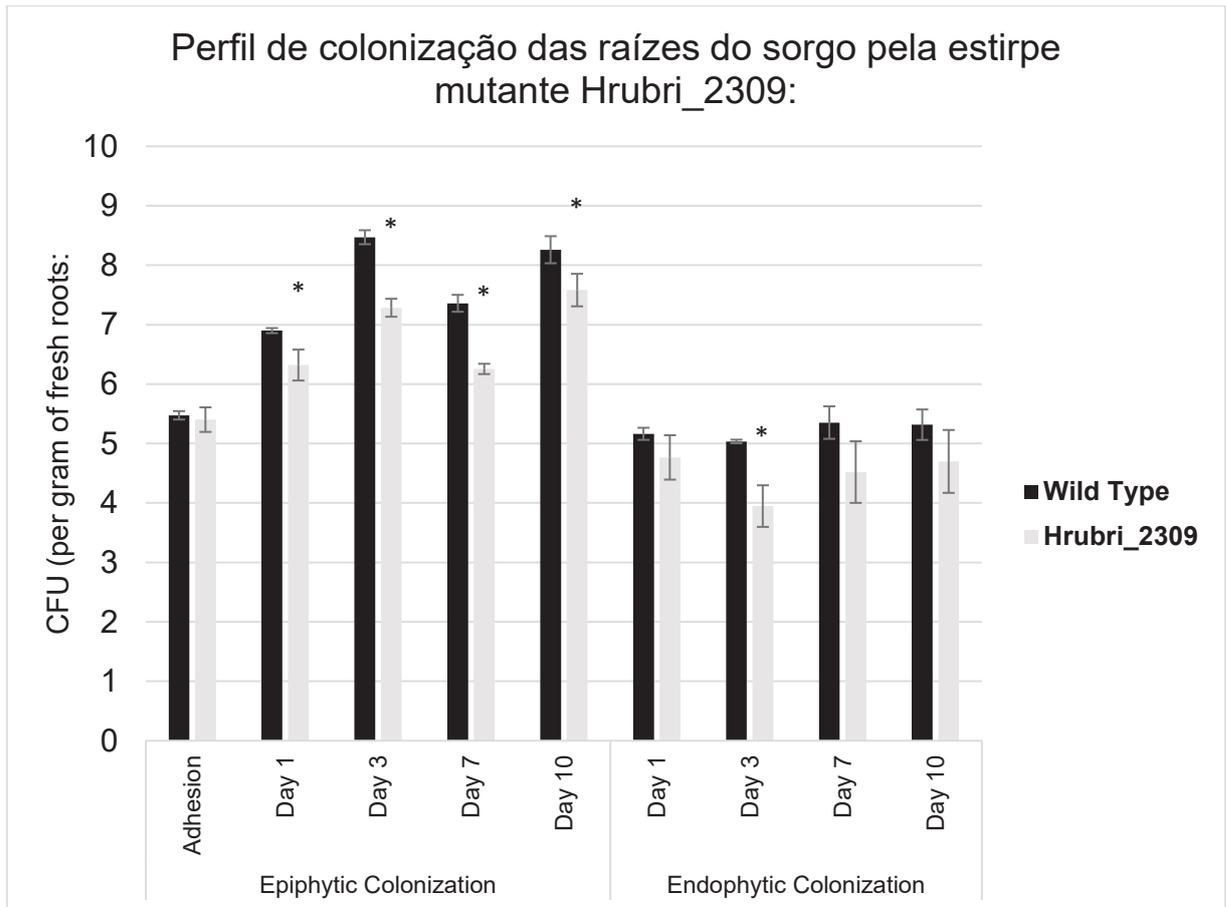


FIGURA 98S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2309. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

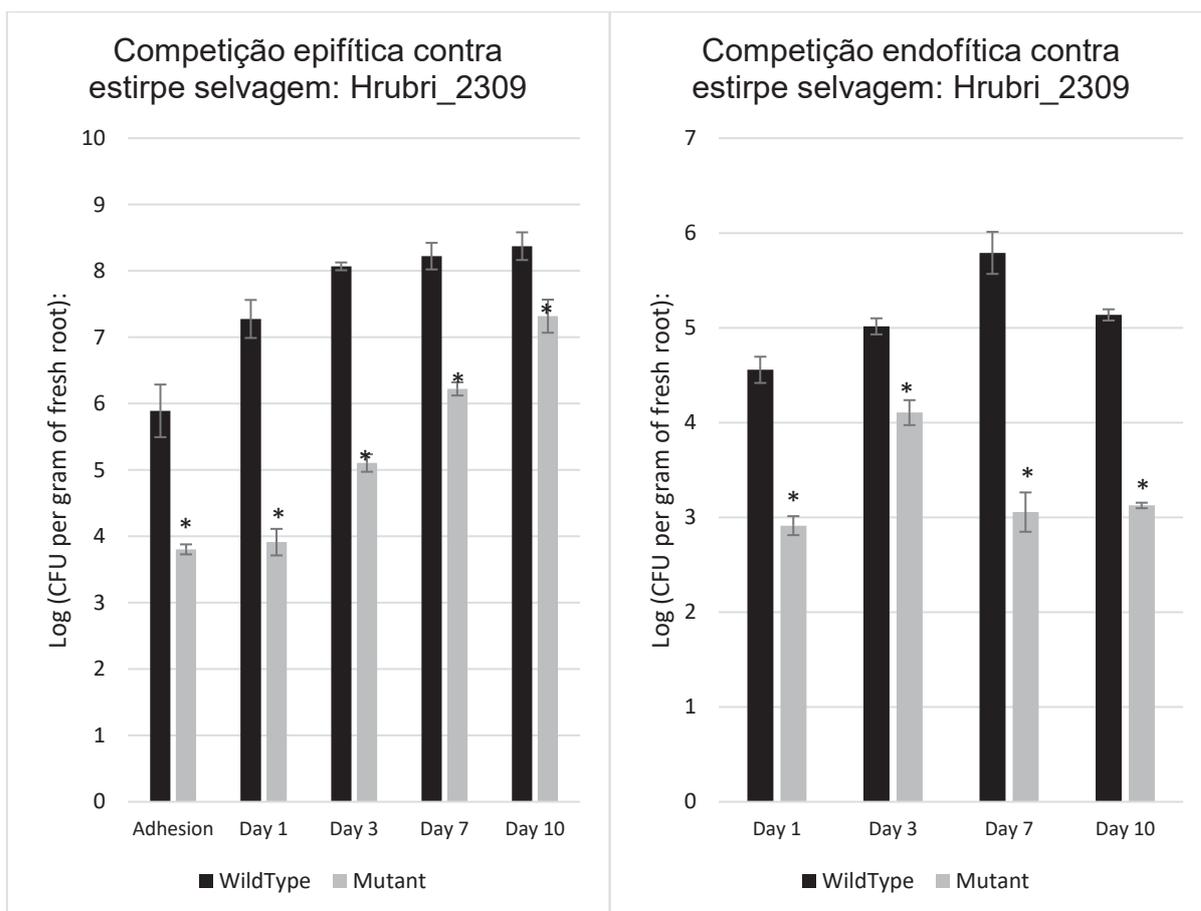


FIGURA 99S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2309 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.



FIGURA 100S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_2309. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódio 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. É possível observar acúmulo de muco na superfície celular, possivelmente devido a maior formação de biofilme (seta vermelha) e flagelos íntegros (seta preta).

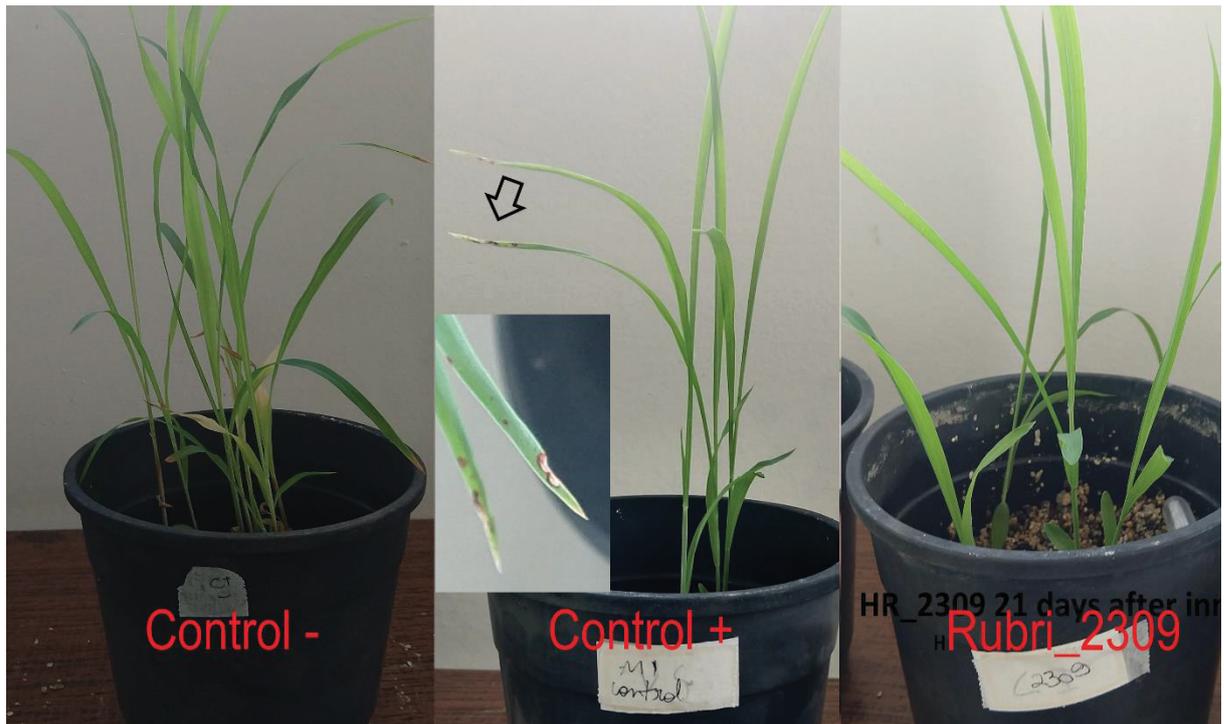


FIGURA 101S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2309. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2312

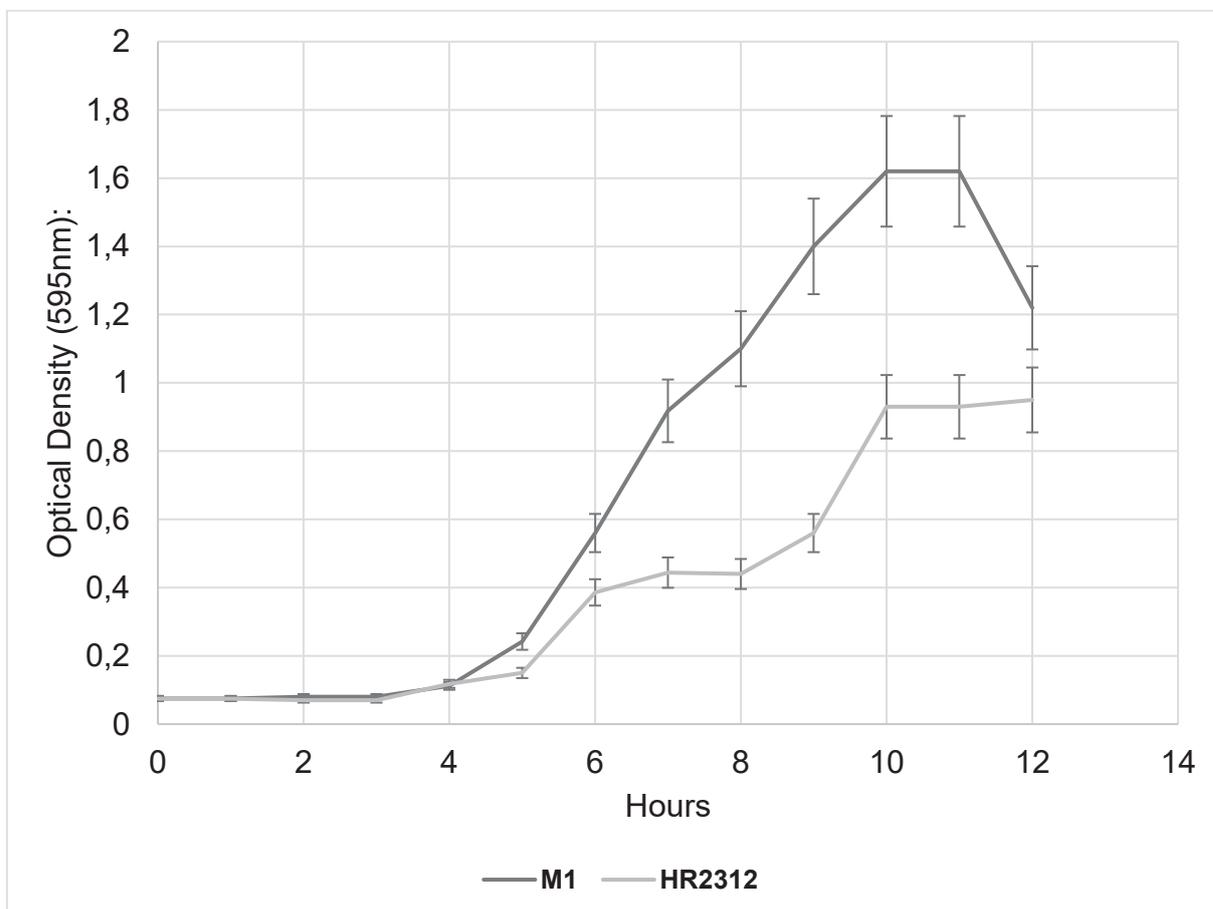


FIGURA 102S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2312. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

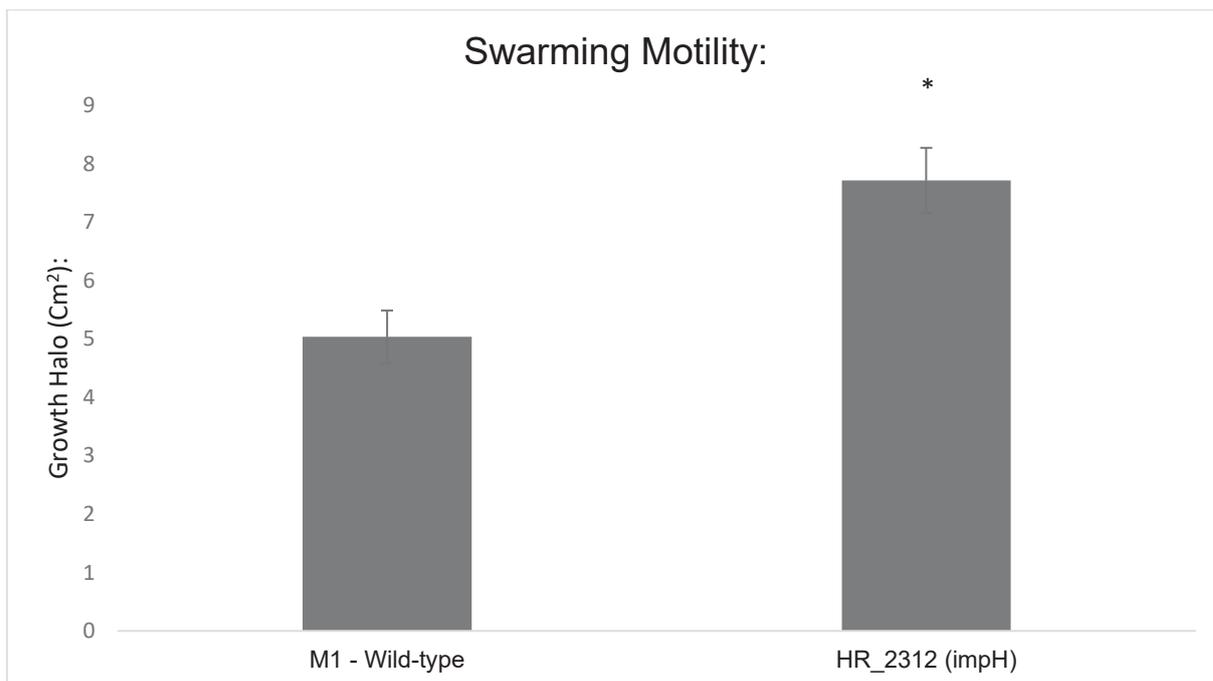


FIGURA 103S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2312. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

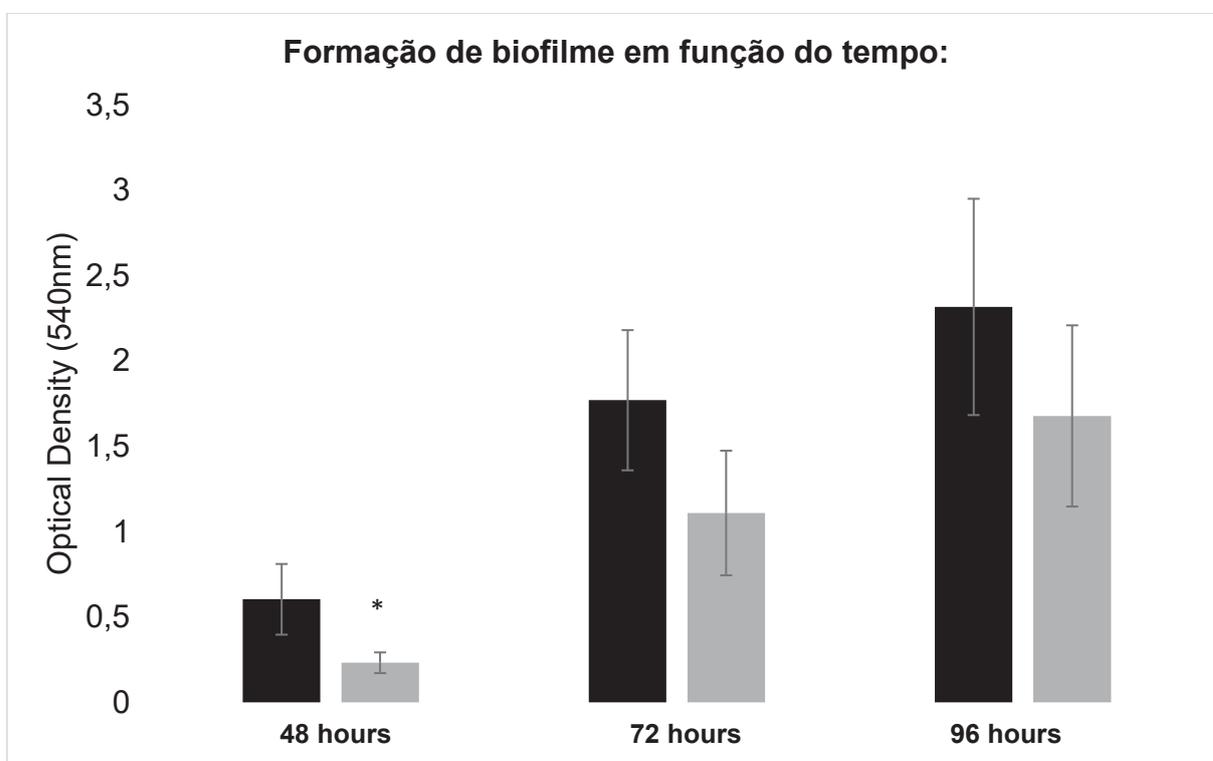


FIGURA 104S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_2312. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

