

TRANSCRIPTOMA DA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA ENDOFÍTICA
HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE EM FORMAÇÃO DE
BIOFILME

MARIANA TERESA BARDUCO FERREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO-2013

TRANSCRIPTOMA DA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA ENDOFÍTICA
HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE EM FORMAÇÃO DE
BIOFILME

MARIANA TERESA BARDUÇO FERREIRA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Orientador: Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO-2013

TRANSCRIPTOMA DA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA ENDOFÍTICA
HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE EM FORMAÇÃO DE
BIOFILME

MARIANA TERESA BARDUÇO FERREIRA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 28 de agosto de 2013.

Comissão Examinadora:

Prof. Jean Luiz Simões de Araújo (D.Sc. em Ciências Biológicas -Genética) –
EMBRAPA- Agrobiologia

Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Thiago Motta Venâncio (D.Sc. em Bioinformática) - UENF

Prof. Fabio Lopes Olivares (D.Sc. Ciências do Solo) – UENF (Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais, Neusa e Marcio.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a minha Mãe **Maria** pelo dom da vida e por ter me concedido forças em vários momentos difíceis ao longo destes anos.

Aos meus pais **José Marcio** e **Neusa** e ao meu irmão **Marcio** por cuidarem de mim, sempre me dando apoio, amor e incentivo.

Aos meus amigos, os que estão perto e os que estão distantes fisicamente, por todo o carinho, conselhos, risadas, por estarem sempre por perto tanto nas alegrias como nos momentos difíceis.

Ao professor **Fabio Lopes Olivares**, pela orientação, conhecimento transmitido com extrema competência, incentivo, confiança, paciência e amizade durante este tempo.

Aos professores **Gonçalo Apolinario de Souza Filho**, **Jean Luiz Simões de Araújo**, por aceitarem para fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

Ao professor **Thiago Motta Venancio**, pela importante colaboração neste trabalho e por fazer parte da banca examinadora e a sua aluna MSc. **Ana Laura Grazziotin**, por toda dedicação, paciência e boa vontade comigo na elaboração deste trabalho.

Ao **Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio – UFPR**, especialmente aos professores **Rose Adele Monteiro**, **Emanuel Maltempi de Souza**, **Fabio de Oliveira Pedrosa** e a **Michelle Z. Tadra-Sfeir**, pela colaboração neste projeto.

A Ana Laura Grazziotin e ao grupo do Prof. Thiago Venâncio pela colaboração fundamental nas análises de bioinformática do RNA-seq

À Professora **Aline Chaves Intorne**, não apenas por fazer a revisão deste material enriquecendo-o com suas críticas e sugestões, mas também pela amizade.

Aos amigos de equipe, pela prazerosa convivência, pelas sugestões, apoio e incentivo.

À **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro** e ao **Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia** pela oportunidade da realização do Curso.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)** pela bolsa de estudos a mim concedida.

Ao **INCT de Fixação Biológica de Nitrogênio** pelo auxílio financeiro.

A todos os professores de pós-graduação que me transmitiram seus conhecimentos e contribuíram desta forma para o meu crescimento profissional.

Aos colegas da pós-graduação, pela vivência e por compartilhar comigo todo aprendizado nestes dois anos.

Aos professores e colegas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e NUDIBA, também a todos que de alguma forma, me auxiliaram, me incentivaram ou me proporcionaram bons momentos para a continuação e finalização desta dissertação.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de desenvolvimento do biofilme.....	11
Figura 2- Plataforma SOLiD	18
Figura 3 – Monitoramento populacional de <i>H.seropedicae</i> SmR1.....	34
Figura 4 – Taxas específicas de crescimento apresentadas por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1.....	35
Figura 5 – Monitoramento da cinética temporal de agregação da bactéria <i>H.seropedicae</i> em lã de vidro.....	36
Figura 6 – Microscopia óptica de contraste diferencial e interferência (DIC) e Microscopia de epifluorescência (MF) de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe RAM10.....	38
Figura 7 – Amostras de RNA total isolados de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	40
Figura 8 – Análise de RPKM nas condições Biofilme Precoce e Biofilme Tardio	43
Figura 9 – Análise de RPKM nas condições Planctônico Precoce e Biofilme Precoce.....	44
Figura 10 – Análise de RPKM nas condições Planctônico Tardio e Biofilme Tardio.....	45

Figura 11 – Distribuição global de genes diferencialmente expressos.....	47
Figura 12 – Infográfico com os tratamentos utilizados e comparação por RNA-seq.....	48
Figura 13 – Distribuição dos genes induzidos segundo à categoria funcional (COG).....	49
Figura 14- Distribuição de genes reprimidos segundo à categoria funcional (COG).....	51
Figura 15- Via de quimiotaxia.....	56
Figura 16- Estrutura flagelar em <i>H.seropedicae</i>	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 –Função do EPS em biofilmes bacterianos.....	14
Tabela 2 – Composição do meio JNFB.....	24
Tabela 3 – Composição do meio NB.....	24
Tabela 4 – Composição do meio DYGS.....	24
Tabela 5 – Composição do meio NFbHP.....	25
Tabela 6 – Sumario dos dados de RNA-seq.....	41
Tabela 7 - Genes diferencialmente expressos no transcriptoma para as três condições de comparação.....	53

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Bactérias endofíticas.....	3
2.2. Promoção do crescimento vegetal mediado por bactérias	4
2.3. Herbaspirillum seropedicae	6
2.3.1. Determinantes moleculares relacionados à colonização	7
2.4. Biofilme.....	9
2.4. Transcriptômica.....	15
3 – HIPOTESE	21
4 - OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo Geral	22
4.2. Objetivos Específicos.....	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1. Bactérias, meios e condições de cultivo	23
5.2. Análise da formação de biofilme	25
5.2.1. Monitoramento da densidade populacional	25
5.2.2- Monitoramento das etapas de desenvolvimento do biofilme	26
5.2.3- Microscopia óptica.....	26
5.3. Transcriptoma	27
5.3.1. Isolamento de RNA total	27
5.3.2. Tratamento com DNaseI.....	28
5.3.3. Precipitação das amostras de RNA	28
5.3.4. Isolamento de mRNA	29
5.3.5. Construção e sequenciamento das bibliotecas de cDNA.....	29
5.3.6. Análise do transcriptoma	31
5.3.7. Análise dos dados.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6.1. Cinética populacional e análise da estrutura do biofilme em lâ de vidro	33
6.2. Prospecção de genes regulados na maturação do biofilme.....	40
6.2.1. Extração de RNA e construção da biblioteca de cDNA	40
6.2.2. Análise dos dados pelo método de RPKM	42
6.2.3. Visão global da expressão gênica.....	46

6.2.4. Genes diferencialmente expressos envolvidos com quimiotaxia, flagelo e produção de EPS	52
7-CONCLUSÕES.....	62
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
Anexos.....	86