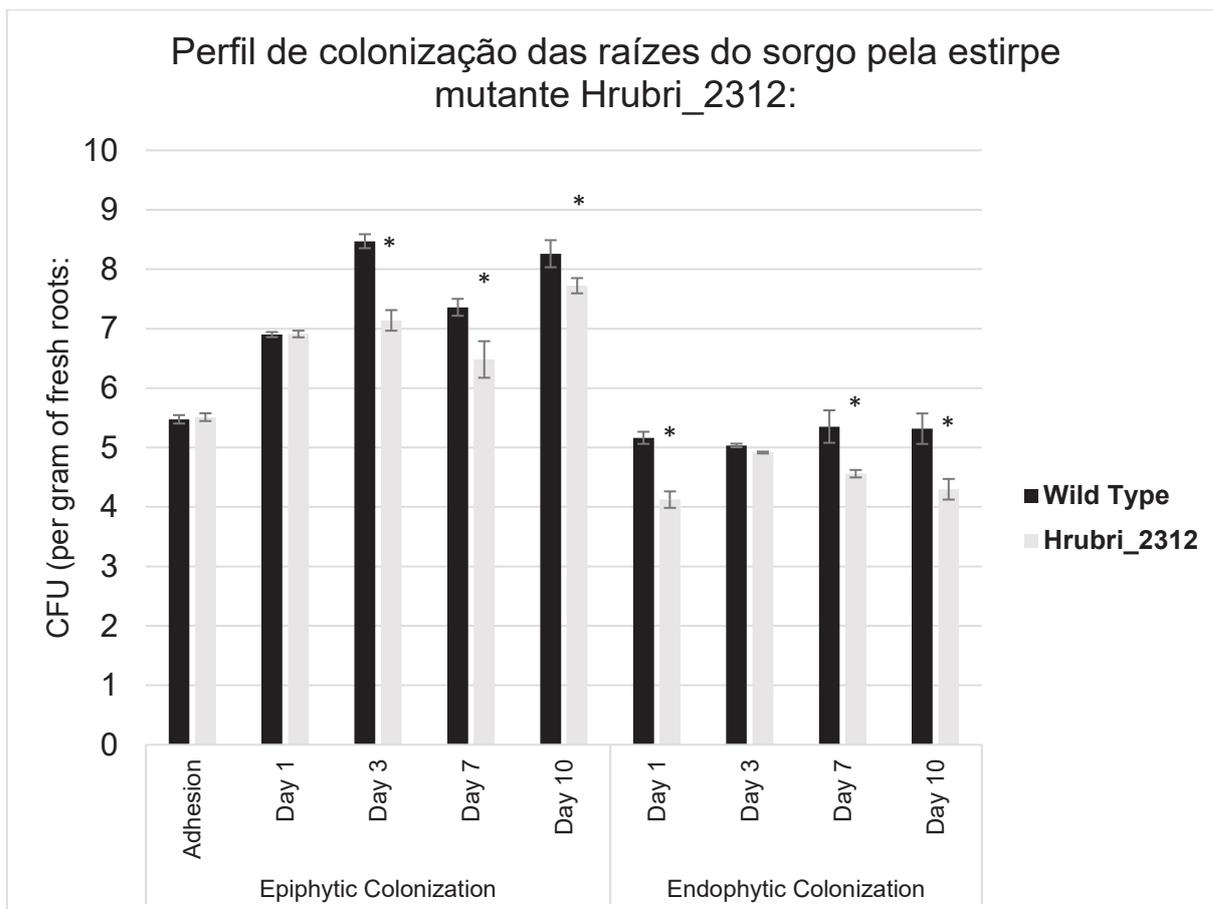


FIGURA 105S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2312. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

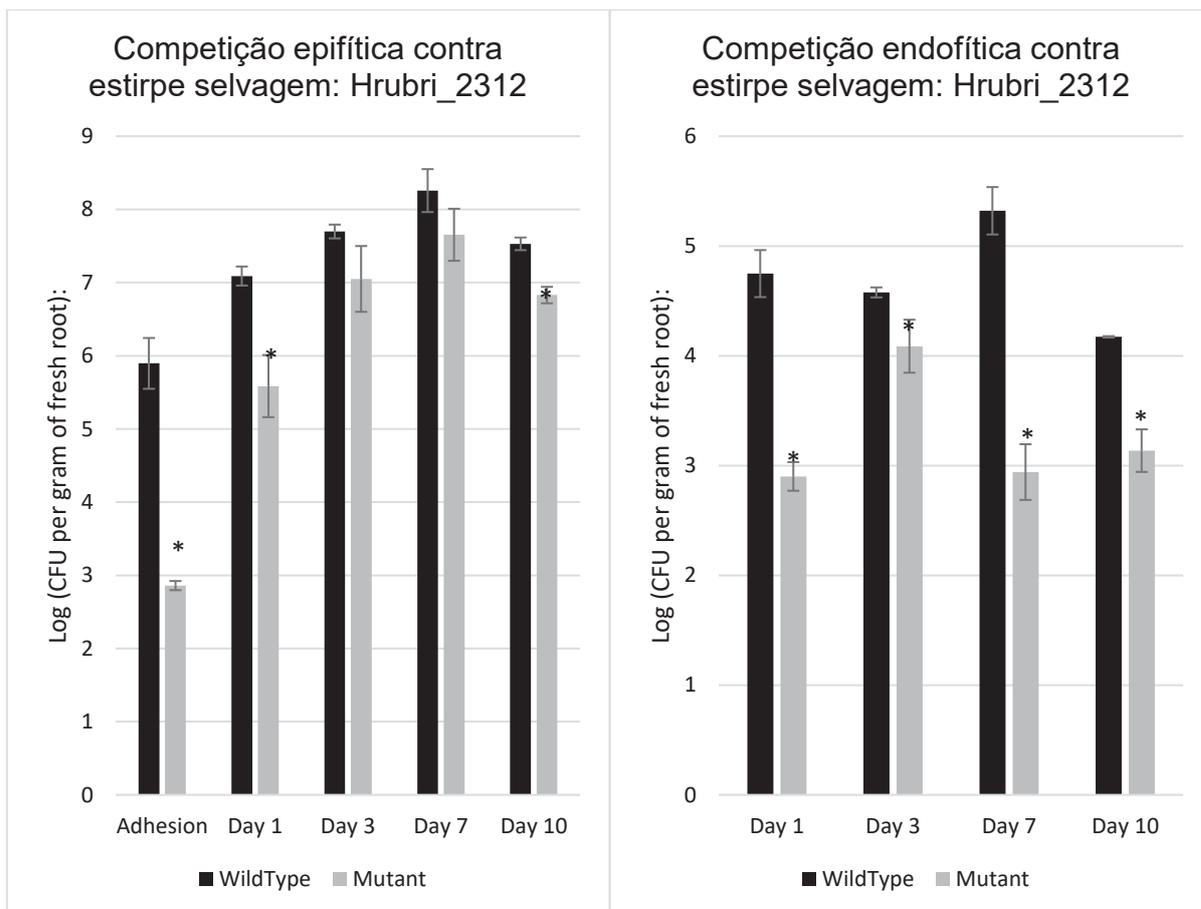


FIGURA 106S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2312 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

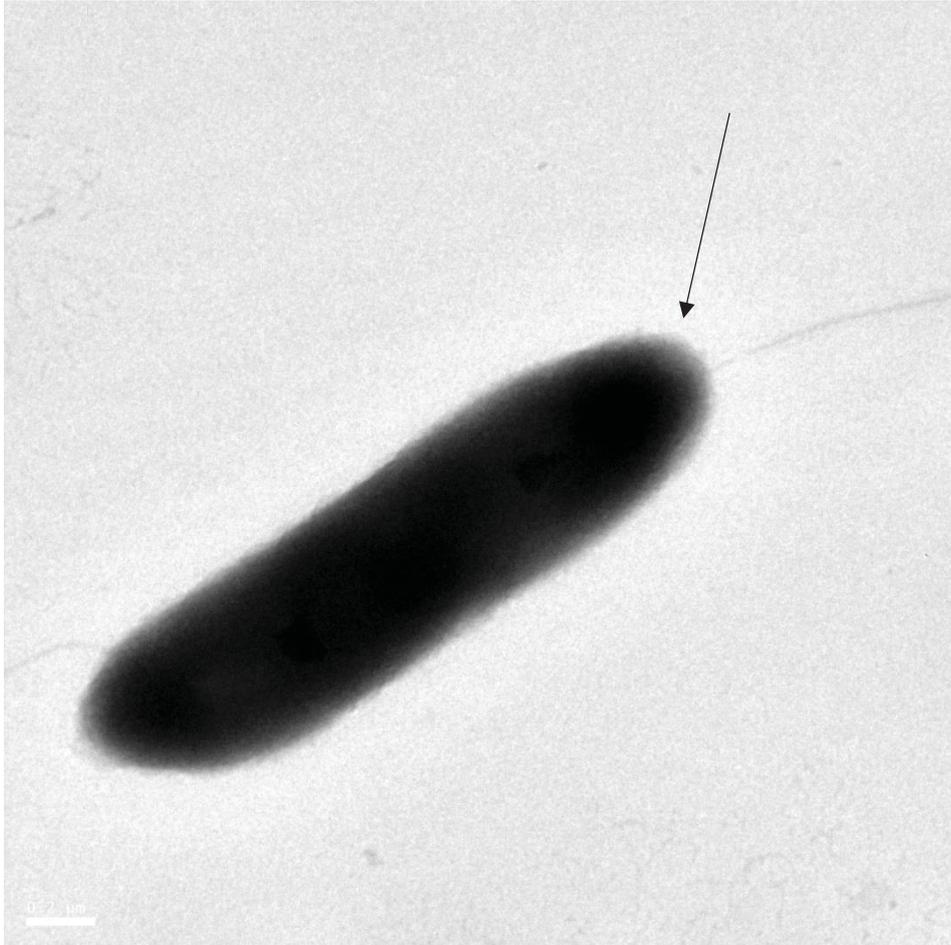


FIGURA 107S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_2312. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódio 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. Essa estirpe mutante não apresentou alterações em relação a estirpe selvagem. É possível observar flagelos íntegros (seta preta).

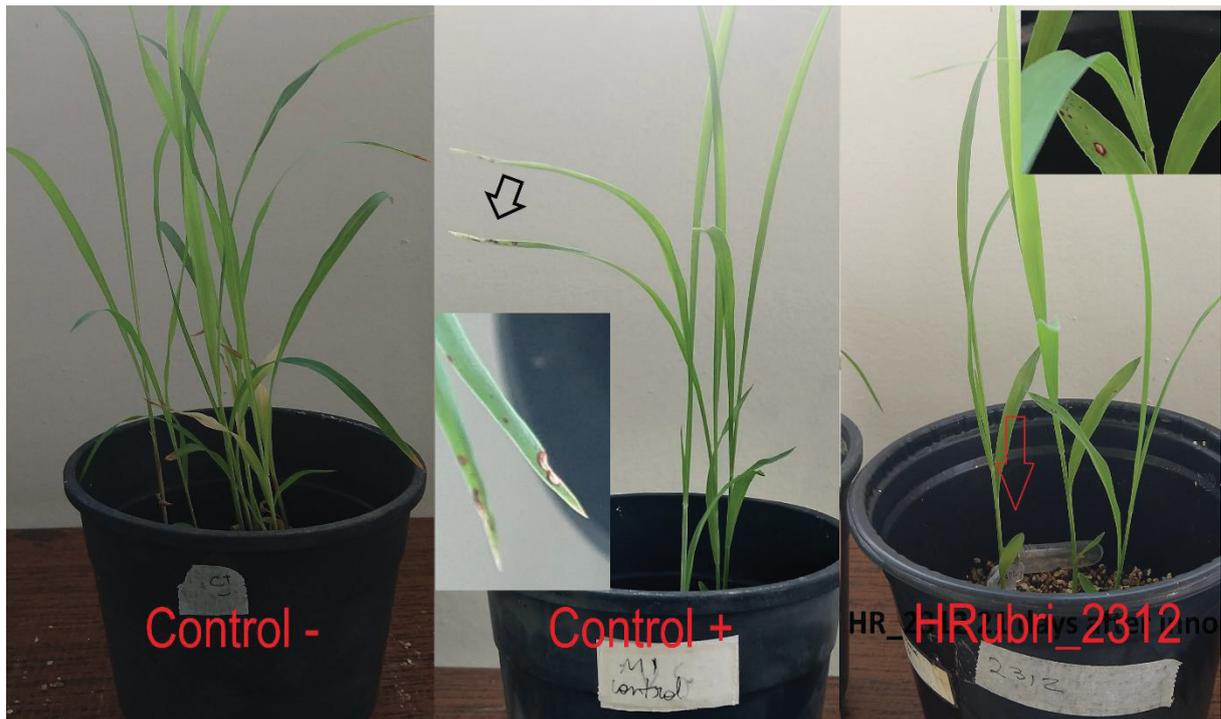


FIGURA 108S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2312. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2313

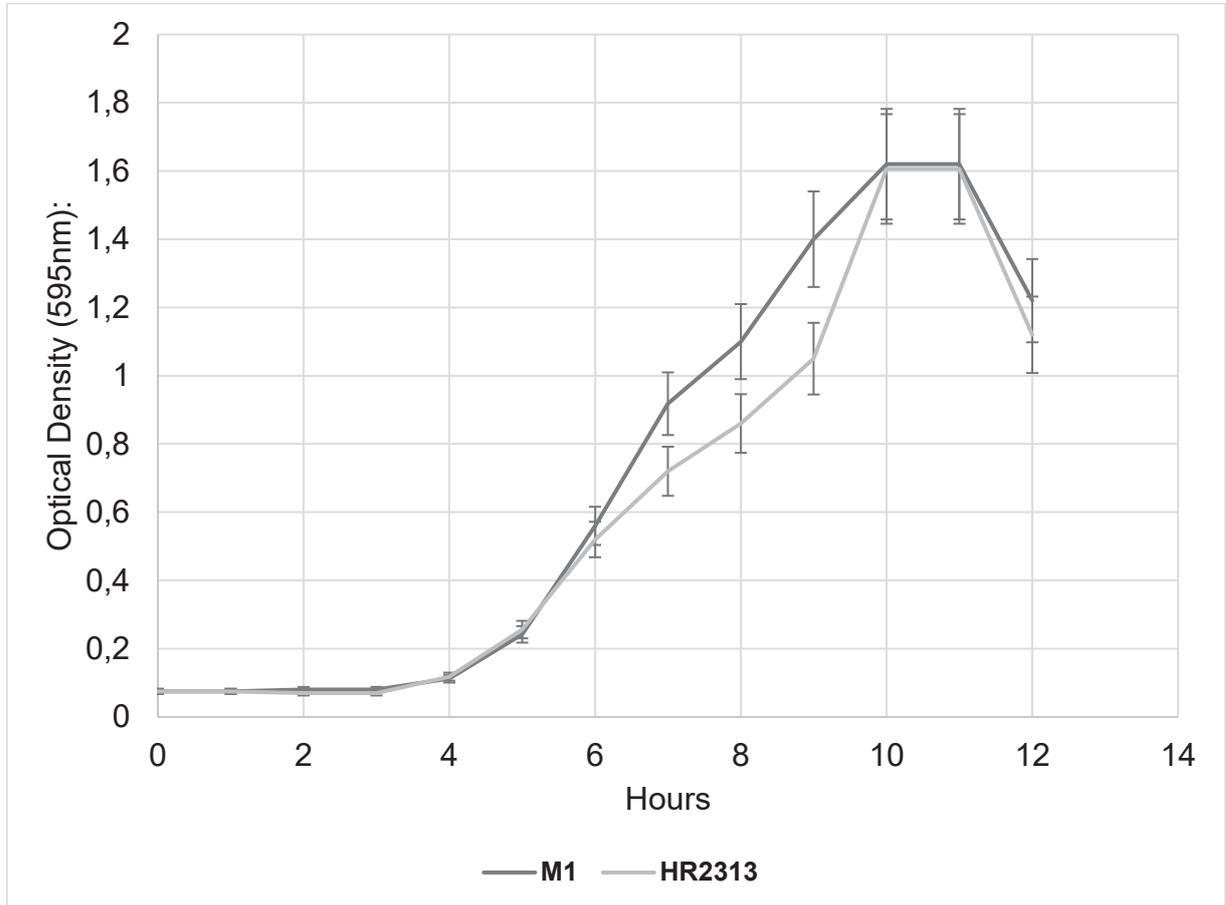


FIGURA 109S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2313. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

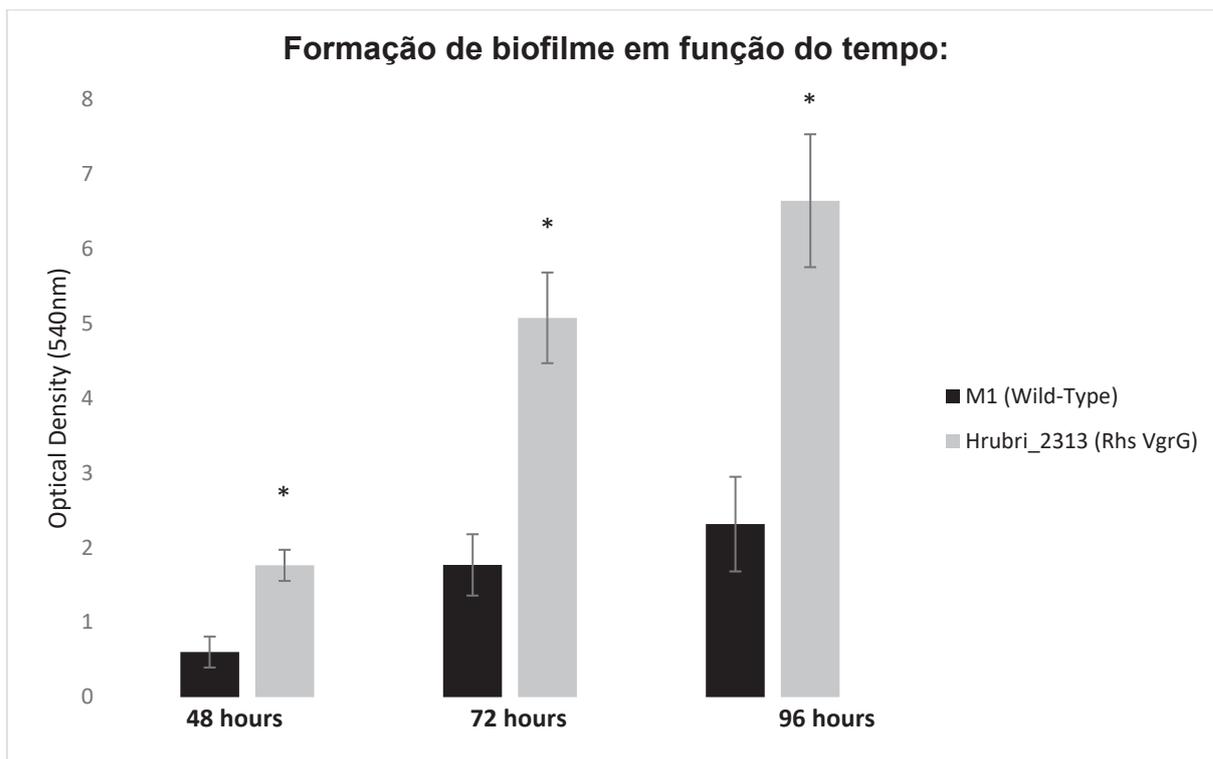


FIGURA 110S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_2313. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

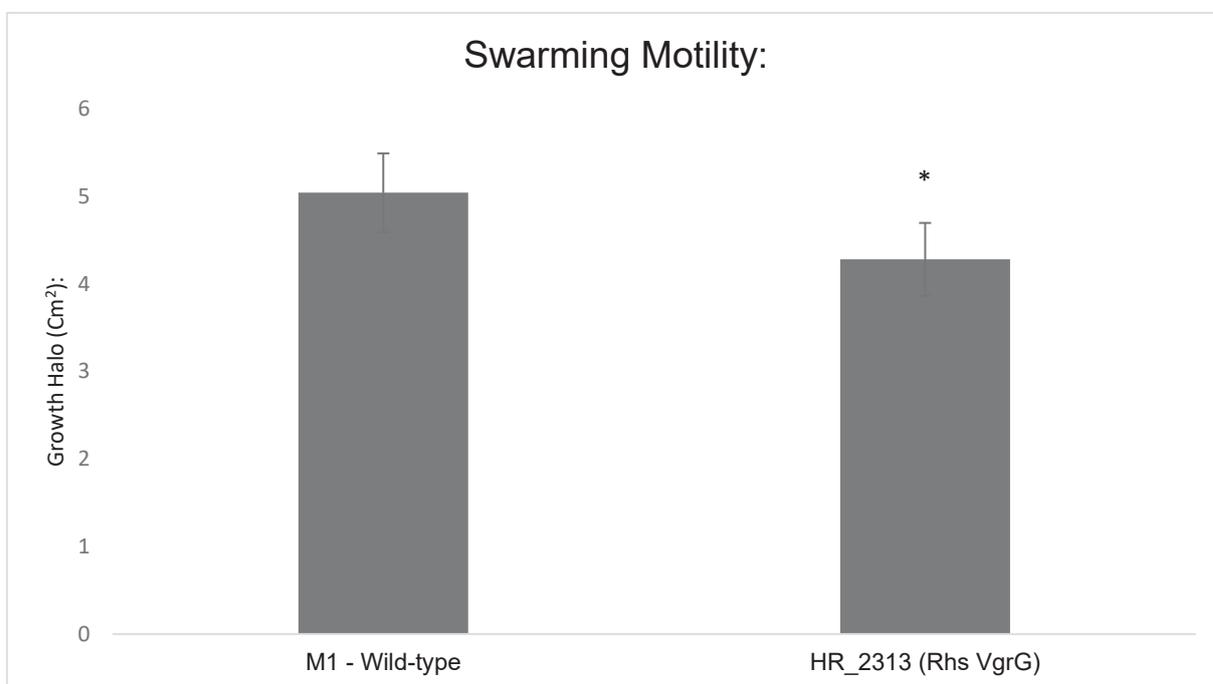


FIGURA 111S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2313. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

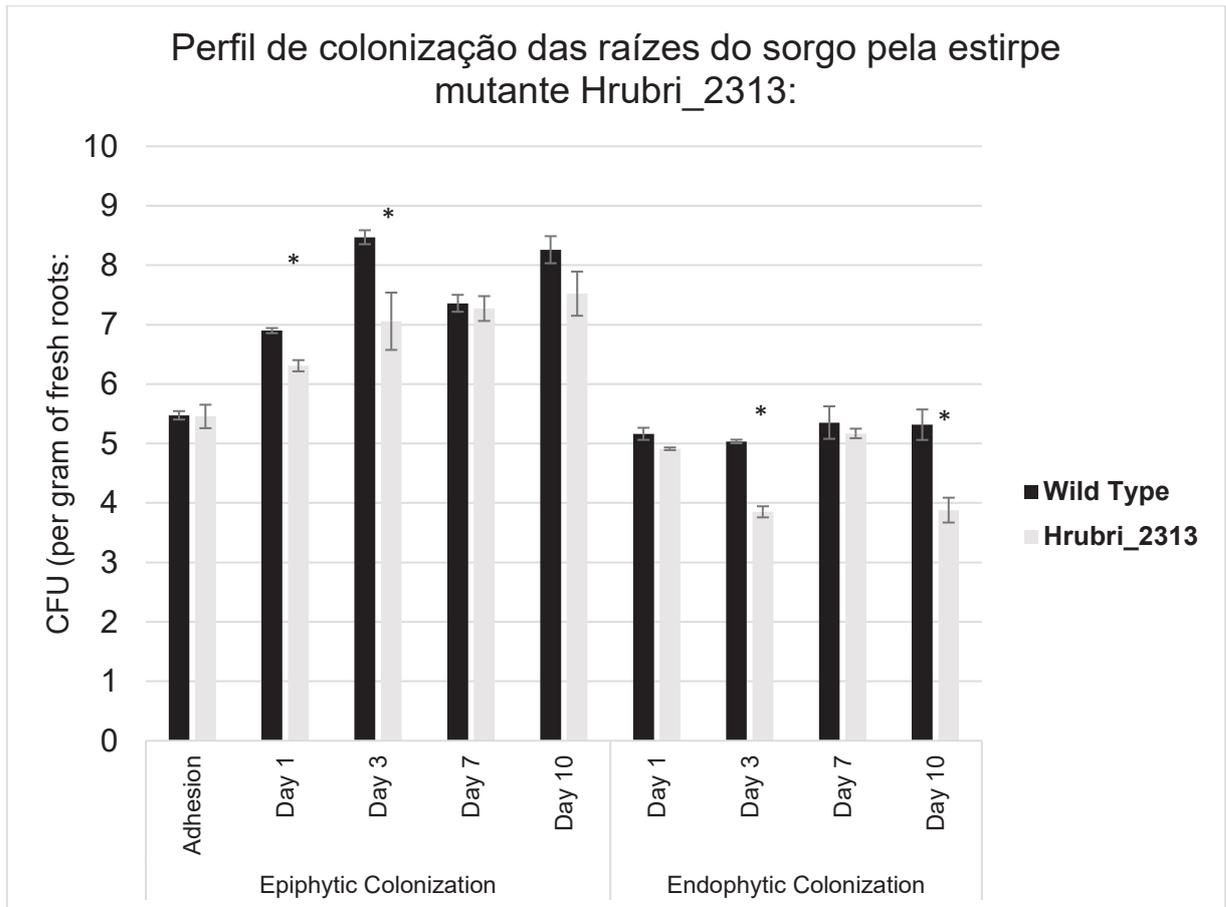


FIGURA 112S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2313. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

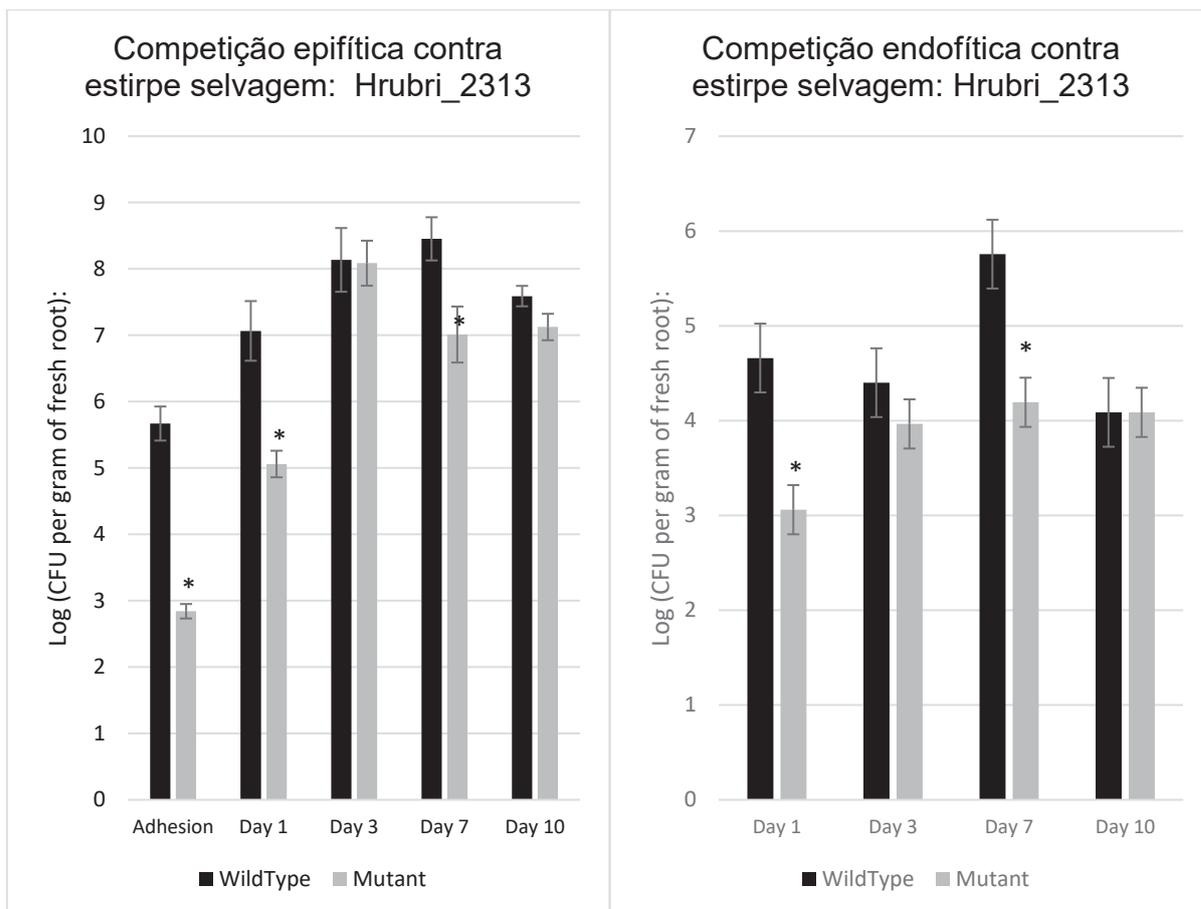


FIGURA 113S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2313 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

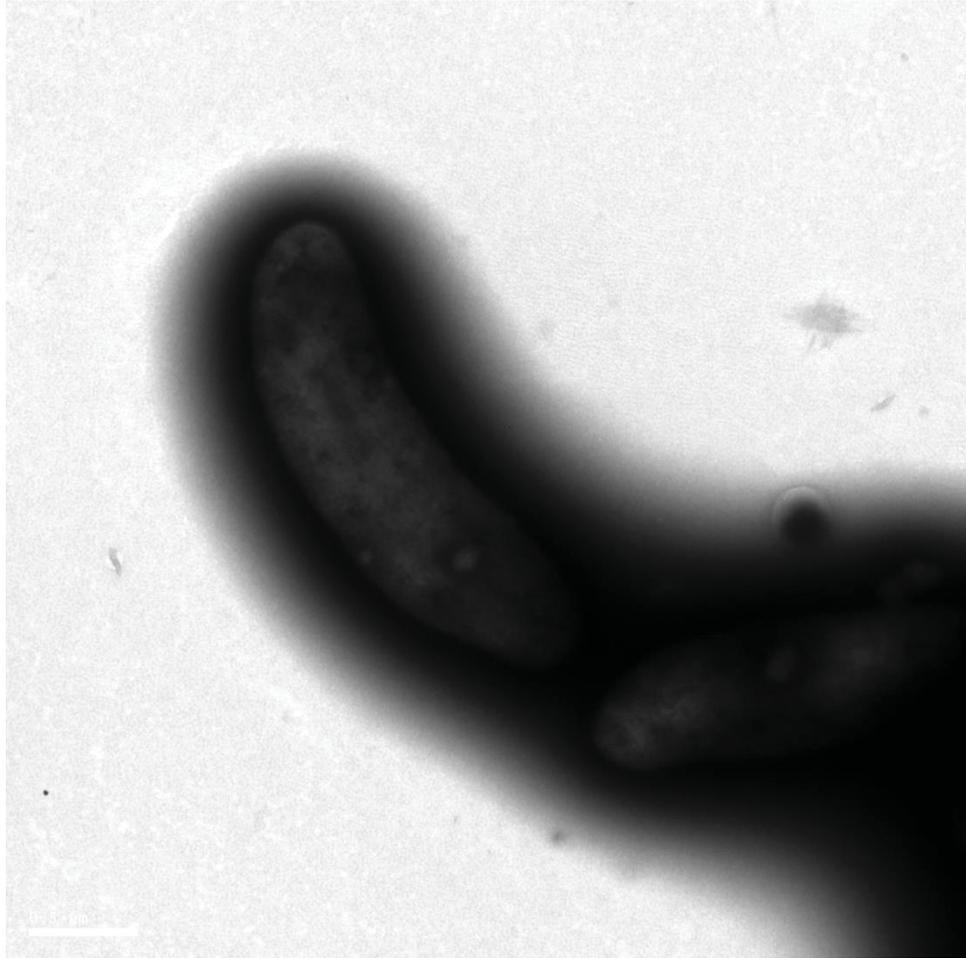


FIGURA 114S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_2313. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódio 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. Essa estirpe mutante apresentou marcante produção de muco em relação a estirpe selvagem. Não foi possível observar flagelos íntegros e as células sempre se dispuseram em grupos.

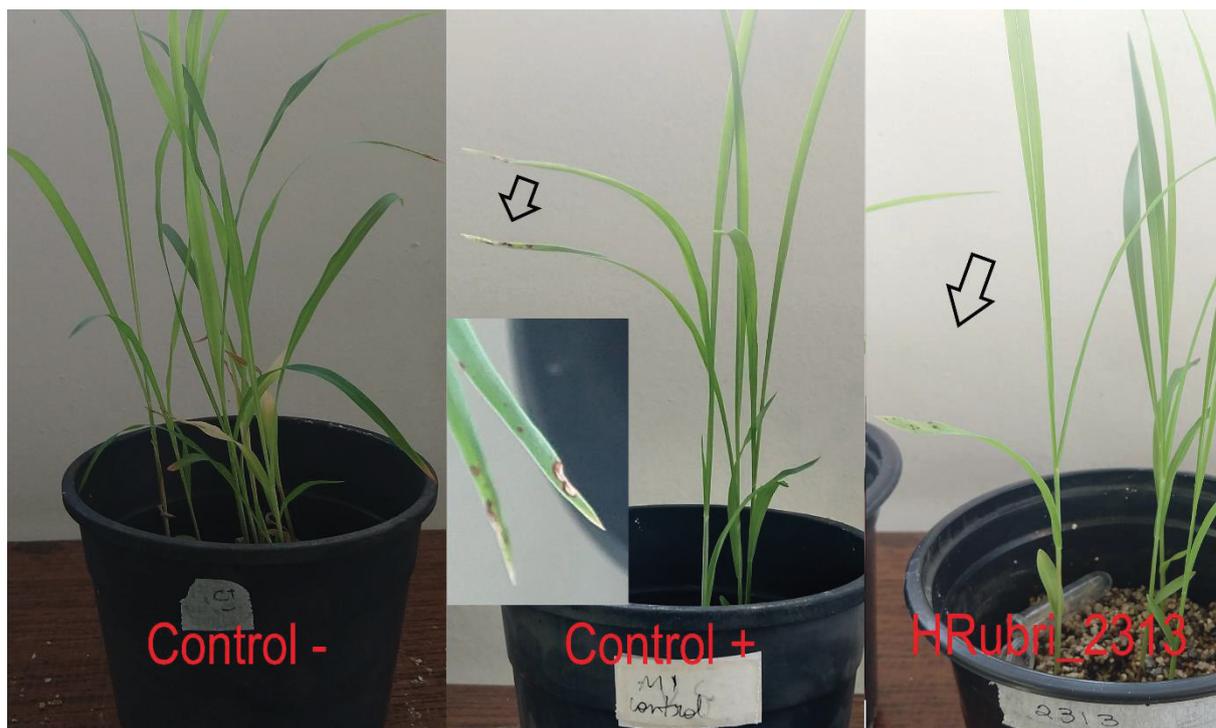


FIGURA 115S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2313. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2319

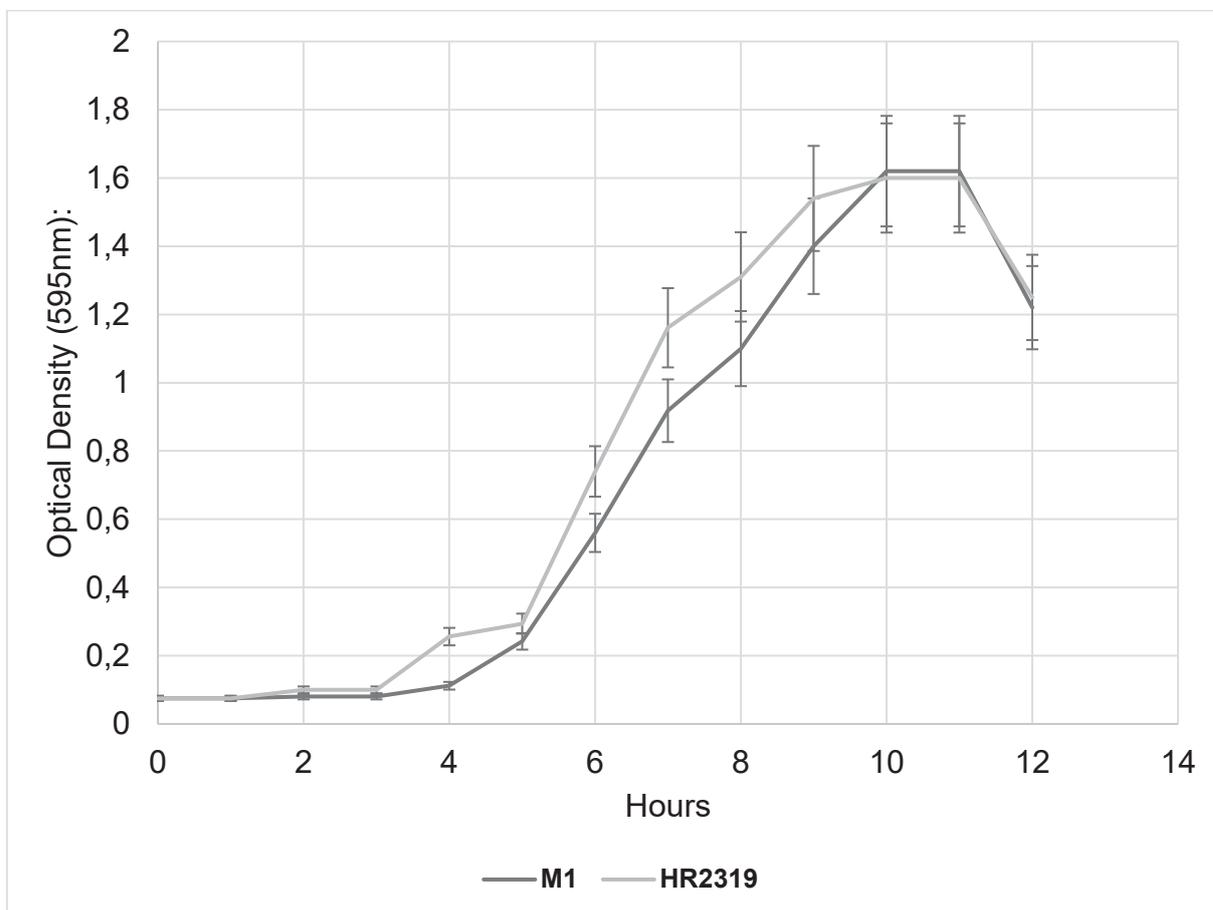


FIGURA 116S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2319. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

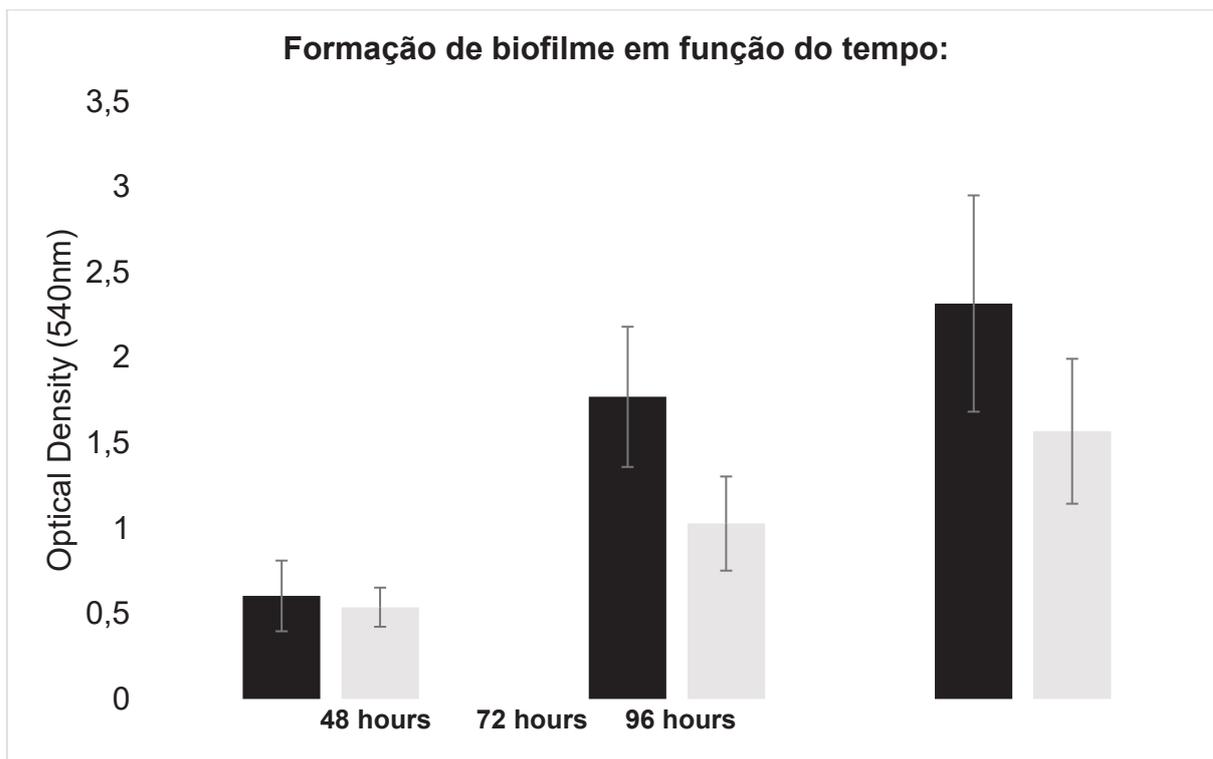


FIGURA 117S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_2319. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