RESUMO

Plantas são reconhecidas como um nicho microbiano para inúmeras interações benéficas e patogênicas. Estas interações ocorrem na superfície e no interior da planta hospedeira. No curso temporal da interação, bactérias solitárias aderidas à parede celular vegetal podem aumentar sua população através de divisão celular, recrutamento de bactérias do meio e formação de agregados bacterianos complexos, os biofilmes. Biofilmes são comunidades estruturadas de células bacterianas aderidas a um substrato biótico ou abiótico, que estão inseridas em uma matriz polimérica, formada majoritariamente por substâncias extracelulares produzidas pelas próprias bactérias. *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria endofítica gram-negativa, membro da subdivisão das Proteobacterias. Tal bactéria é capaz de fixar nitrogênio e produzir fitohormônios, que promovem o crescimento vegetal. Embora a formação de biofilmes seja essencial para expressão dos efeitos positivos desta bactéria, não existem estudos com ênfase no seu mecanismo molecular de formação de biofilmes. Nesse trabalho avaliamos a cinética da formação *in vitro* de biofilmes da bactéria, e avaliamos a expressão global dos genes envolvidos na formação destes biofilmes utilizando RNAseq através da plataforma SOLiD™. O comportamento de *H. seropedicae* Smr1 ao longo do cultivo foi avaliado na presença e ausência de lã de vidro (substrato físico para expressão do biofilme) em meio JNFB por 36 h. A análise da formação de biofilmes utilizando uma estirpe marcada com proteína verde fluorescente foi verificada ao microscópio de epifluorescência nas mesmas condições do ensaio anterior, permitindo definir 24 h como período de tempo em que biofilmes estão maduros. Assim, para análise transcriptômica, optou-se por definir dois períodos para avaliação da expressão gênica, 5 e 16 h., respectivamente, para eventos precoces e tardios para formação dos biofilmes e estado planctônico. Os resultados mostraram que na curva de crescimento embora não significativo, o tempo de geração da bactéria crescida na ausência da lã de vidro na fase exponencial foi levemente inferior quando comparado ao cultivo com lã de vidro, o que indica uma imobilização das células bacterianas no substrato. A microscopia mostrou os eventos que envolvem a adesão da célula bacteriana a este substrato como passo inicial para a formação de biofilme, seguido pelo estabelecimento de micro-colônias e maturação final. Na análise transcriptômica, entre os genes diferencialmente expressos, foram encontrados genes envolvidos na quimiotaxia, motilidade e produção de exopolissacarídeos importantes para o estabelecimento do biofilme. Alguns genes de quimiotaxia que influenciam a rotação flagelar, como *cheY*, foram reprimidos no biofilme maduro. A diminuição ou perda da rotação ocorre para estabilizar os agregados e otimizar o investimento dos recursos. Genes envolvidos com a motilidade, que atuam na biossíntese e funcionamento do flagelo, também foram em sua maioria reprimidos, o que está de acordo com a redução da atividade metabólica inerente a condição de biofilme. Esses resultados contribuem para o entendimento da fisiologia de *H. seropedicae* e oferece perspectivas aos estudos interação da bactéria com a planta.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*, análise transcriptômica biofilme, quimiotaxia, motilidade flagelar, exopolissacarídeos.

ABSTRACT

Plants are recognized as a microbial niche for numerous beneficial and pathogenic interactions. These interactions occur at the surface and in the interior of the host plant. In the time course of interaction, lonely bacteria adhered to the plant cell wall can increase their population through cell division, recruitment of bacteria from the formation of bacterial aggregates and complex biofilms. Biofilms are structured communities of bacterial cells adhered to a substrate biotic and abiotic stress, which are embedded in a polymer matrix, formed mostly by extracellular substances produced by the bacteria themselves. *Herbaspirillum seropedicae* endophytic bacterium is a gram-negative member of α subdivision of Proteobacteria. This bacterium is able to fix nitrogen and produce phytohormones that promote plant growth. Although biofilm formation is essential for expression of positive effects of this bacteria, there are no studies with emphasis on their molecular mechanism of biofilm formation. In this work we evaluated the kinetics of in vitro formation of biofilms of bacteria, and evaluate the global expression of genes involved in the formation of these biofilms using RNAseq through the SOLiD™ platform. The behavior of *H. seropedicae* SMR1 over cultivation was evaluated in the presence and absence of glass wool (physical substrate for the expression of biofilm) amid media JNFb for 36 h. The analysis of biofilm formation using a strain labeled with green fluorescent protein was checked by epifluorescence microscope under the same conditions of the preceding test allowing to determine 24 hour period of time are mature biofilms. So for transcriptomic analysis, we chose to define two periods for evaluation of gene expression, 5:16 h, respectively, for early and late events in biofilm formation and planktonic state. The results showed that the growth curve although not significant, the time of generation of the bacteria grown in the absence of glass wool in the exponential phase was slightly lower compared to the cultivation with glass wool, which indicates immobilization of the bacterial cells on the substrate. Microscopy showed the events surrounding the bacterial cell adhesion to this substrate as an initial step for biofilm formation, followed by the establishment of micro-colonies and final maturation. In transcriptomic analysis between the differentially expressed genes were found genes involved in chemotaxis, motility and exopolysaccharide important for the establishment of biofilms. Some of chemotaxis genes that influence flagellar rotation as *CheY*, were repressed in mature biofilm. The decrease or loss of rotation is to stabilize aggregate and optimize the investment of resources. Genes involved in motility, acting in the biosynthesis and function of the flagellum, were also mostly suppressed, which is consistent with the decrease in metabolic activity inherent in the condition of biofilm. These results contribute to the understanding of the physiology of *H. seropedicae* and offers perspectives to study the interaction of bacteria with the plant.

Keywords: *Herbaspirillum seropedicae*, biofilm transcriptomics analysis, chemotaxis, flagellar motility, exopolysaccharide.

1 - INTRODUÇÃO

As bactérias colonizam o ambiente sobre diferentes superfícies e em algumas situações podem formar agregados multicelulares descritos como biofilmes (RAMEY *et al.*, 2004). Biofilme é definido como comunidade de células bacterianas inseridas em uma matriz polimérica, formada majoritariamente por substâncias extracelulares produzidas pelas próprias bactérias, aderidas a um substrato biótico ou abiótico (PITON, 2007). Além de polissacarídeos, a matriz polimérica é formada por proteínas, ácidos nucléicos e lipídios. Tais moléculas fornecem estabilidade mecânica ao biofilme, mediando sua adesão à superfície e formando uma rede tridimensional, que interliga e imobiliza as células do biofilme (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

Reconhecendo as plantas como um nicho microbiano para interações benéficas e patogênicas, as mesmas podem ser superficial ou internamente colonizadas por bactérias, estabelecendo interações epifíticas ou endofíticas, respectivamente. No eixo vegetativo e reprodutivo das plantas, variações morfo-estruturais e físico-químicas representam desafios para o estabelecimento e atividade de bactérias, que devem então se organizar em biofilme (JAMES & OLIVARES, 1998).