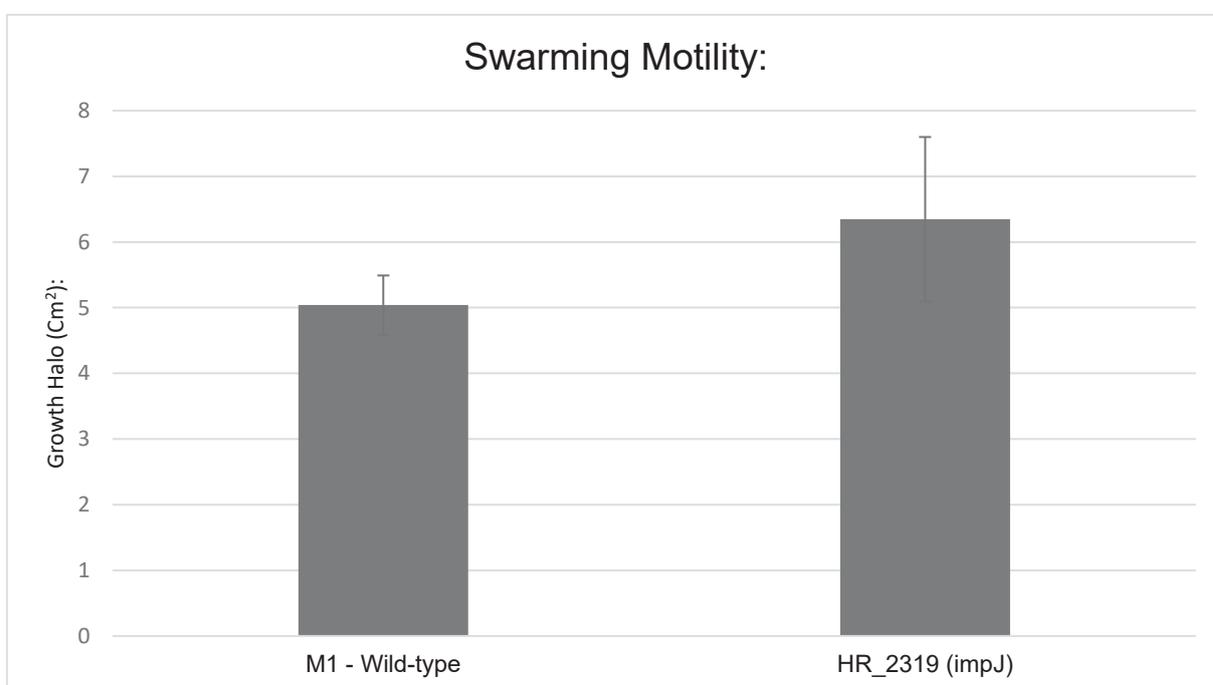


FIGURA 118S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2319. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

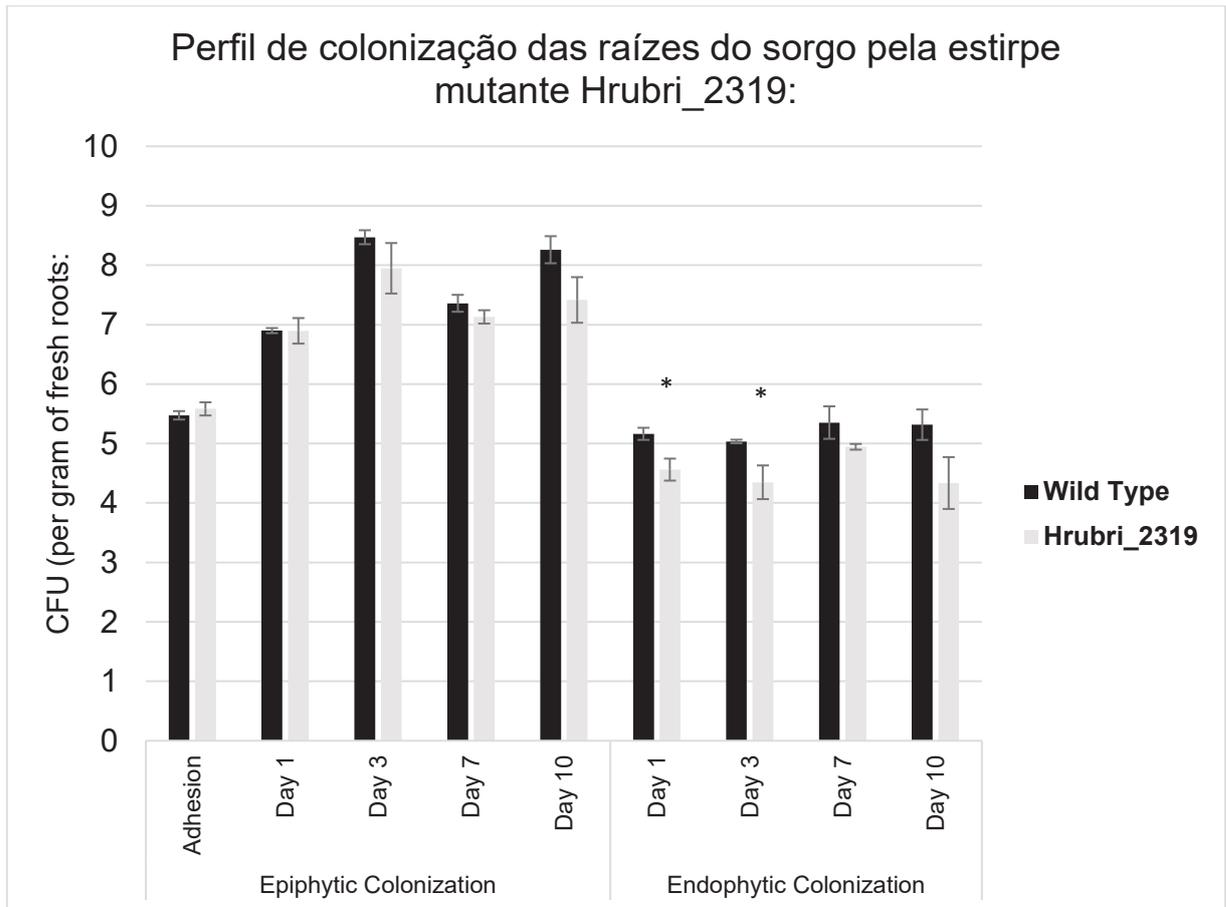


FIGURA 119S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2319. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

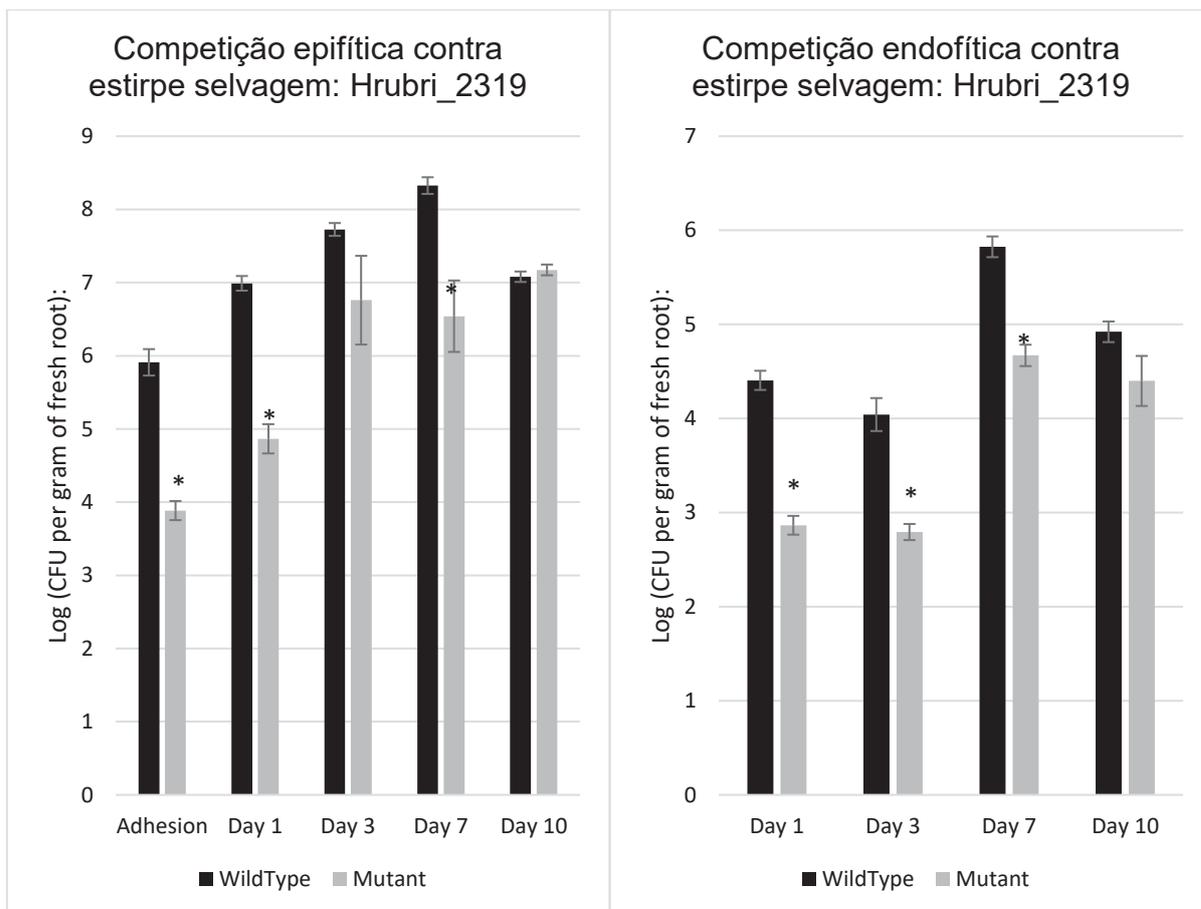


FIGURA 120S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2319 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

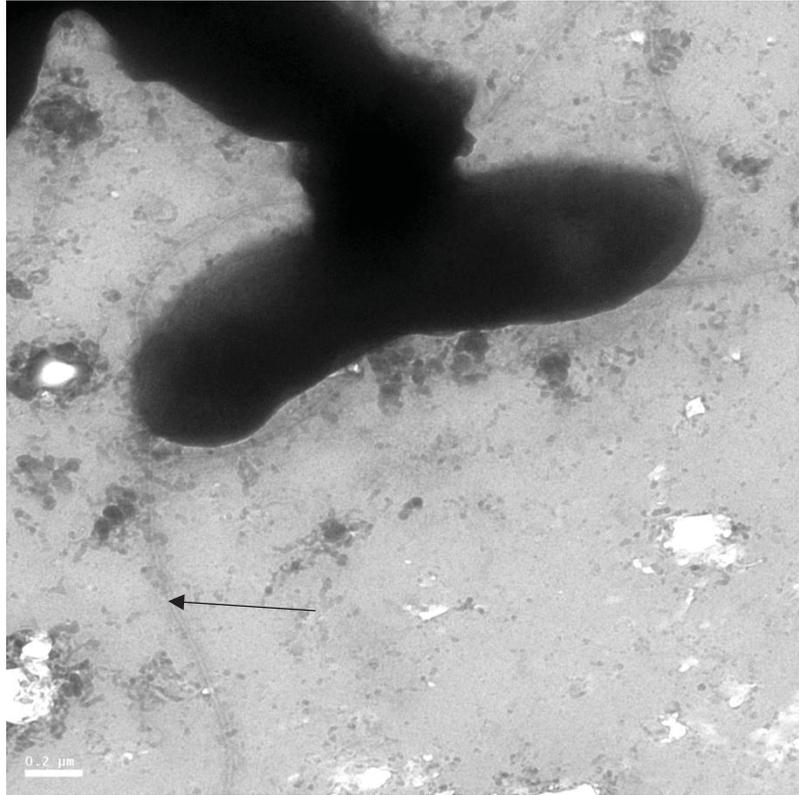


FIGURA 121S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_2319. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódio 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. Essa estirpe mutante não apresentou diferenças relação a estirpe selvagem. Foi possível observar flagelos íntegros (seta preta) e as células apresentaram leve tendência a se dispor em grupos.

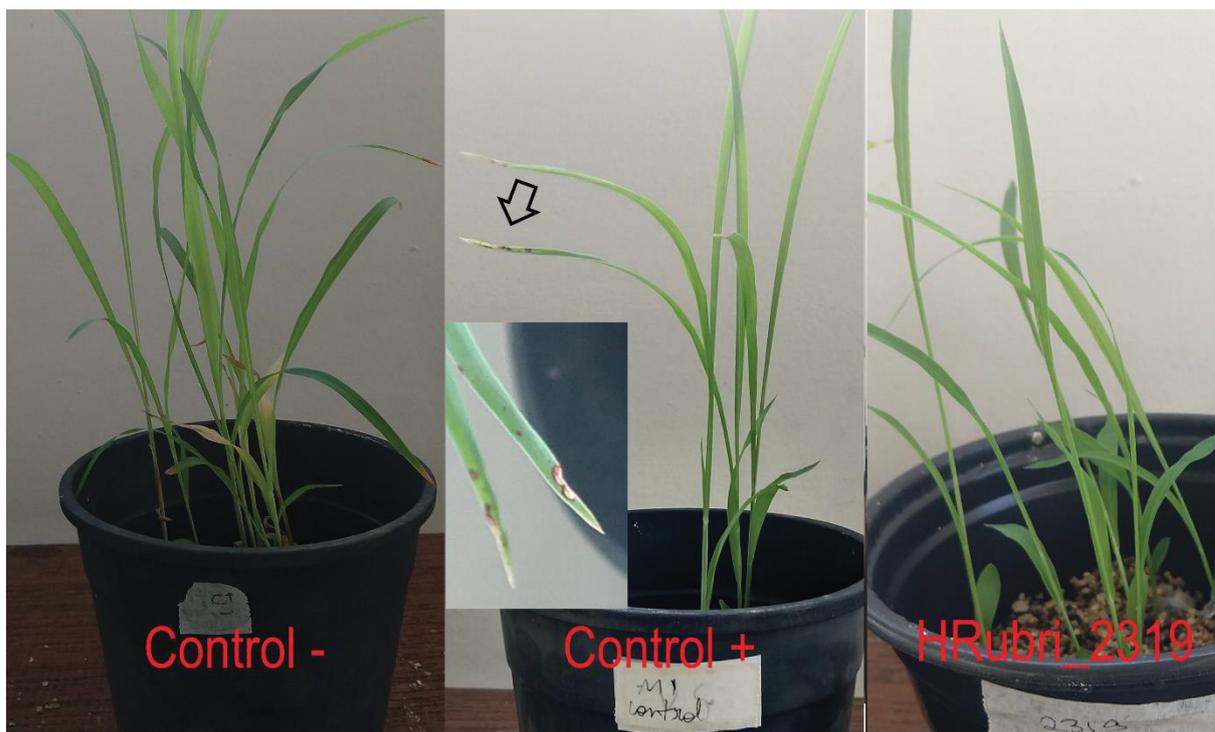


FIGURA 122S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2319. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_2320

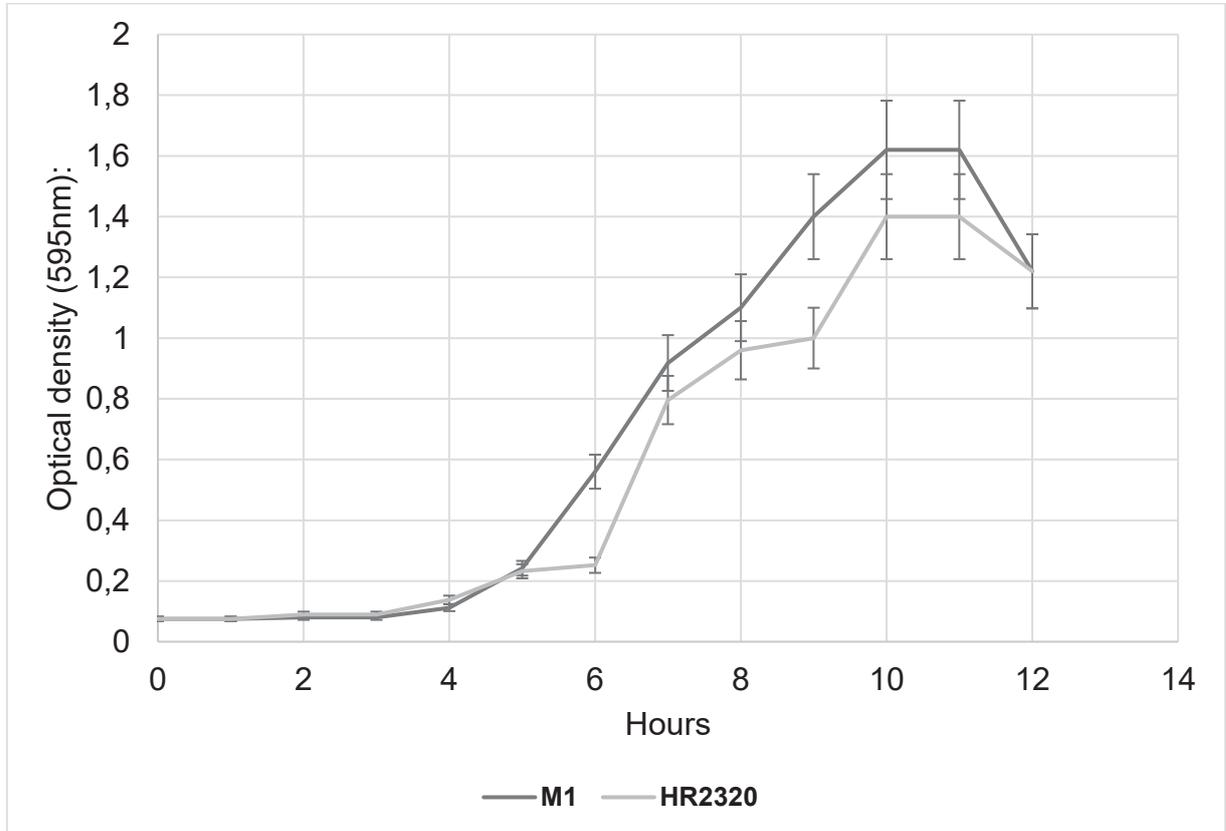


FIGURA 123S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_2320. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

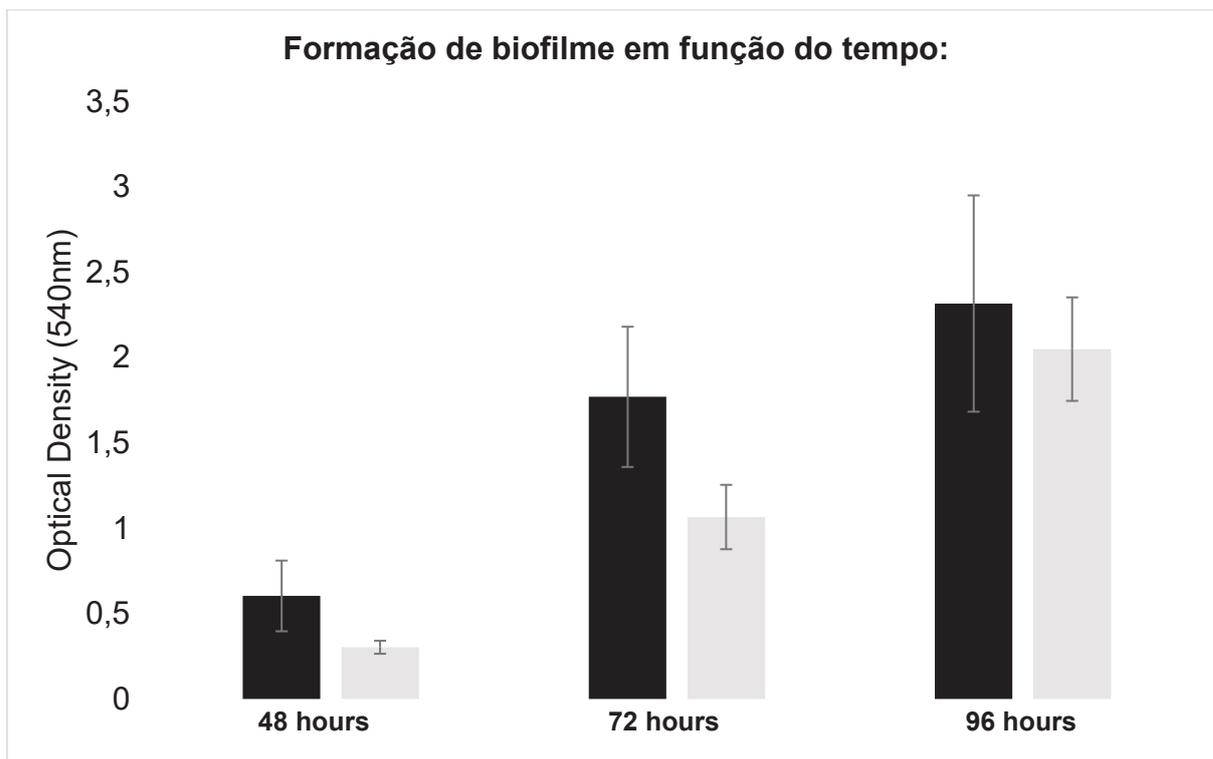


FIGURA 124S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_2320. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