As propriedades da superfície do tecido vegetal, nutrientes e água, status fisiológico e as inter-relações microbianas influenciam fortemente as relações espaço-tempo na estruturação deste biofilme (RAMEY *et al.*, 2004). No curso temporal da interação, bactérias solitárias aderidas à parede celular vegetal aumentam sua população através da divisão celular e recrutamento de outras bactérias do meio. A partir de uma determinada densidade populacional, é estabelecido o biofilme (JAMES & OLIVARES, 1998), imediatamente após a associação ou em estágios mais avançados, com potencial para modular a fisiologia da interação planta-micróbio (RAMEY *et al.*, 2004).

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria endofítica capaz de fixar nitrogênio atmosférico (N₂) (BALDANI *et al.*, 1986) e produzir os hormônios vegetais (BASTIÁN *et al.*, 1998). É encontrada em associação com culturas

economicamente importantes como arroz, milho, sorgo e cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992). Tal bactéria tem sido amplamente estudada quanto aos aspectos ecológicos e endofíticos, resultando inclusive no seu aproveitamento na composição de um bioinoculante recomendado para a cultura da cana-de-açúcar (MONTEIRO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2002). No entanto, aspectos básicos para sua manipulação tecnológica como o mecanismo molecular de formação de biofilme ainda são pouco esclarecidos.

A publicação do genoma de *H. seropedicae* estirpe SmR1 (PEDROSA *et al.*, 2011) é um incentivo ao conhecimento da fisiologia da bactéria e oferece perspectivas para um melhor entendimento da sua inter-relação com a planta e a maximização das respostas benéficas frente a inoculação. Seu genoma consiste em um cromossomo circular único totalizando 4.804 genes. Alguns genes responsáveis pela motilidade e aderência a superfícies relevantes na formação de biofilme foram encontrados (PEDROSA *et al.*, 2011). Mas ainda não há estudos moleculares evidenciando o processo de formação de biofilme em *H. seropedicae*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão gênica global de *H. seropedicae* SmR1 quando a bactéria encontra-se estruturada em biofilme. Para tanto, um ensaio *in vitro* foi conduzido, determinando a cinética de formação de biofilme da bactéria. Foi observada uma fase precoce e outra tardia do crescimento populacional em ambos os modos de vida solitário (planctônico) ou em agregados (biofilme). Estas quatro fases foram definidas para extração do RNA e a análise de transcritos diferencialmente expressos, utilizando o sistema SOLiD de sequenciamento de nova geração.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Bactérias endofíticas

Diversos micro-organismos são encontrados em associação com plantas e animais, estimulando o crescimento, desenvolvimento e maquinaria de defesa dos mesmos (HOOPER *et al.* 2001, DE MATOS NOGUEIRA *et al.* 2001). Em plantas são encontradas as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que representam uma parcela funcionalmente ativa da biota do solo presente na rizosfera, rizoplano e interior da planta hospedeira (OLIVARES, 2009). Tais bactérias são chamadas de endofíticas, quando habitam o interior da planta sem causar dano aparente ao hospedeiro (PETRINI, 1991; HALLMANN, 1997; STURZ *et al.*, 2000), e epifíticas, quando crescem e vivem sobre a superfície vegetal (PETRINI, 1991; JACQUES & MORRIS, 1995; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998; ANDREWS & HARRIS, 2000).

A entrada das bactérias endofíticas no tecido vegetal ocorre pelos estômatos, feridas provocadas pela emergência das raízes laterais, atrito do crescimento das raízes com o solo, através de insetos ou fungos ou ainda pela ação de enzimas hidrolíticas como pectinases e celulases (HALLMANN *et al.*, 1997; QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). No interior da planta, as bactérias se concentram no ponto de entrada ou se dispersam de forma sistêmica (HALLMANN *et al.* 1997; ZINNIEL *et al.*, 2002). No meio ambiente, tais bactérias se disseminam através das sementes, propagação vegetativa, partes mortas da planta ou carregadas por insetos (BALDANI, 1997).

2.2. Promoção do crescimento vegetal mediado por bactérias

A colonização endofítica pode causar efeitos benéficos para as plantas, que são divididos em ações diretas ou indiretas. Dentre os mecanismos de ação direta estão a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BALDANI *et al.*, 1997), a produção de reguladores de crescimento vegetal, como auxina e giberelina (CASSÁN *et al.*, 2001), a solubilização de fosfato inorgânico (VERMA *et al.*, 2001), e a produção de compostos voláteis, como 2-3 butanodiol e acetoína (RYU *et al.*, 2003). Como mecanismos de ação indireta têm-se o controle biológico (KLOEPPER *et al.*, 1999; BENCHIMOL *et al.*, 2000), a produção de sideróforos (LODEWYCKX *et al.*, 2002), e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (HALLMANN *et al.*, 1997).

A FBN é o mecanismo de promoção do crescimento mais estudado (BALDANI *et al.*, 2005; BODDEY *et al.*, 2003; SABOYA *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Sua importância é dada por ser um elemento essencial na estrutura de biomoléculas como proteínas, aminoácidos e ácidos nucléicos. No entanto, a maior parte do nitrogênio está na forma gasosa (N_2), indisponível para animais e vegetais (MAGNANI, 2005). Somente as bactérias chamadas diazotróficas são capazes de fixar o N_2 em formas assimiláveis pelos outros seres vivos, ou seja, realizar a FBN. Tal reação é catalisada por um complexo enzimático dimérico, a nitrogenase (YOUNG, 1992; BURRIS, 1991). Análises de quantificação da FBN pela população natural de bactérias e seu efeito através da inoculação de bioinoculantes bacterianos constataram resposta positiva com aumento entre 30 e 60 % do nitrogênio acumulado na planta (OLIVEIRA *et al.*, 2006; URQUIAGA *et al.*, 1992).

Bactérias diazotróficas têm sido isoladas de várias espécies de planta com importância econômica como gramíneas (BALDANI *et al.*, 2005; SALA *et al.*, 2005), orquídeas (LANGE & MOREIRA, 2002), tubérculos (DÖBEREINER *et al.*, 1993), cafeeiros (SAKIYAMA, 2011) e fruteiras (WEBER *et al.*, 1999). E dentre as bactérias isoladas encontra-se *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp. (JAMES & OLIVARES, 1998; BALDANI *et al.*, 1997; JAMES, 2000; BODDEY *et al.* 2003).