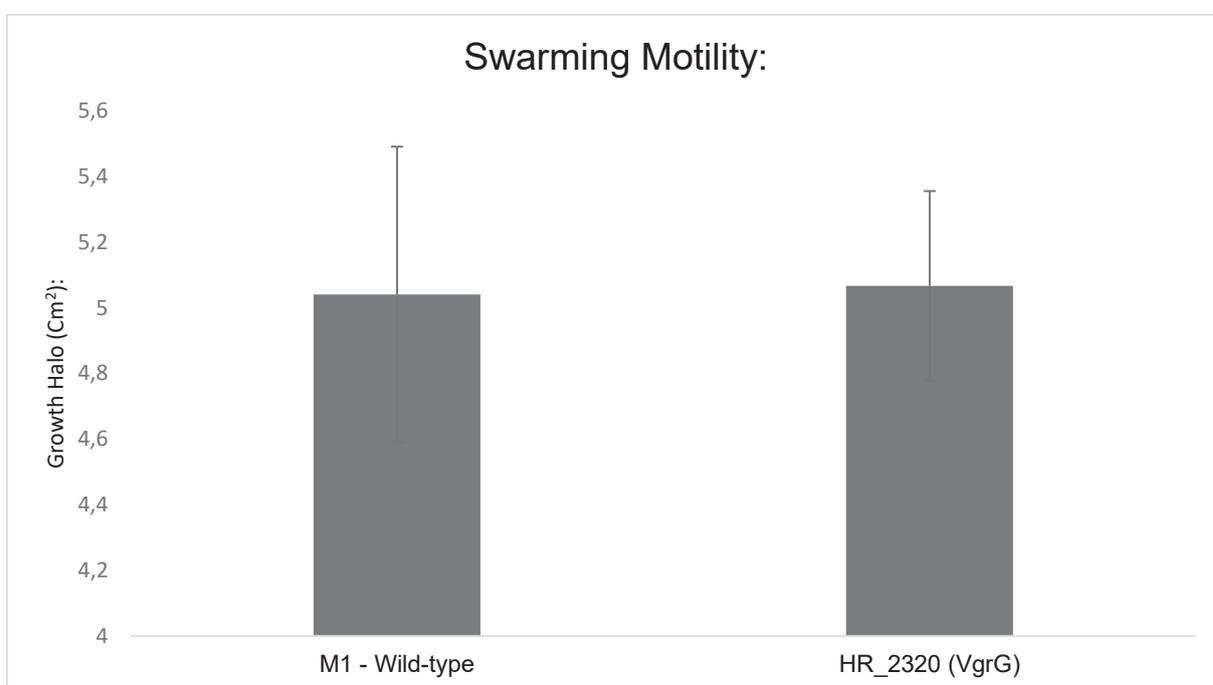


FIGURA 125S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_2320. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

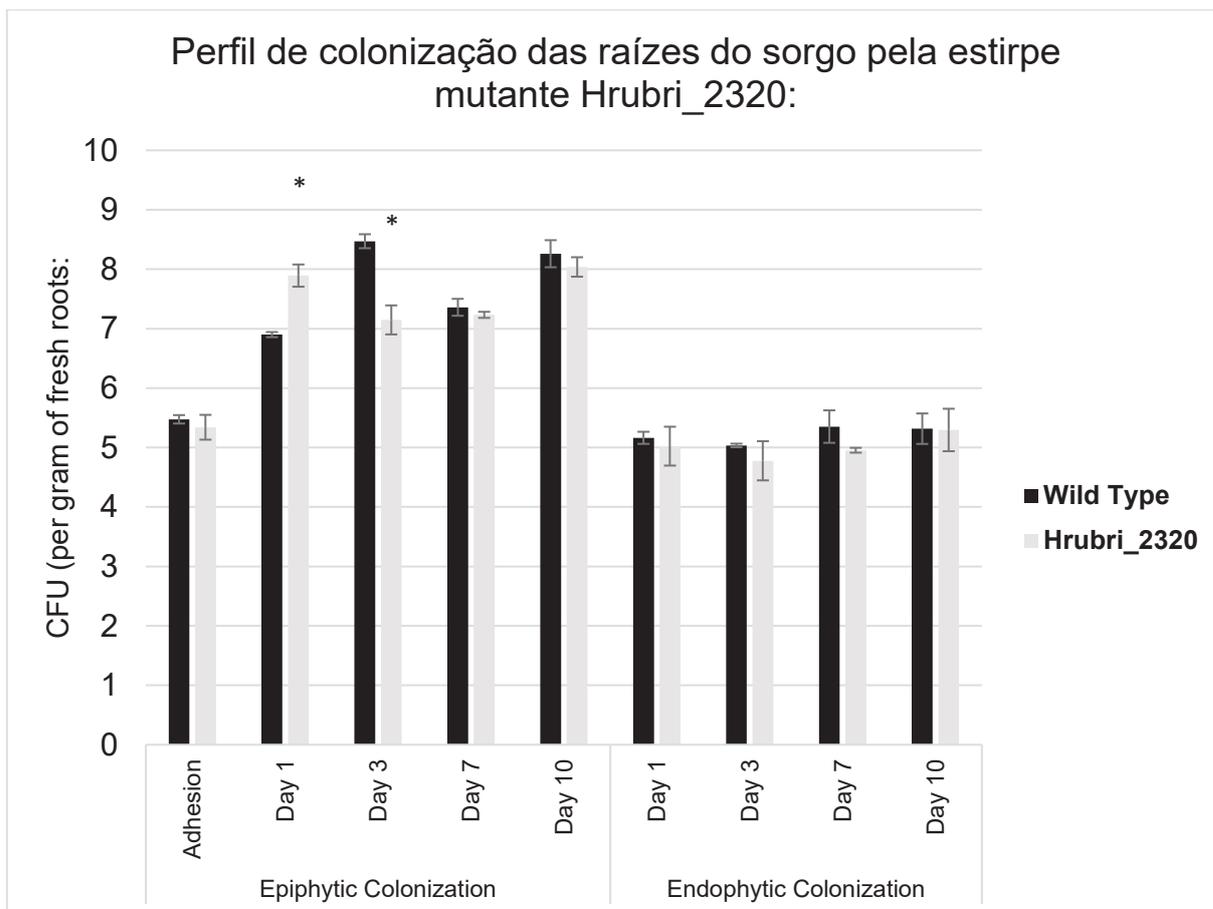


FIGURA 126S: Perfis de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_2320. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

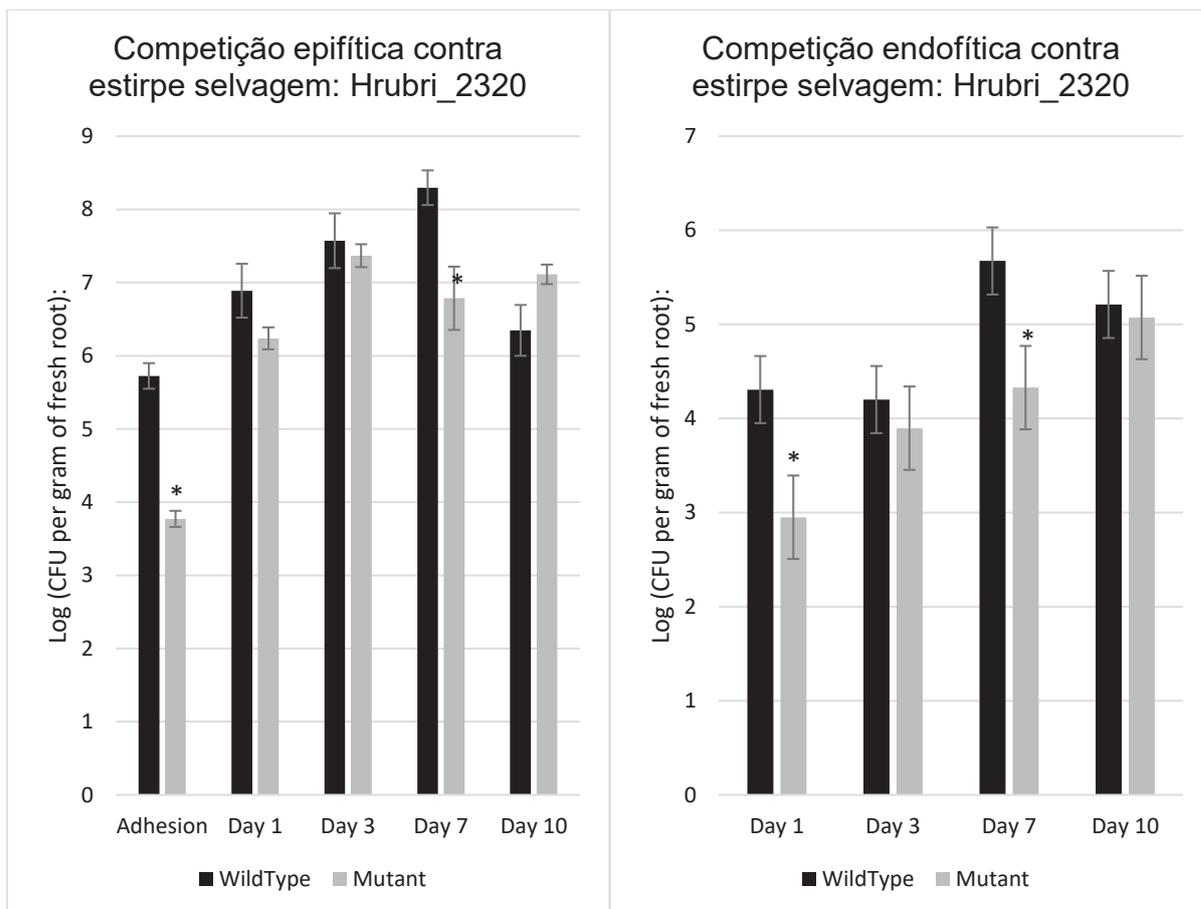


FIGURA 127S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_2320 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

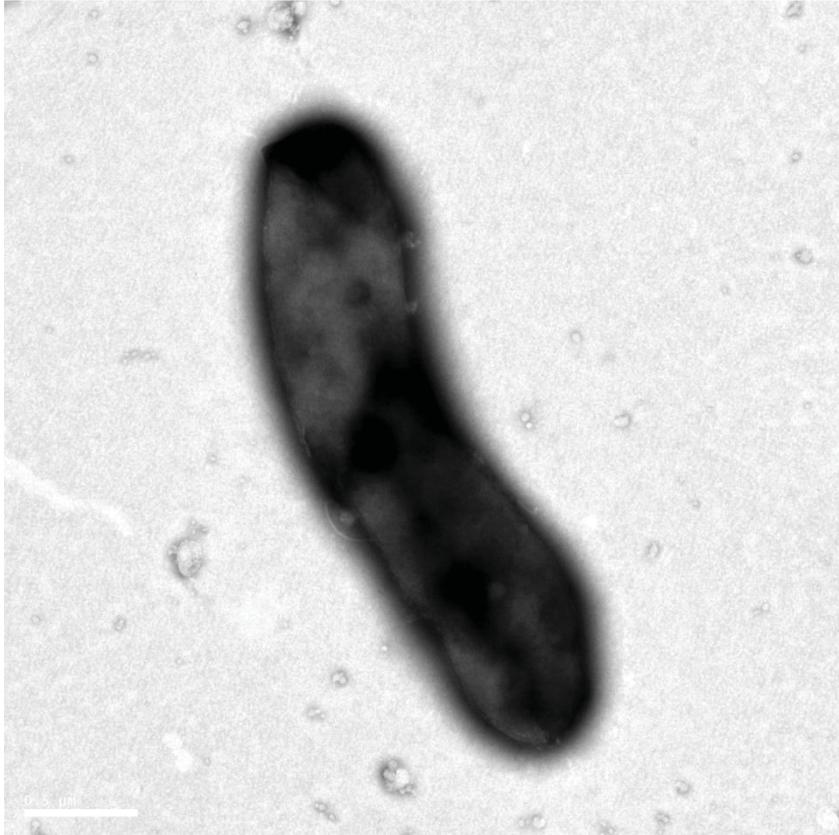


FIGURA 128S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_2320. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódio 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. Essa estirpe mutante não apresentou diferenças relação a estirpe selvagem. Não foi possível observar flagelos íntegros e as células apresentaram leve aumento na produção de muco.

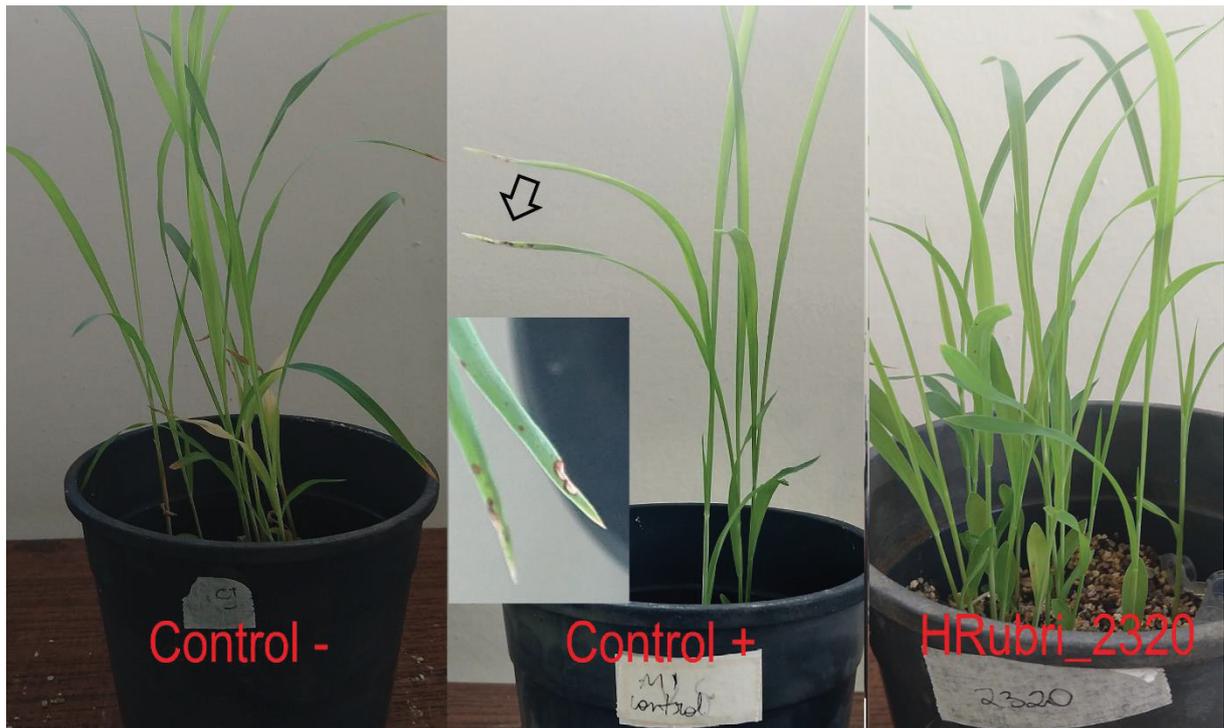


FIGURA 129S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_2320. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_3993

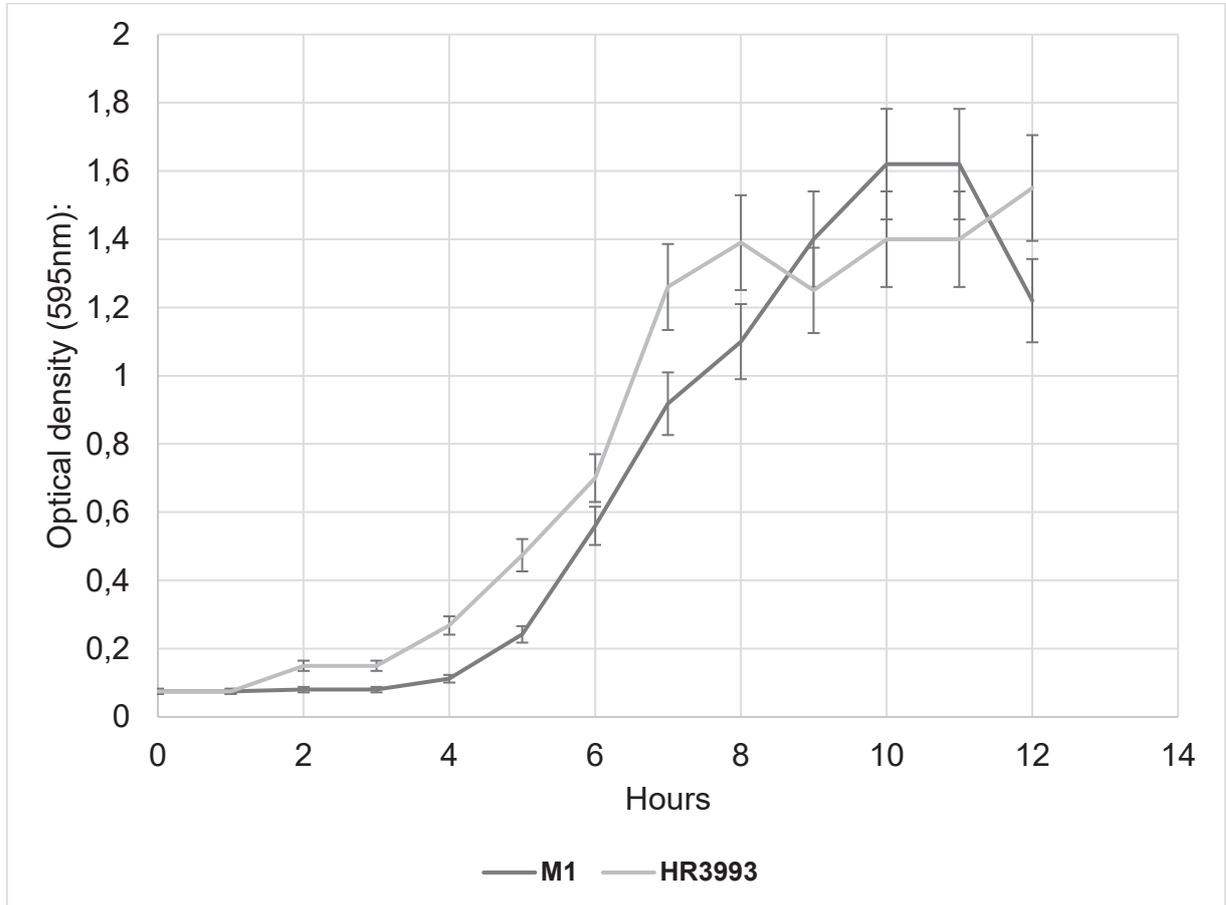


FIGURA 130S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_3993. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