BENEDUZI *et al.* (2013) isolaram estirpes bacterianas de plantações de cana de açúcar com a finalidade de estudar a diversidade microbiana do solo e testar características de promoção de crescimento. O isolamento foi realizado com meios livres de formas nitrogenadas. Foram isoladas 516 bactérias, das quais a produção de compostos indólicos foi identificada em 368, sendo 138 capazes de solubilizar fosfato e 390 produtoras de sideróforos. Os gêneros mais encontrados foram *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Stenotrophomonas*. A bactéria agronomicamente mais eficiente foi *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe VI27, que resultou em um aumento significativo do rendimento de cana-de-açúcar, com maior germinação e aumento na produção de caldo. Os autores relacionaram tais efeitos positivos com a capacidade da bactéria em fixar N₂, produzir fitohormônios e solubilizar fosfatos.

No trabalho de PEREIRA *et al.*(2013), a mesma bactéria *G. diazotrophicus* foi testada em conjunto com *H. seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Burkholderia tropica* e *Azospirillum amazonense* em variedades de cana-de-açúcar. O estudo mostrou que a variedade mais responsiva ao coquetel de bactérias diazotróficas foi a RB867515. Quando as estirpes foram testadas individualmente, *H. seropedicae* promoveu aumento da massa fresca de colmos e biomassa seca total na variedade RB72454. Esse estudo demonstrou que a inoculação induz ganho de biomassa dependente da interação entre o genótipo da planta e da bactéria. Isto sugere que a promoção do crescimento é função da presença e expressão de genes ainda não claramente elucidados na bactéria e planta.

Bactérias que possuem mais de um mecanismo de promoção do crescimento são desejáveis nos ensaios de seleção de espécies e estirpes bacterianas para compor os inoculantes microbianos para a agricultura (VERMA *et al.*, 2001). Além da etapa de seleção, outro desafio resulta da formulação e forma de aplicação do bioinoculante, que devem assegurar a sobrevivência, competitividade e atividades dos micro-organismos selecionados para obtenção de respostas positivas e consistentes quanto à promoção do crescimento vegetal no campo (ARRUDA, 2012).

2.3. *Herbaspirillum seropedicae*

A primeira descrição de *H. seropedicae* foi feita por BALDANI *et al.*, 1986, a partir de isolados obtidos em associação com raízes de milho, arroz e sorgo em Seropédica-RJ. Inicialmente, foi descrita como uma nova espécie do gênero *Azospirillum*. Em seguida, tais isolados foram reclassificados por meio de análises de hibridação RNA:RNA e DNA:DNA, onde ficou demonstrado que se tratava de um novo gênero de bactéria diazotrófica (BALDANI *et al.*, 1986).

H. seropedicae é uma Gram-negativa pertencente à subdivisão α do filo Proteobacteria, que é capaz de fixar N₂ em condições microaeróbicas e em uma larga faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI *et al.*, 1986). Além de fixar nitrogênio, *H. seropedicae* possui características de promoção de crescimento importantes, que conferem melhor desenvolvimento da planta hospedeira como a produção de hormônios vegetais, auxinas e giberelinas A1 e A3 (BASTIÁN *et al.* 1998), e sideróforos (ROSCONI *et al.* 2012). Essa bactéria associa-se com diversas plantas de interesse econômico, como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), bananeiras (*Musa* sp.), palmeiras (*Roystonea* sp.), abacaxizeiros (*Ananas comosus*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 2001; SCHMIDT *et al.*, 2011).

Estudos de microscopia com plantas colonizadas por *H. seropedicae*, mostram que o início da colonização se dá quando a bactéria se liga a superfície vegetal e prolifera, formando agregados de diferentes tamanhos, que podem evoluir a biofilme. Em seguida, a bactéria penetra em aberturas efêmeras da epiderme radicular causada pela emergência de raízes laterais. Então, ocorre a ocupação dos espaços intercelulares das células do parênquima cortical e subsequentemente, o cilindro central, feixes vasculares e parte aérea (OLIVARES *et al.*, 1995; RONCATTO-MACCARI *et al.*, 2003). Todavia, destaca-se que os avanços na descrição estrutural da interação com as raízes do hospedeiro contrastam com a escassez de dados relacionados às bases moleculares e bioquímicas do estabelecimento endofítico e devem ganhar espaço nos próximos anos com as contribuições da genômica estrutural e funcional (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Em 2011, o genoma estrutural de *H. seropedicae* SmR1 foi disponibilizado pelo Programa Genoma do Paraná (GENOPAR) (<http://www.genopar.org>). Deste modo, foi observado que a bactéria possui um cromossomo circular de 5.513.887 pares de base com 63,4 % de conteúdo G+C. Um total de 4.735 *Open Read Frames* (ORFs) foi anotado, codificando 3.108 proteínas com funções conhecidas, 497 com previsão de função geral e 1.130 sem função conhecida.

O estudo do genoma de *H. seropedicae* mostrou que esse micro-organismo tem um metabolismo versátil, podendo degradar e sintetizar um grande número de compostos. Foram identificados também genes envolvidos com a FBN e na interação entre a bactéria e a planta hospedeira (PEDROSA *et al.*, 2011). Com o genoma totalmente sequenciado, pode-se ter um melhor entendimento da interação da bactéria com o hospedeiro e possibilitar a construção de novas estirpes, podendo utilizá-las para o melhoramento de plantas (PEDROSA *et al.*, 2011).

2.3.1. Determinantes moleculares relacionados à colonização

Alguns genes são necessários para a colonização endofítica, por exemplo, aqueles responsáveis pela infecção e os que permitem o crescimento e sobrevivência da bactéria dentro dos tecidos vegetais (MONTEIRO *et al.*, 2012). Neste sentido, no genoma de *H. seropedicae* SmR1 foram identificados componentes do sistema de secreção tipo III (T3SS) e genes de síntese de exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) (PEDROSA *et al.*, 2011).

Muitas bactérias que interagem com organismos eucariotos contêm um aparato estrutural de natureza protéica capaz de translocar proteínas efetoras para o interior do citoplasma do hospedeiro conhecido como T3SS (HE *et al.* 2004). O T3SS é encontrado em algumas Gram-negativas como o fitopatógeno *Pseudomonas syringae* DC3000, que secreta em torno de 30 efetores no curso do processo de infecção na planta (CHANG *et al.*, 2005; BUTTNER *et al.*, 2006).

Determinados efetores funcionam como enzimas, que controlam atividades da célula hospedeira importantes para a ativação da resposta imune (SHAN *et al.*, 2007). A subversão destes mecanismos garante a multiplicação bacteriana nos tecidos vegetais e o desenvolvimento da doença via supressão da resposta imune da planta (HAUCK *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2005).

O T3SS não é restrito a patógenos, bactérias simbióticas e insetos também usam esse sistema para interagir com seus hospedeiros (VIPREY *et al.*, 1998; DALE *et al.*, 2001). Os genes que codificam o T3SS foram primeiramente identificados por Lindgren e colaboradores (1986), como um *cluster* para reação de hipersensibilidade e patogenicidade em *Pseudomonas syringae*. Os genes *hrp/hrc* codificam proteínas que compõem este sistema, e são responsáveis pela passagem de proteínas através das membranas bacteriana e eucariótica das células hospedeiras (BUTTNER & BONAS 2002).

H. rubrisubalbicans contém um conjunto de 26 genes *hrp/hrc*, que codificam proteínas do T3SS. Schmidt e colaboradores (2012) investigaram a contribuição do T3SS no processo de interação planta-bactéria. Foram gerados estirpes mutantes de *H. rubrisubalbicans* para os genes *hrpE* e *hrcN*, que foram incapazes de produzir lesões em folhas de *Vigna unguiculata* e em provocar doença em uma variedade de cana-de-açúcar suscetível. Em arroz e milho, tais mutantes tiveram sua capacidade de colonização reduzida, o que sugere que estes genes são importantes para a interação bactéria-planta.

Análises do genoma de *H. seropedicae*SmR1 identificaram uma região de cerca de 28 Kb contendo genes envolvidos com o sistema de secreção. São eles: 8 genes *hrp*, 7 genes *hrc*, e 13 genes codificantes para proteínas hipotéticas, que podem fazer parte da maquinaria de injeção ou constituírem novas proteínas efectoras (MONTEIRO *et al.*, 2012).

Dois conjuntos de polissacarídeos da superfície celular de algumas espécies bacterianas têm sido estudados pelo seu envolvimento nos eventos iniciais de adesão e infecção, desenvolvimento do nódulo e especificidade do hospedeiro. São os EPS e os LPS (TADRA-SFEIR, 2011).

Os EPS são importantes na manutenção da viabilidade celular da bactéria no modo de vida livre, possibilitando a aderência e colonização de superfícies sólidas, onde há acúmulo de nutrientes (COSTERTON, 1987). O trabalho de microscopia de raiz apresentado por Michiels *et al.* 1991, mostra

que em plantas colonizadas por *Azospirillum* sp., a bactéria possui matriz. Isto sugere que na fase inicial de interação, tal bactéria se liga a superfície sólida da planta através do EPS.

Alguns estudos com *H. seropedicae* indicam que a bactéria utiliza EPS no seu processo de colonização. Através de microscopia eletrônica de varredura, foi mostrado que *H. seropedicae* produz uma substância mucilaginosa e um material fibrilar durante a colonização da superfície do sistema radicular de milho e sorgo (GYANESHWAR *et al.*, 2002; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

No genoma de *H. seropedicae*, é observada uma região de 31 Kbp contendo genes relacionados com a biossíntese e secreção de EPS. As análises destes genes sugerem que o EPS produzido por esta bactéria é composto de galactose, manose e glicose (MONTEIRO *et al.*, 2012).

LPS são macromoléculas de estrutura complexa, que se localizam exclusivamente formando a monocamada da membrana externa de Gram-negativas (COLLINS & FERRIER, 1995). Os LPS exercem papel importante na comunicação entre planta e bactéria, formando uma interface da célula bacteriana com o ambiente (KANNENBERG *et al.* 1998).

TADRA-SFEIR *et al.*, 2011 mostraram que o silenciamento do gene *ampG*, que codifica uma muropeptidopermease, causou mudanças significativas nos perfis de LPS em *H. seropedicae*. A proteína AmpG é encontrada na membrana de Gram-negativas e é indispensável para a reciclagem do peptidoglicano presente na parede celular. Sua ausência parece afetar a síntese ou estruturação do LPS em *H. seropedicae*. Estas alterações diminuíram em 10 vezes a capacidade de colonização endofítica em plantas de milho pelas estirpes mutantes, confirmando a importância do LPS durante a colonização por *H. seropedicae*.

2.4. Biofilme

O biofilme é outro componente importante no processo de interação planta-bactéria. Como discutido anteriormente, já foi verificado que o início da

colonização de plantas por *H. seropedicae* ocorre a partir da ligação da bactéria a superfície vegetal, formando agregados, que podem evoluir a biofilme (OLIVARES *et al.*,1995; RONCATTO-MACCARI *et al.*,2003). No entanto, seus determinantes moleculares não são conhecidos em *H. seropedicae*.

O conceito de que as bactérias vivem preferencialmente em uma matriz ligada à superfície surgiu aos poucos, mas progrediu bastante durante as últimas décadas (COSTERTON & WILSON, 2004).

Os micro-organismos não vivem somente na forma de células isoladas, eles podem formar agregados em diferentes tamanhos e complexidade fisiológica (WINGENDER & FLEMMING, 1999).

Normalmente, as bactérias formam biofilme em resposta a uma condição ambiental específica, que varia entre os organismos. Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* formam biofilme em quase todas as condições de crescimento (O'TOOLE & KOLTER, 1998). Por outro lado, algumas estirpes de *Escherichia coli* K-12 e *Vibrio cholerae* não formam biofilmes em meio mínimo suplementado com aminoácidos (PRATT & KOLTER, 1998; WATNICK *et al.*,1999). Fatores como pH, difusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade também podem controlar o desenvolvimento de biofilme (KASNOWSKI *et al.*,2010)

A formação do biofilme inclui um ciclo que compreende as seguintes fases: iniciação, maturação, manutenção e dissolução. Na iniciação, as células individuais se ligam a uma superfície biótica ou abiótica, formando uma associação estável com esse substrato e com outros organismos previamente aderidos. Este primeiro passo, que é muitas vezes reversível, pode exigir motilidade ou ser concebido por contatos aleatórios. Em seguida, ocorre a adesão dessas células através de apêndices superficiais ou pela produção de substâncias poliméricas extracelulares. Durante a proliferação, as células crescem formando microcolônias. Logo, no desenvolvimento do biofilme, a sua estabilidade é dada por interações célula-célula e por substâncias poliméricas circundantes, que integram a biomassa microbiana. Com o biofilme já maduro, algumas bactérias podem se dissociar e aderir em outro substrato, iniciando um novo ciclo como mostra a figura 1 (MOLIN & NILSEN, 2003).

No processo de adesão e formação de biofilme, algumas estruturas do micro-organismo são importantes, como o pili, que é característico de Gram-negativas. Tal estrutura participa do processo de adesão inicial, assim como dá motilidade a bactéria sobre a superfície sólida. O tipo de motilidade que essa estrutura oferece ao micro-organismo, o permite se mover em superfícies variadas (BOARI, 2008). A colonização através de pili de um tipo específico, tipo IV, abrange o contato célula-célula, fazendo com que a bactéria se oriente pela presença de nutrientes e através de sinalizadores quimioatrativos, ou seja, um gradiente químico, que é conhecido por quimiotaxia (MATTICK, 2006; BOARI, 2008).