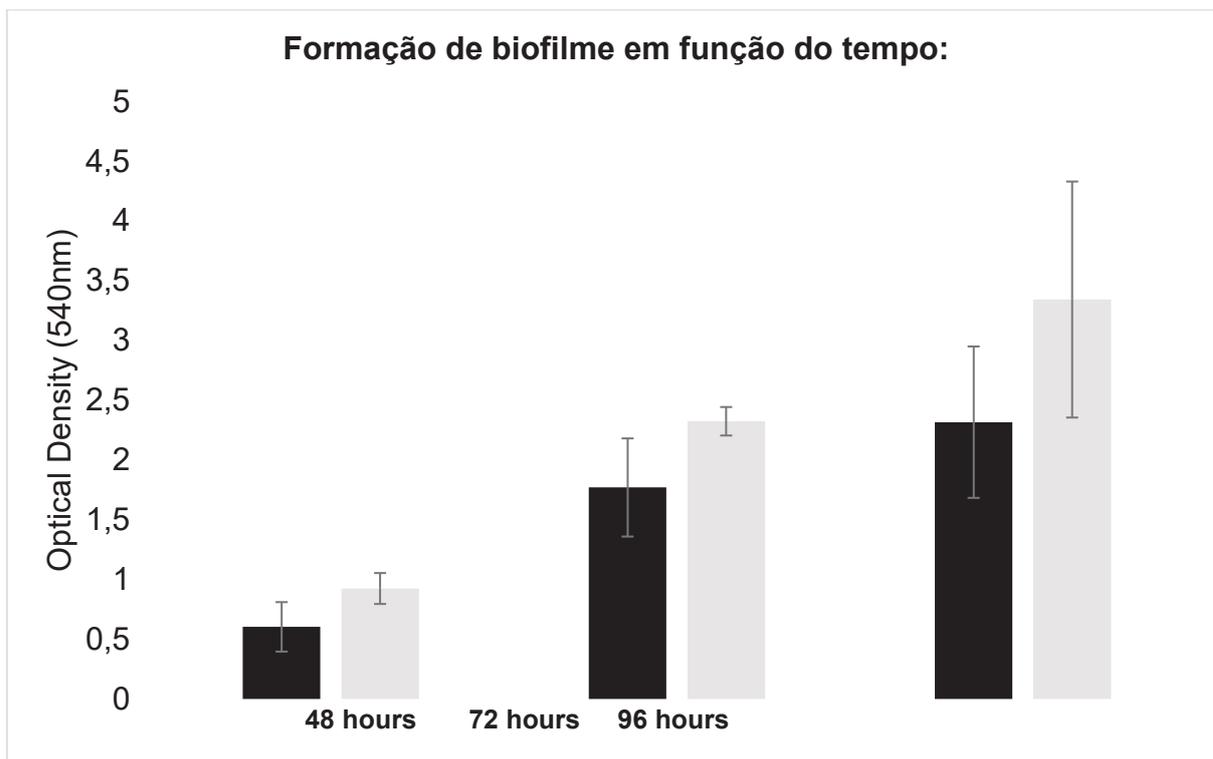


FIGURA 131S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_3993. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

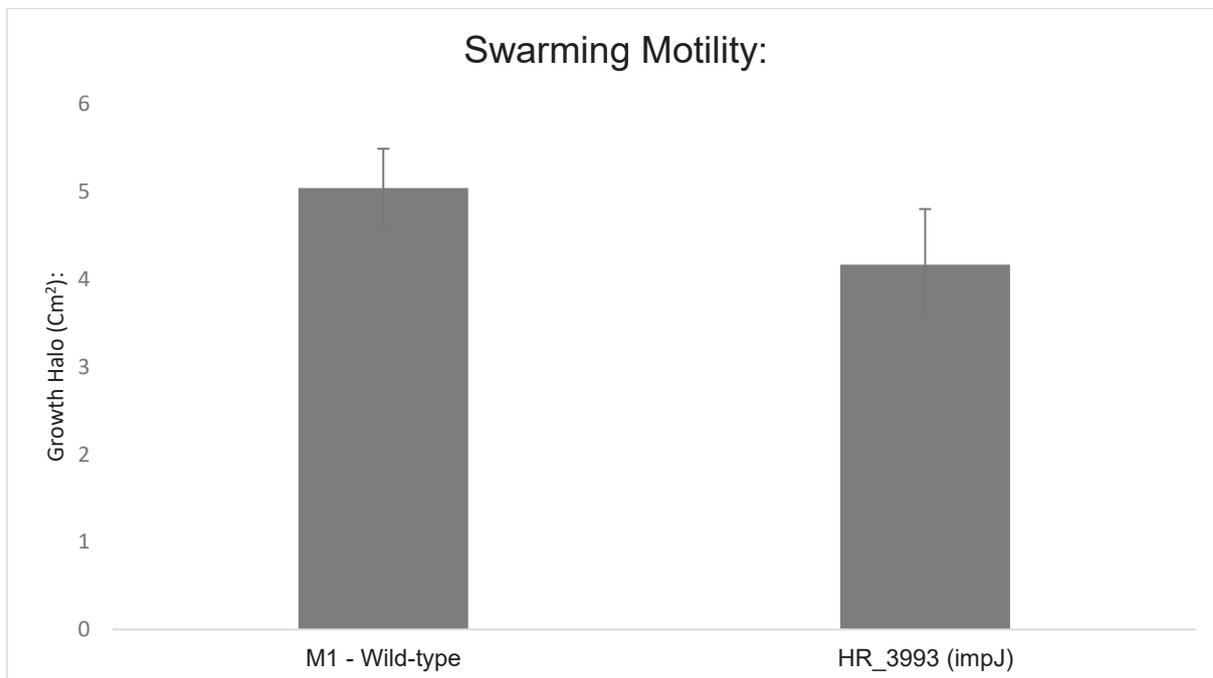


FIGURA 132S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_3993. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

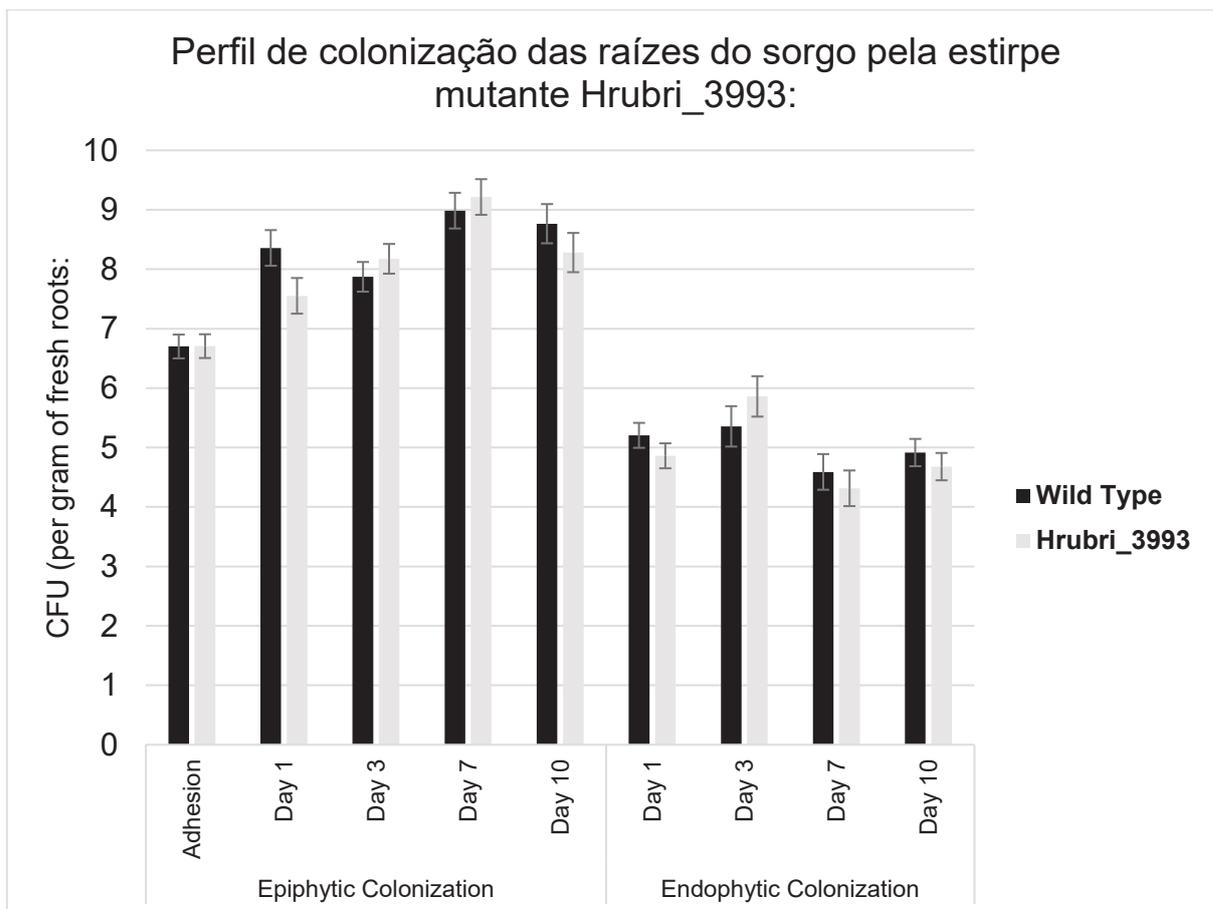


FIGURA 133S: Perfis de colonização epifítica e endofítica das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_3993. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

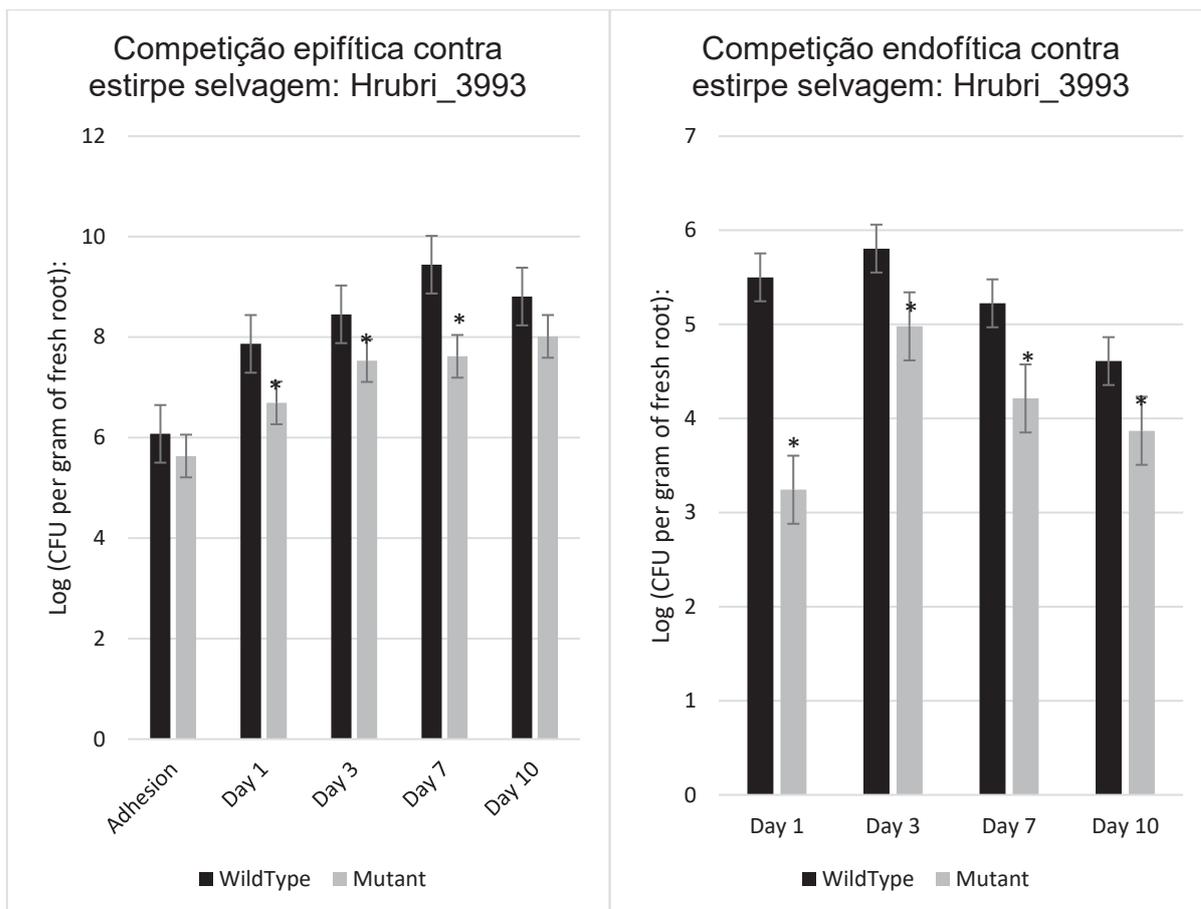


FIGURA 134S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_3993 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.



FIGURA 135S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_3993. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódio 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. Essa estirpe mutante não apresentou diferenças relação a estirpe selvagem. Não foi possível observar flagelos íntegros.

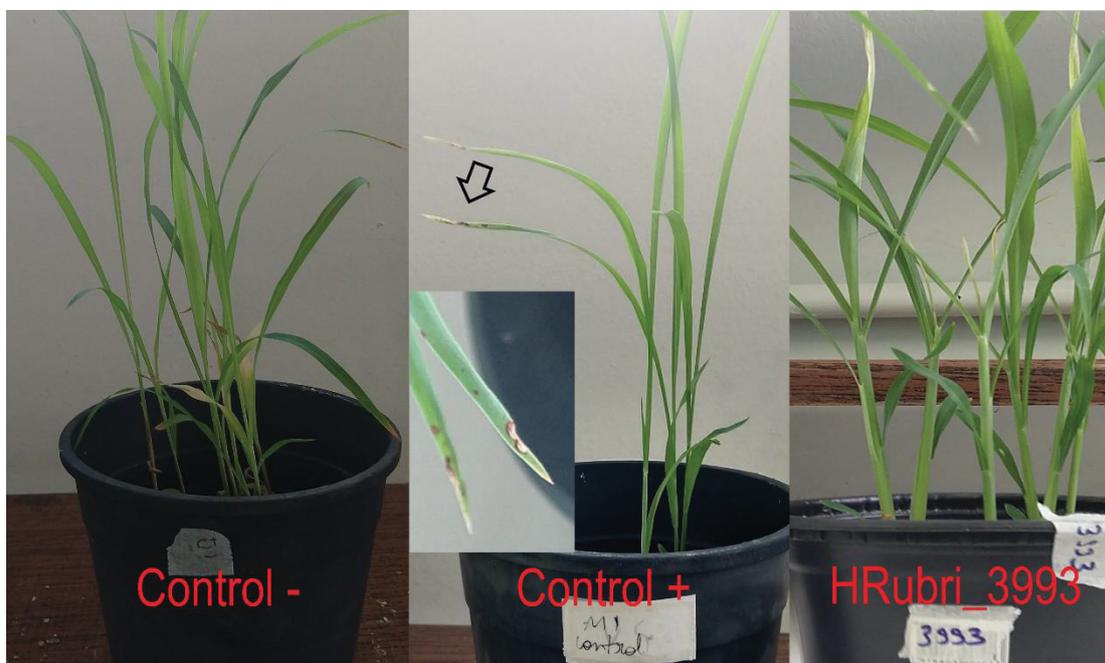


FIGURA 136S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_3993. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_3994

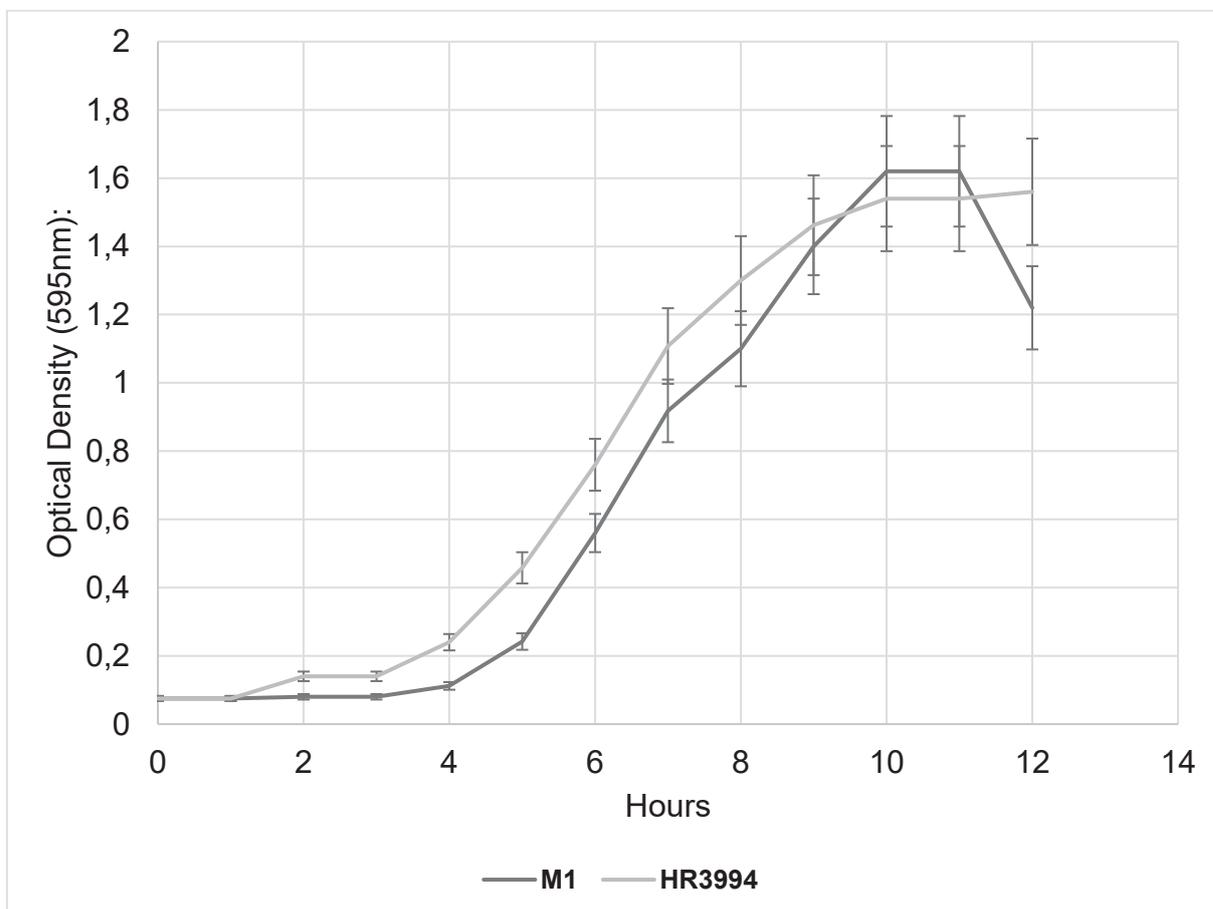


FIGURA 137S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_3994. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

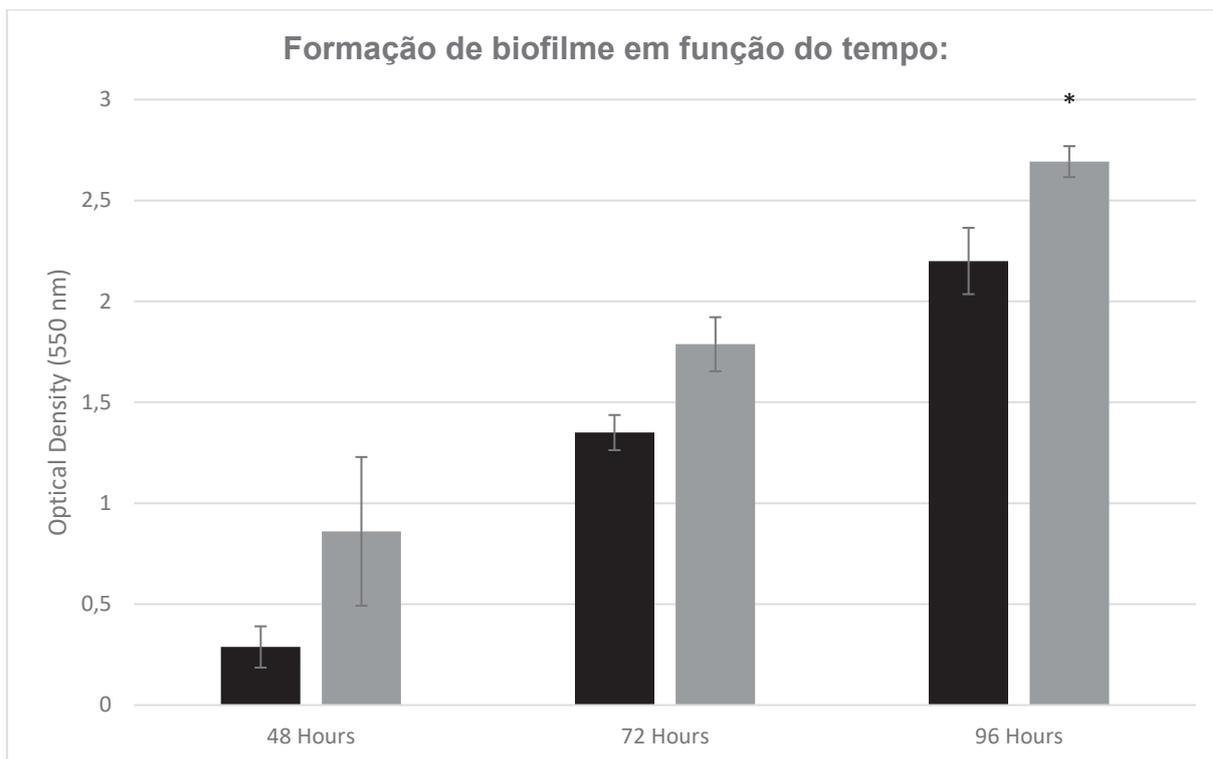


FIGURA 138S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_3994. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

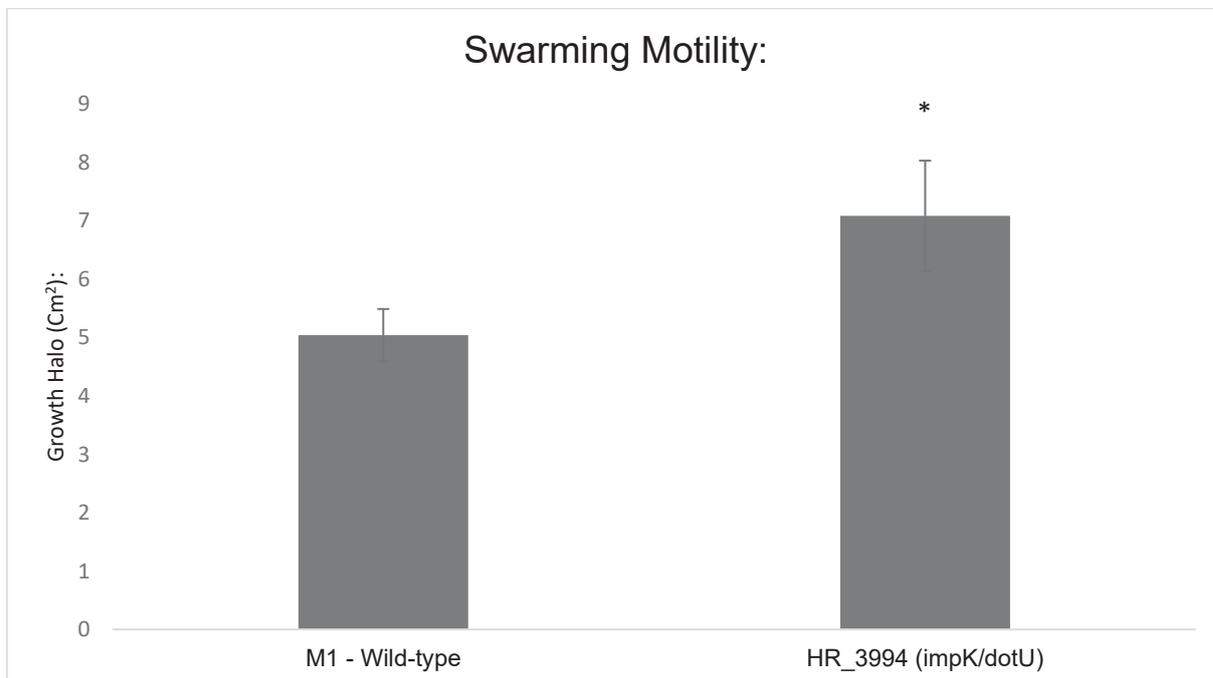


FIGURA 139S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_3994. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

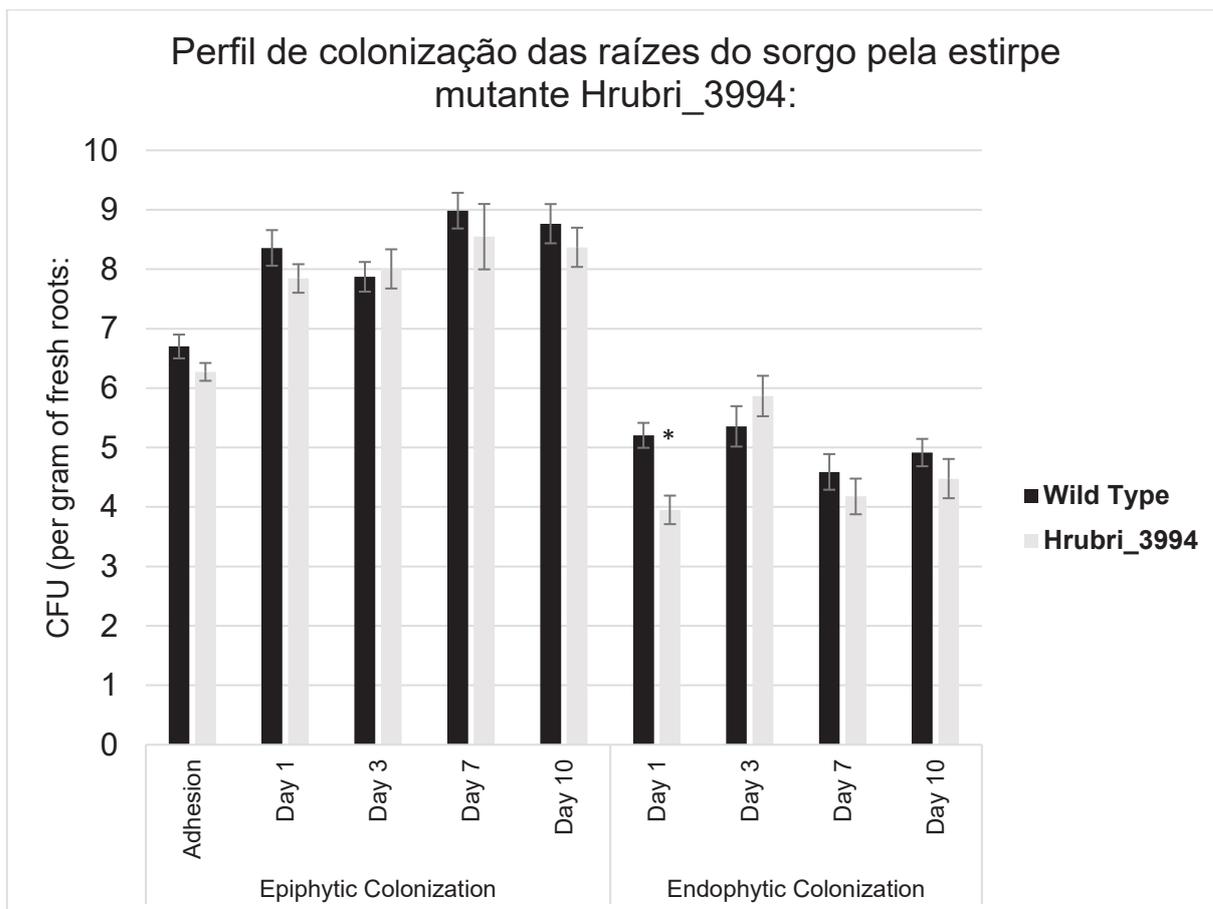


FIGURA 140S: Perfis de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_3994. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

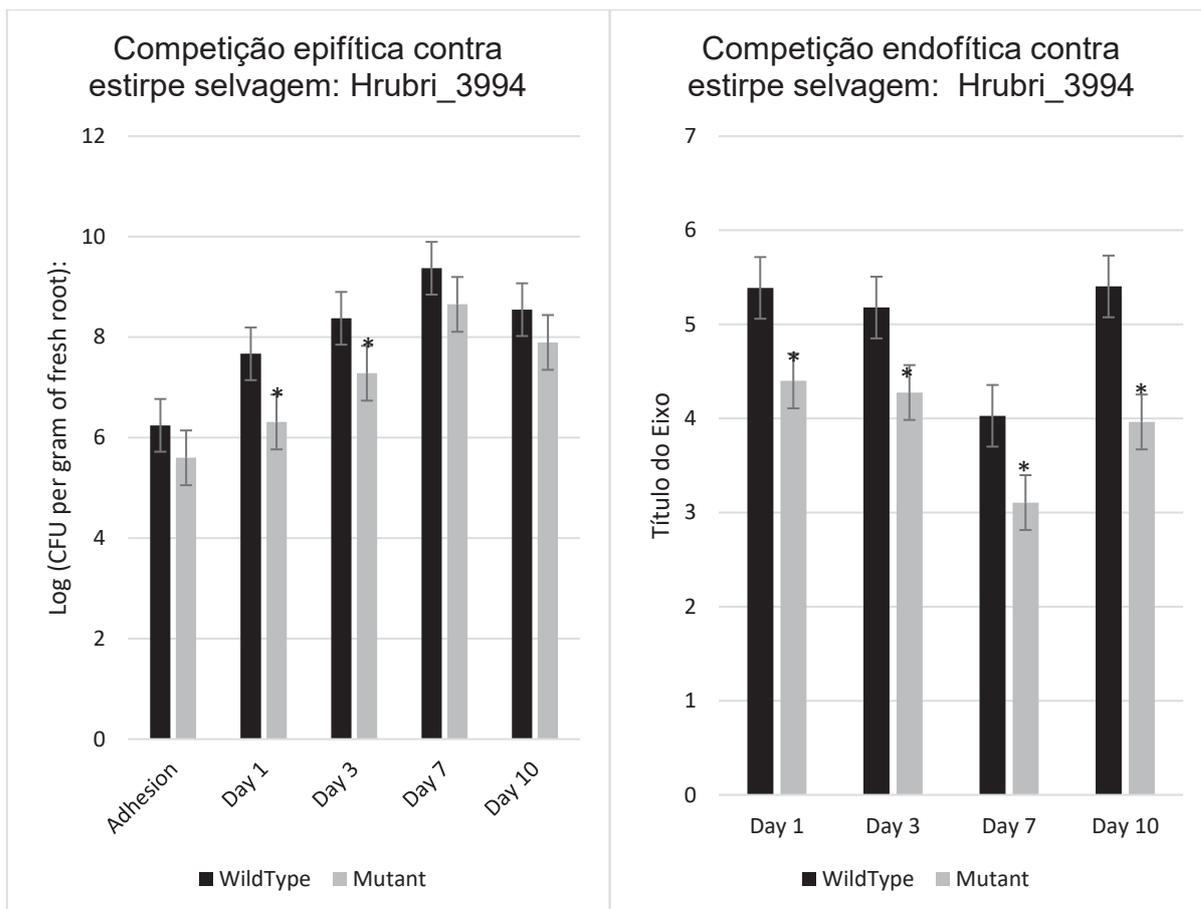


FIGURA 141S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_3994 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

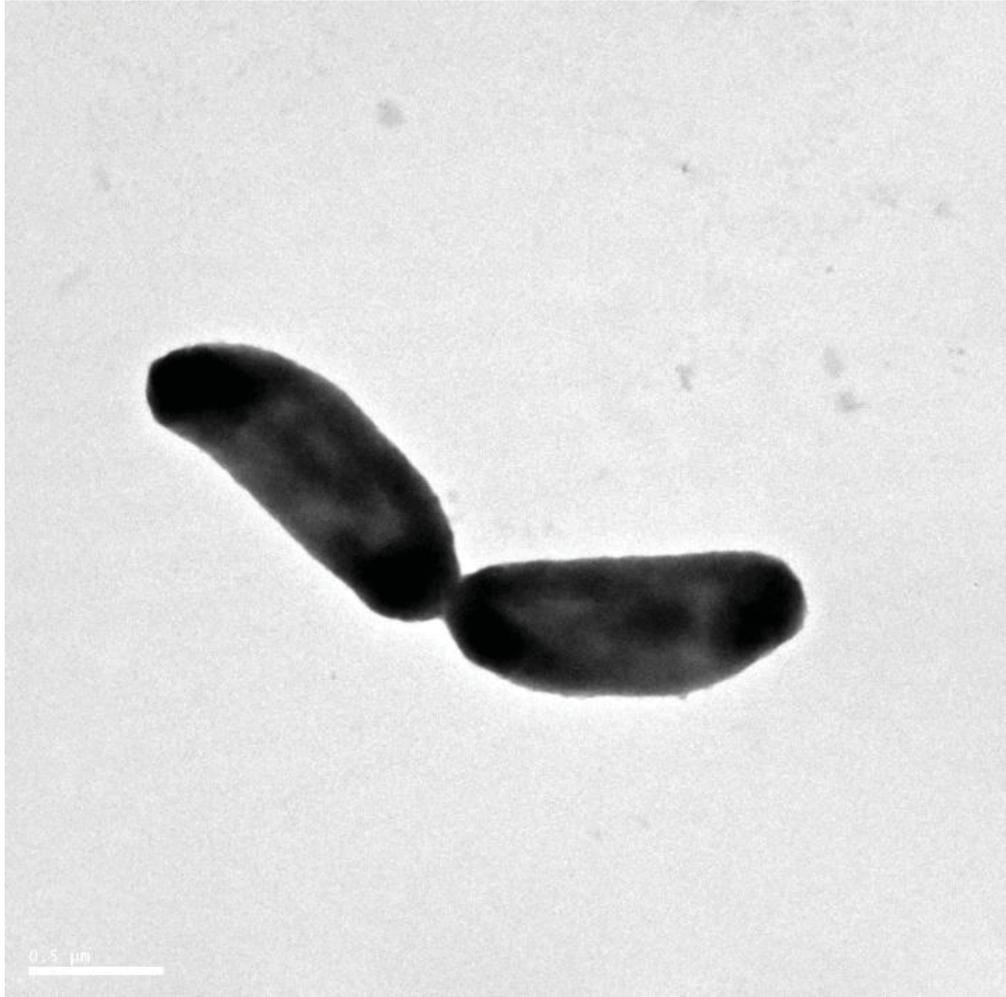


FIGURA 142S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_3994. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódio 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio. Essa estirpe mutante não apresentou diferenças relação a estirpe selvagem. Não foi possível observar flagelos íntegros.

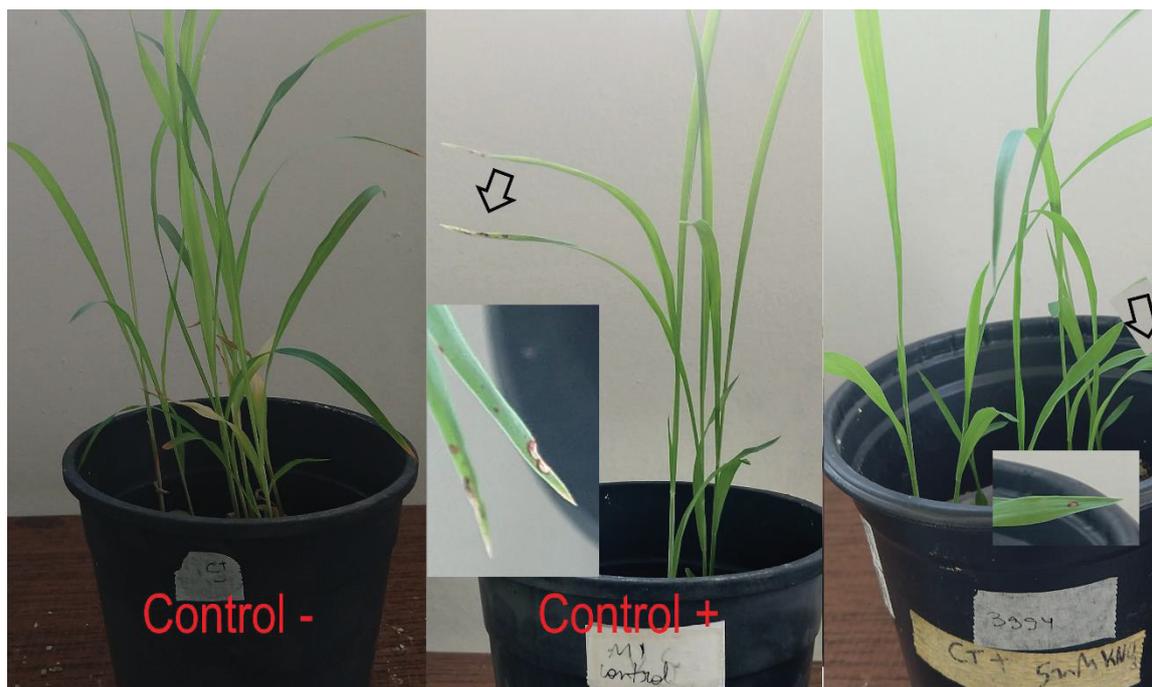


FIGURA 143S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_3994. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.

Material suplementar referente a estirpe mutante Hrubri_3995

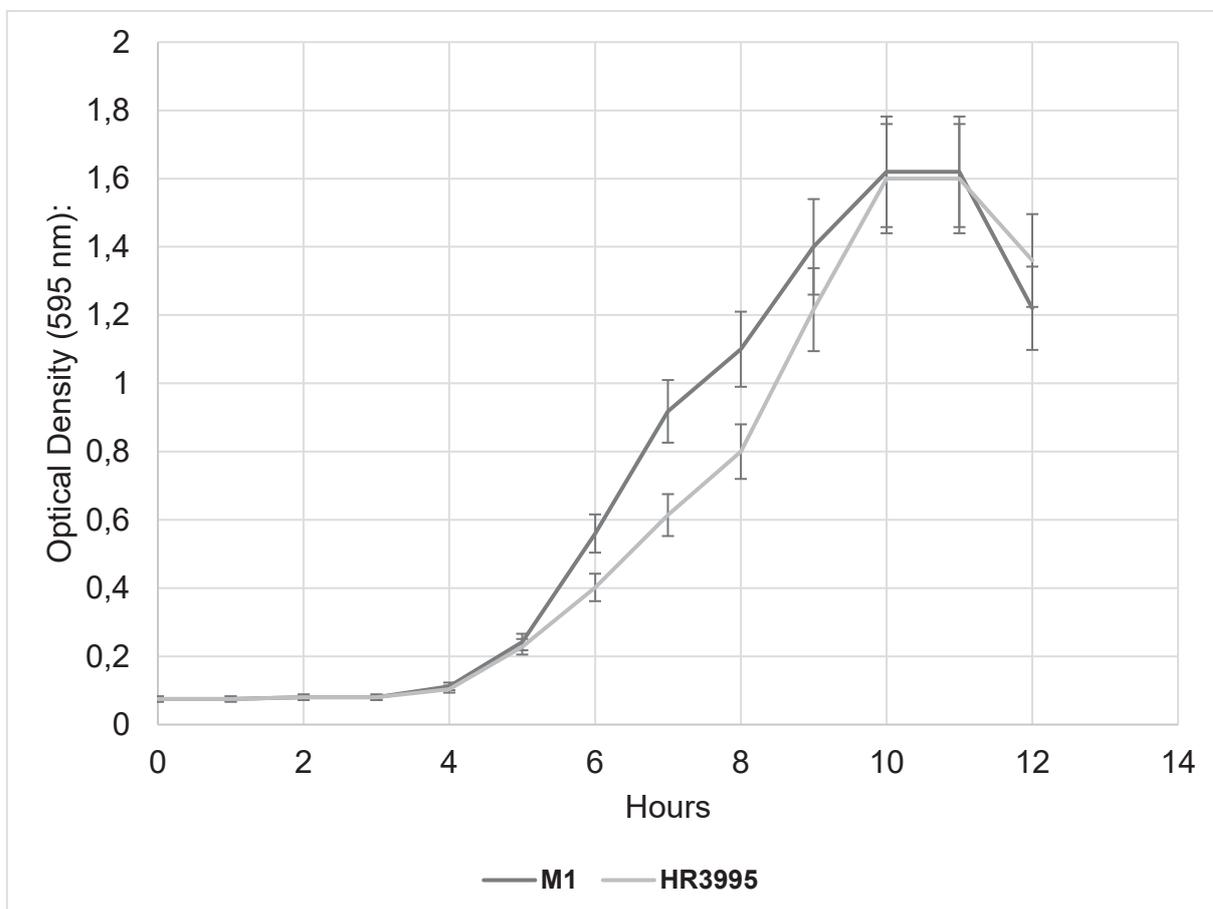


FIGURA 144S: Curva de crescimento estirpe Hrubri_3995. Estirpes crescidas em meio NfB malato suplementado. As alíquotas foram tomadas em intervalos de 1 hora em triplicata e sua D.O.₅₉₅ verificada.