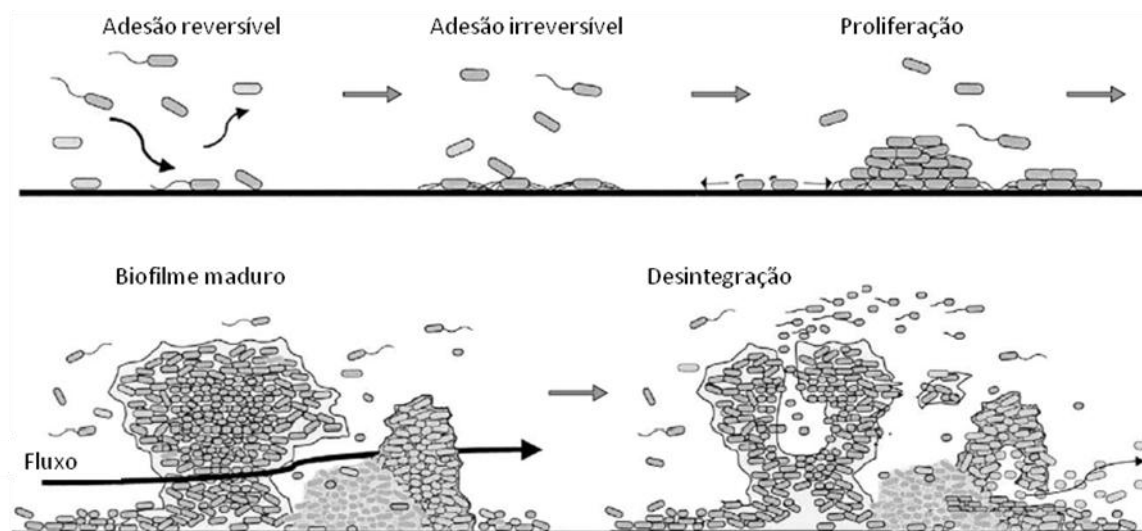


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento do biofilme. Adaptado de MOLIN & NILSEN, 2003.

O flagelo é outra estrutura importante na colonização e na adesão das bactérias. Alguns estudos evidenciaram que mutações produzidas na montagem da estrutura flagelar prejudicam a formação de biofilme (PRATT & KOLTER, 1998; VALLET *et al.*, 2001). Tal estrutura também é regulada por quimiotaxia, (WADHAMS & ARMITAGE, 2004; SOURJIK & WINGREEN, 2011; GUTTENPLAN & KEARNS, 2013). Algumas proteínas da via de quimiotaxia interagem com proteínas flagelares, podendo ativar a rotação do flagelo, no caso de um biofilme em formação, onde a motilidade celular é muito importante

(FRANCO *et al.*, 2010; BREN & EISENBACH, 2000). E também podem interagir reduzindo a rotação, como ocorre durante a maturação do biofilme, quando a motilidade parece ser perdida ou, pelo menos, reduzida (GUTTENPLAN & KEARNS, 2013; ABSALON *et al.*, 2011).

Em grande parte dos biofilmes, as células são responsáveis por menos de 10 % da massa seca, enquanto a matriz corresponde a mais de 90 % dessa massa (FLEMMING & WINGENDER, 2010). A matriz extracelular é em maior parte produzida pelos próprios micro-organismos do biofilme. Sua composição é dada por EPS, responsáveis pela aderência e coesão dos biofilmes, bem como efluxo e influxo de substâncias, e sinais entre os membros da comunidade formadora do biofilme (FLEMMING & WINGENDER, 2010). Por isso, a formação e manutenção da comunidade microbiana estruturada em biofilmes depende da produção e quantidade de EPS (SUTHERLAND, 2001).

A arquitetura do biofilme é influenciada por muitos fatores, incluindo as condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, motilidade, comunicação intercelular, bem como os EPS e proteínas (FLEMMING & WINGENDER, 2010). No entanto, é válido destacar que não há biofilme sem uma matriz de EPS. Esse componente promove um estilo de vida que é inteiramente distinto do estado planctônico (FLEMMING & WINGENDER, 2010).

No trabalho de Meneses e colaboradores (2011), ficou demonstrado o papel do EPS na formação do biofilme da bactéria endofítica diazotrófica *G. diazotrophicus*. A partir de uma inserção no gene *gumD*, que é responsável pela formação de EPS, o mutante não foi capaz de produzir EPS. Quando colocado em meio de cultura com substrato físico e na presença das raízes de planta, não ocorreu à adesão e, conseqüentemente, a formação do biofilme. A aplicação de EPS no meio de cultura na presença da bactéria mutante e das raízes da planta restituiu parcialmente o fenótipo de agregação, evidenciando a essencialidade do EPS nos eventos iniciais para formação do biofilme.

Em *H. rubrisubalbicans*, foi demonstrado que os genes de síntese de celulose têm participação na formação de biofilme. Uma mutação no gene *wssD* reduziu a produção de EPS e celulose. Houve alteração na produção de biofilme e na motilidade da estirpe mutante, indicando que a biossíntese de celulose pode ser importante para esses dois processos (TULESKI, 2013). Já

em estirpes de *V. cholerae* não produtoras de EPS, observou-se que a adesão à superfície não foi afetada, porém a capacidade de formar biofilme foi comprometida, comprovando sua importância para o desenvolvimento da estrutura tridimensional do biofilme (WATNICK e KOLTER, 1999).

Existe uma gama de ganhos seletivos na direção da persistência e aumento da atividade de uma comunidade bacteriana quando estruturada em biofilme, tais como proteção contra dessecação, predação, exposição à radiação UV e agentes bactericidas (COSTERTON *et al.*, 1995; DAVEY & TOOLE, 2000). A tabela 1 evidencia aspectos relacionados à funcionalidade gerais dos biofilmes bacterianos e suas vantagens como modo de vida, embora as interações moleculares e a secreção de polímeros ainda sejam pouco compreendidas (KARATAN & WATNIK, 2009).

Tabela 1 | Função do EPS em biofilmes bacterianos

Função	Relevância para biofilmes	Componentes envolvidos por EPS
Adesão	Permite os passos iniciais na colonização em superfícies bióticas e abióticas através de células planctônicas, e a adesão de longo tempo de biofilmes completos sobre superfícies.	Polissacarídeos, DNA, proteínas e moléculas anfífilas
Agregação das células bacterianas	Permite a ponte entre as células, a imobilização temporária das populações bacterianas.	Polissacarídeos, proteínas e DNA.
Coesão dos biofilmes	Forma uma rede de polímero hidratado (matriz do biofilme), mediando a estabilidade mecânica dos biofilmes, e através da estrutura do EPS determina a estrutura do biofilme, e permite comunicação célula – célula.	Polissacarídeos neutros e carregados, proteínas (como amilóides e lectinas) e DNA.
Retenção de água	Mantém um ambiente altamente hidratado em torno dos organismos do biofilme, elevando sua tolerância de dessecação em ambientes com déficit de água.	Polissacarídeos hidrofílicos e possivelmente proteínas.
Barreira protetora	Confere resistência a hospedeiros específicos e não específicos durante a infecção, e confere tolerância a diversos agentes antimicrobianos (por exemplo, desinfetantes e antibióticos) assim como protege a nitrogenase de cianobactérias dos efeitos danosos do oxigênio e protege contra alguns protozoários.	Polissacarídeos e proteínas
Sorção de compostos orgânicos	Permite o acúmulo de nutrientes do meio ambiente e absorção de xenobióticos (contribuindo assim para a desintoxicação do meio ambiente)	Polissacarídeos carregados ou hidrofóbicos e proteínas.
Sorção de íons inorgânicos	Promove a formação de polissacarídeos, troca iônica, formação mineral e acúmulo de íons metálicos tóxicos (assim contribuindo para a desintoxicação ambiental)	Polissacarídeos e proteínas, incluindo substituintes inorgânicos, como sulfato e fosfato.
Atividade enzimática	Permite a digestão de macromoléculas exógenas e aquisição de nutrientes e a degradação do EPS, permitindo a liberação de células do biofilme.	Proteínas.
Fonte de nutrientes	Fornecer uma fonte de carbono e fósforo contendo compostos para utilização pela comunidade do biofilme.	Potencialmente todos os componentes do EPS.
Troca de informação genética	Facilita a transferência horizontal de genes entre as células do biofilme.	DNA
Elétron doador ouceptor	Permite atividade redox na matriz do biofilme	Proteínas e possivelmente substâncias húmicas
Exportação de componentes celulares	Libera material celular e como resultado turnover metabólico.	Vesículas de membrana contendo ácidos nucleicos, enzimas, lipopolissacarídeos e fosfolípidios.
Ligação de enzimas	Resulta no acúmulo de retenção e estabilização de enzimas através de sua interação com polissacarídeos	Polissacarídeos e enzimas.

*EPS- exopolissacarídeos

Adaptado de FLEMMING & WINGENDER, 2010

Em plantas, a formação de biofilmes tem sido observada em folhas, superfície radicular e dentro dos espaços intercelulares dos tecidos vegetais (MORRIS & MONIER, 2003). Os micro-organismos se adaptaram a cada um destes microambientes, e os biofilmes formados refletem a natureza de seus locais de colonização.

Alguns micro-organismos promotores do crescimento vegetal vêm sendo estudados quanto à formação de biofilme. A bactéria diazotrófica endofítica *Azospirillum brasiliense* pode ser encontrada em raízes de trigo em forma de microcolônias ou agregados bacterianos na zona de alongamento, pêlos radiculares e tecidos internos das raízes (ASSMUS *et al.*, 1995). Em *Bacillus subtilis* já foi demonstrado sua capacidade de proteger a planta *Arabidopsis thaliana* contra a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae*, formando biofilme em suas raízes (BAIS *et al.*, 2004).

Em um estudo conduzido por BALDOTTO & OLIVARES, 2008, 50 espécies botânicas foram observadas quanto à colonização epifítica no microscópio eletrônico de varredura. Os autores evidenciaram que as maiores densidades de colonização da superfície da folha por bactérias estavam associadas à formação de biofilmes bacterianos, em sua maioria, envolvendo comunidades microbianas entre bactérias e fungos. Isto ressalta a ocorrência natural e a importância estratégica destas estruturas complexas para interação ecológica e possível papel funcional em associações ecológicas.

Aproximadamente 1-10 % dos transcritos bacterianos são diferencialmente regulados entre bactérias planctônicas e bactérias estruturadas em biofilmes (BELOIN & GHIGO, 2005; SCHEMBRI *et al.* 2003). Os padrões de expressão dos genes e do metabolismo também podem variar durante os distintos passos do desenvolvimento do biofilme (BELOIN & GHIGO, 2005; SCHEMBRI *et al.* 2003;. WEBB *et al.* 2003).

2.4 Transcriptômica

Transcriptoma é o estudo do conjunto de RNA mensageiros (mRNA) produzidos por um organismo como resultado da expressão gênica (DO AMARAL *et al.*, 2006; van VLIET, 2010). Desde o princípio da biologia molecular, cientistas têm um grande interesse na compreensão da mecânica e controle da transcrição, já que modificações nos níveis transcricionais são um dos mecanismos primários de iniciação de processos adaptativos na célula (van VLIET, 2010).

Com o advento da genômica funcional, suas diferentes tecnologias revolucionaram a compreensão da transcrição (HINTON *et al.*, 2004). Existem diversas metodologias para a análise de expressão gênica e identificação de transcritos de RNA. Dentre essas técnicas se destacam *Northern blot* (ALWINE *et al.*, 1977), *Differential Display* (LIANG & PARDEE, 1992), , *Representational Difference Analysis* (RDA) (LISITSYN *et al.*, 1993), *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) (VELCULESCU *et al.*, 1995), produção em larga escala de *Expressed Sequence Tag* (ESTs) a partir de bibliotecas de cDNA (HILLIER *et al.*, 1996), e RT-PCR quantitativo em tempo real (*Real time RT-PCR*) (LEE *et al.*, 1993; LIVAK *et al.*, 1995).

O microarranjo é uma técnica que foi bastante utilizada e permite monitorar os níveis de expressão das células abrangendo milhões de genes simultaneamente (YANG, *et al.*, 2002). Todavia, nos últimos anos os estudos de expressão gênica baseados em microarranjos estão sendo substituídos pelo sequenciamento de última geração (RNA-seq), já que esse método pode identificar e quantificar transcritos raros e sem o prévio conhecimento do gene. Também pode fornecer informações sobre *splicing* alternativo e variação na sequência dos genes identificados (METZKER, 2010). Na técnica de RNA-seq, os RNAs celulares são transformados em cDNA e submetidos a sequenciamento de alta produtividade. As sequências são mapeadas contra algum genoma para originar um mapa transcriptômico, refletindo um determinado estado celular (MARDIS, 2008).

A primeira plataforma de sequenciamento de nova geração disponível comercialmente foi o sistema GS FLX *GenomeAnalyzer* (Roche-454) (RONAGHI *et al.*, 1998). Nesse sistema as leituras são feitas por um combinado de reações enzimáticas, que têm início com a liberação de um pirofosfato proveniente da adição de um desoxinucleotídeo à cadeia. Logo depois, esse pirofosfato é transformado para ATP, pela ATP sulfúrilase, que será usado pela luciferase para oxidar a luciferina. Como resultado, um sinal de luz será capturado pela câmera *charge-coupled device* (CCD) conectada ao sistema. Nessa plataforma o tamanho dos *reads* (fragmentos curtos de sequência) é de 400 pb (CARVALHO, *et al.* 2010).