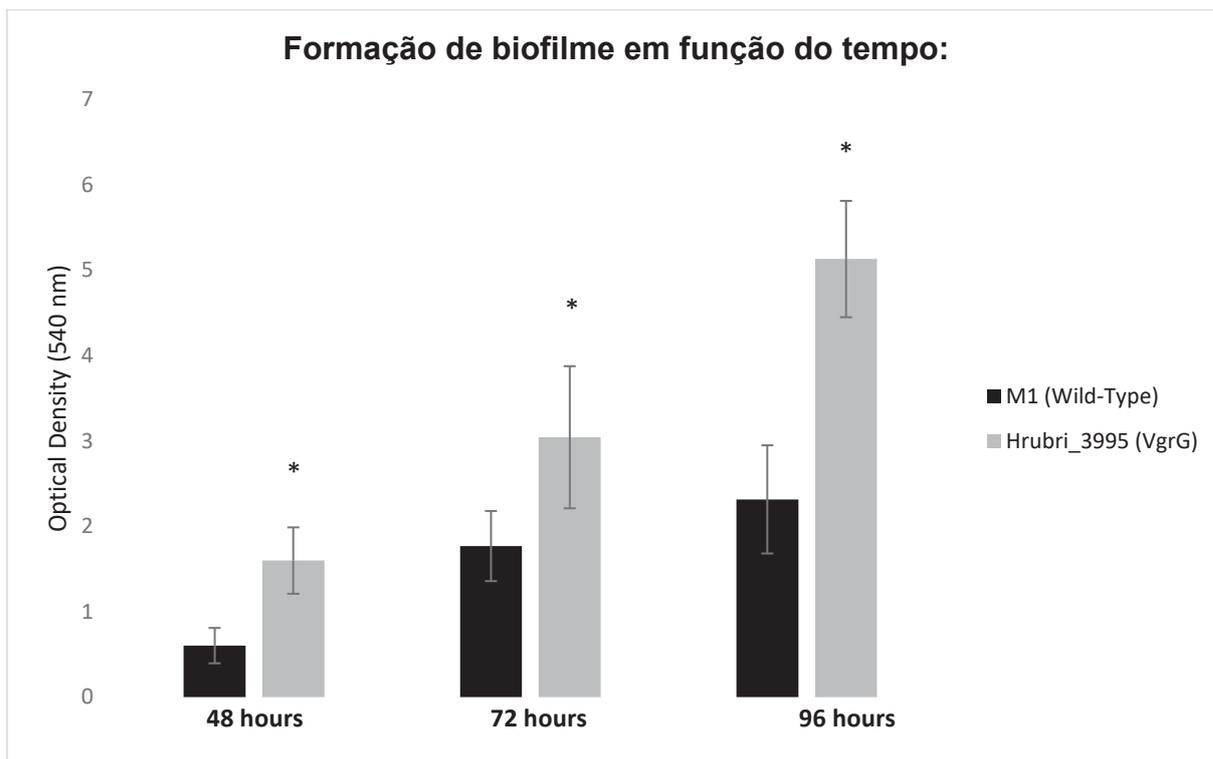


FIGURA 145S: Formação de biofilme em função do tempo da estirpe Hrubri_3995. Barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara o mutante em questão. Ensaio realizado 3 vezes, (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

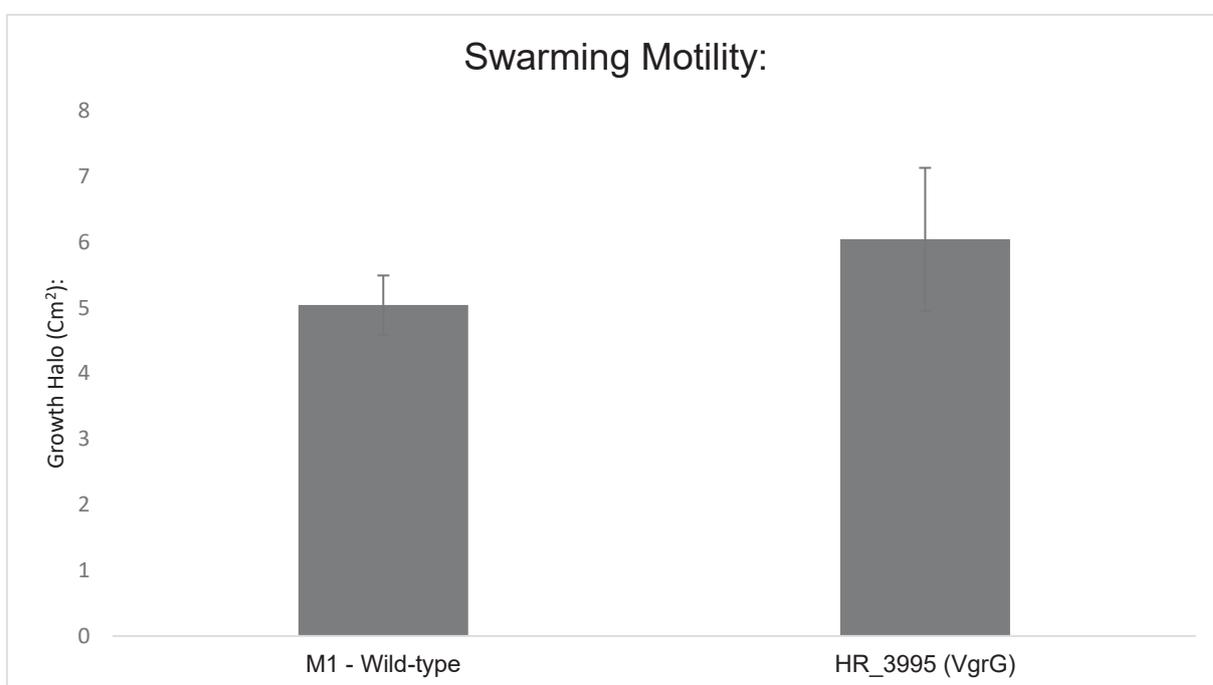


FIGURA 146S: Ensaio de motilidade da estirpe Hrubri_3995. Aqui temos a motilidade tipo “swarming” feita em 0,3% de ágar. A barra da esquerda representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 (controle) e a direita temos a barra do mutante. O halo de crescimento é avaliado em 48 horas (swarming). Experimento feito em três triplicatas. (*) representa significância estatística com $p < 0,05$.

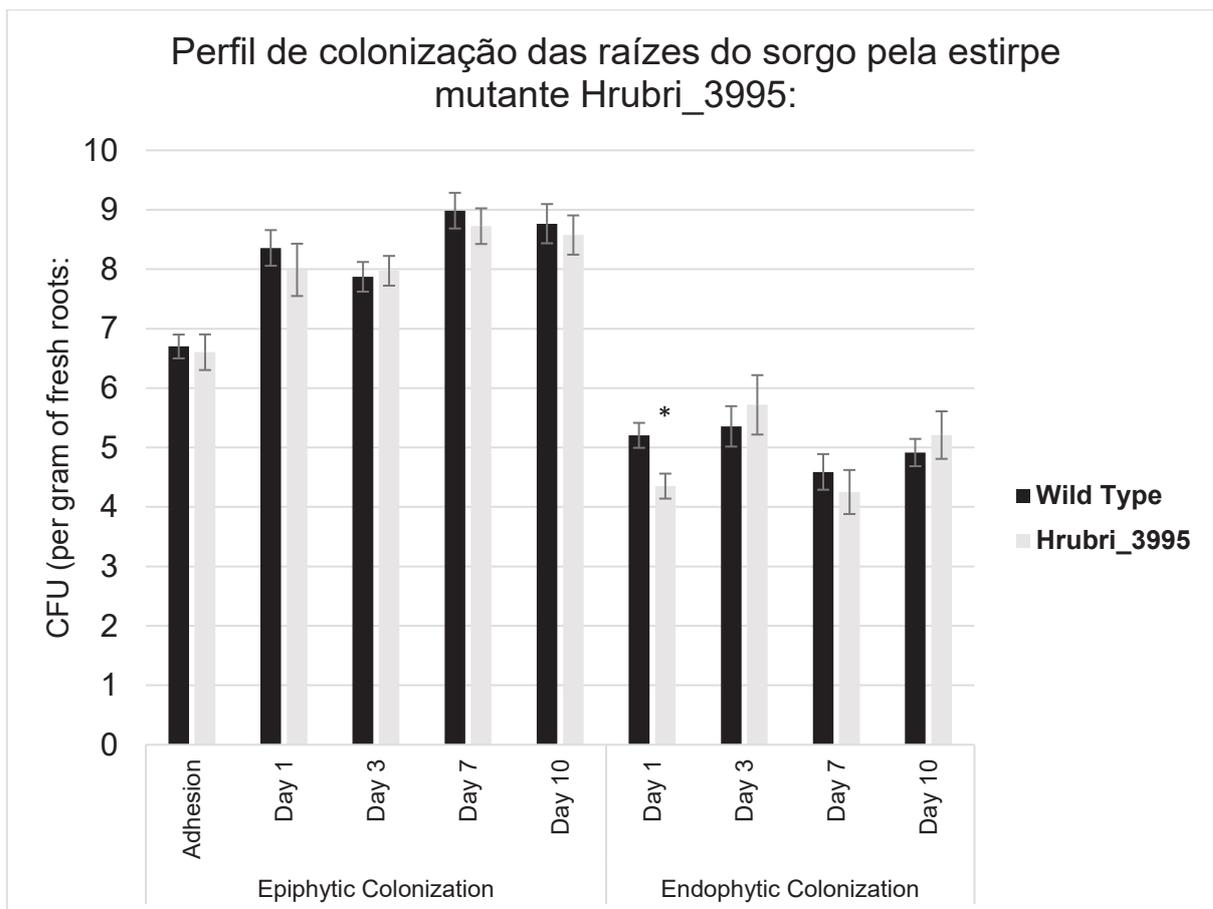


FIGURA 147S: Perfis de colonização epifítico e endofítico das raízes de *Sorghum bicolor* pela estirpe Hrubri_3995. Ensaio conduzido em cinco triplicatas. A barra escura representa a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e a barra clara representa a estirpe mutante. Avaliamos a colonização epifítica no tempo zero (adesão) e nos dias 1, 3, 7 e 10 e a colonização endofítica nos dias 1, 3, 7 e 10. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student.

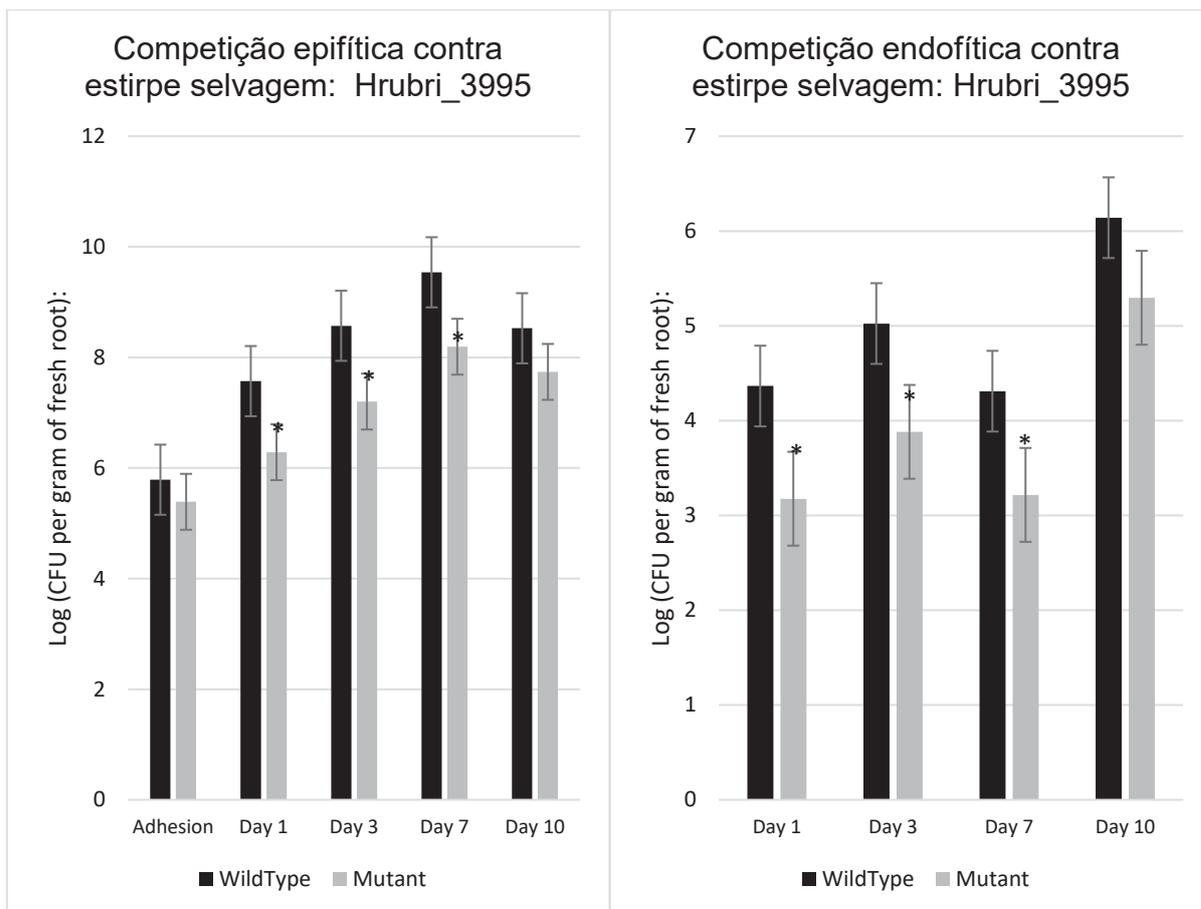


FIGURA 148S: Competição entre a estirpe selvagem de *H. rubrisubalbicans* M1 e o mutante Hrubri_3995 durante a colonização das raízes de *Sorghum bicolor*. No gráfico da esquerda temos a competição durante a colonização epifítica e na direita temos a competição durante a colonização endofítica. A barra escura representa a estirpe selvagem e a clara a estirpe mutante, o resultado é a combinação do par de barras. Experimento conduzido em três triplicatas. (*) é adicionado para $p < 0,05$ em teste T-student em relação a barra da estirpe mutante para o mesmo dia.

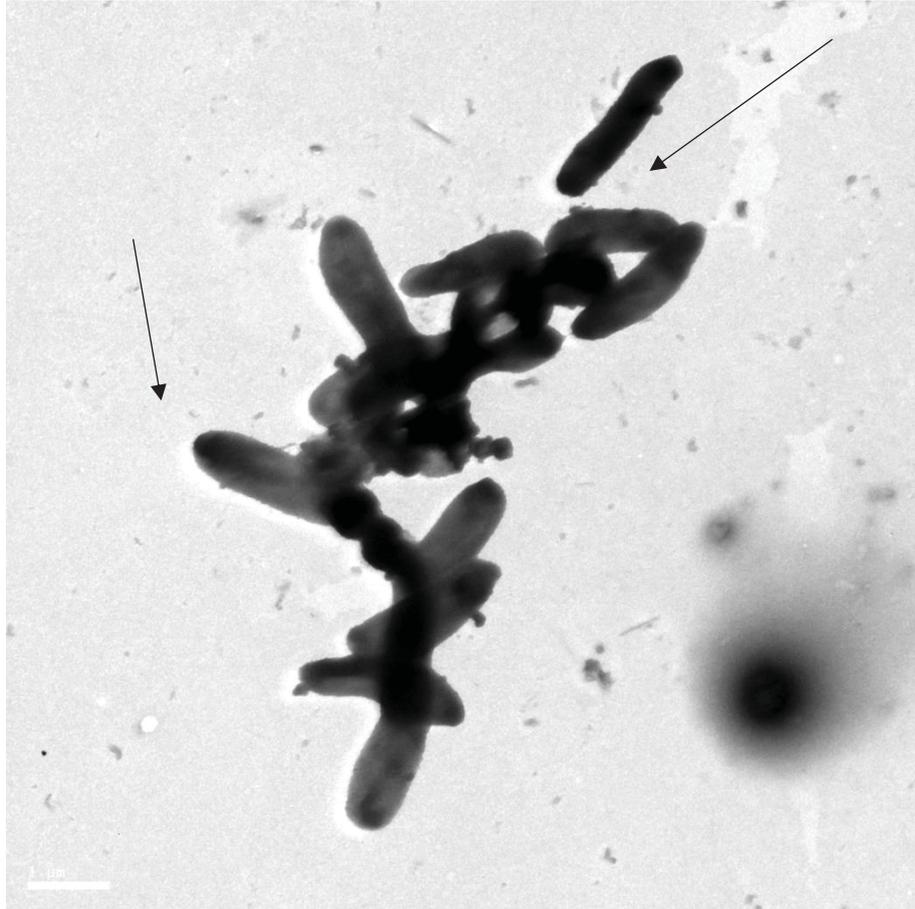


FIGURA 149S: Microscopia eletrônica de transmissão da estirpe Hrubri_3995. Microscopia conduzida sob 80kv de corrente com a estirpe fixada em tampão cacodilato de sódica 0,2M contendo 2% de glutaraldeído e corado com 0,2M de acetato de molibdênio.

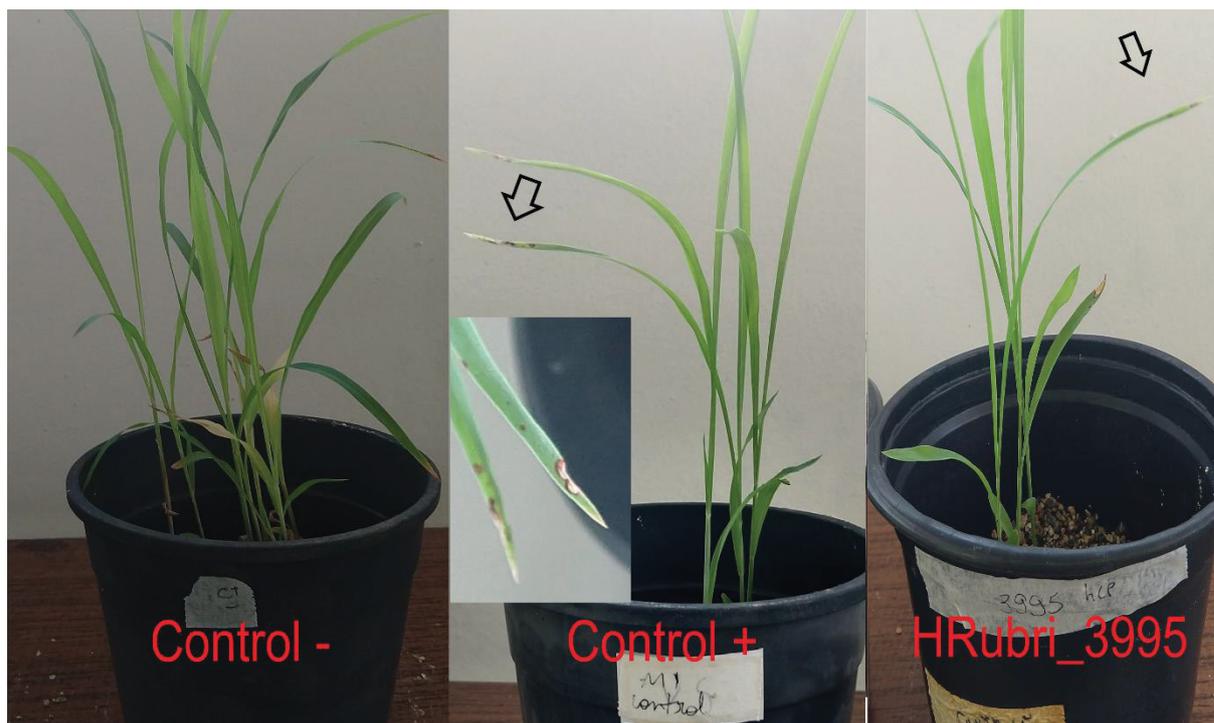


FIGURA 150S: Geração de sinais de doença em cultivar susceptível de *Sorghum bicolor* causadas pela estirpe Hrubri_3995. Experimento realizado três vezes com pelo menos 5 plantas. São inoculadas 10^5 células por perfuração do colmo da planta jovem (5 dias). As plantas são mantidas por 21 dias com ciclos de luz em ambiente com temperatura controlada (26°C). Controle negativo representa planta inoculada com salina estéril, o controle positivo representa a planta inoculada com *H. rubrisubalbicans* M1 selvagem e a estirpe testada está mostrada com sua nomenclatura.