O sequenciamento na plataforma Illumina Solexa 1G *sequencer*, assim como o sequenciamento de Sanger, é realizado por síntese usando DNA

polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. O seu diferencial consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, que também é conhecido como PCR de fase sólida. O tamanho médio de *reads* obtidos é de 75-100 pb (FEDURCO *et al.*, 2006; TURCATTI *et al.*, 2008)

O sistema SOLiD (*Applied Biosystems*) (MCKERNAN *et al.* 2006) se difere dos outros processos, pois sua reação de sequenciamento é catalisada por uma DNA ligase, e não uma polimerase. O DNA alvo é mecanicamente fragmentado em tamanhos de 60- 90 pb para as bibliotecas de *tags* únicas, ou 1-10 Kb para as bibliotecas de *tags* duplas (*mate-pair*). Os fragmentos de 60-90 pb são ligados a adaptadores universais (P1 e P2) nas duas extremidades (CARVALHO, *et al.* 2010). Em cada corrida são utilizadas duas lâminas ou *chips*, cada um com capacidade atual para 100 mil microesferas. Um ponto importante desse equipamento é que, embora as microesferas sejam colocadas de forma aleatória sobre o *chip*, cada *chip* pode ser dividido em oito áreas, as quais podem ser utilizadas na análise de oito bibliotecas diferentes de forma simultânea (CARVALHO, *et al.* 2010) (Figura 2). Uma das vantagens do SoLiD é a alta fidelidade das seqüências obtidas, o que torna a tecnologia adequada para a análise de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (variação de um único nucleotídeo), e a geração de grandes conjuntos de dados (6-15 Gbp por corrida) (van VLIET, 2010).

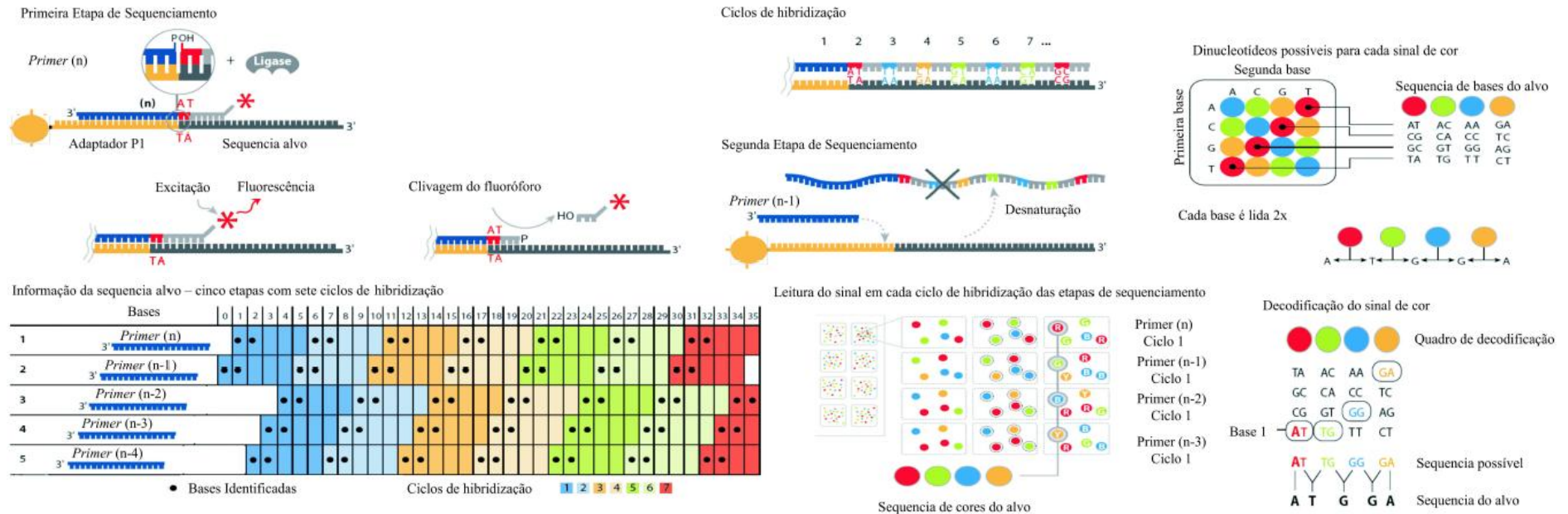


Figura 2. Plataforma SOLiD. Os fragmentos de DNA são originados e ligados ao adaptador P1, que se liga especificamente a microesfera. O sequenciamento ocorre por hibridização de sondas fluorescentes com o alvo em cinco etapas. Na primeira, o *primer* (n) é usado, liberando as bases iniciais da sequência alvo para hibridação com a sonda. Uma das sondas do *pool* encontrará similaridade e se ligará ao alvo. É feita a leitura do sinal de fluorescência, e as três últimas bases da sonda, incluindo o fluoróforo, são retiradas. O segundo ciclo de hibridação é inicializado e assim por diante, até que o alvo seja todo coberto (35 pb). A sequência fita dupla é desnaturada, e uma nova etapa de sequenciamento é iniciada com o *primer* (n-1). Ocorre uma repetição dos ciclos, provendo informação de outras bases da sequência alvo. São realizadas novas etapas de sequenciamento com os *primers* (n-2), (n-3), e (n-4) para que a sequência alvo seja toda determinada. Todas as possíveis combinações de dinucleotídeos são marcadas nas sondas com apenas quatro fluoróforos. Desse modo, duas leituras são indispensáveis de cada base para que a sequência do dinucleotídeo da sonda seja definida. O processo tem início com o conhecimento da primeira base do alvo na segunda etapa de sequenciamento (*primer* n-1), que libera para hibridação com a sonda uma base conhecida, a última base do adaptador (Adaptado de CARVALHO&SILVA, 2010).

Diversos trabalhos têm empregado o uso de sequenciamento de nova geração para visualizar a forma e complexidade dos transcriptomas bacterianos. Embora, os primeiros estudos tenham sido realizados em células eucarióticas, em função da facilidade de isolamento dos mRNAs com poli-A caudas, atualmente, as tecnologias de RNA-seq também têm sido muito aplicadas em bactérias (TADRA-SFEIR, 2011). Tais trabalhos têm se mostrado importantes para a compreensão da fisiologia bacteriana e para aprimorar o entendimento da estrutura genômica, permitindo uma melhor qualidade da anotação (PINTO *et al.*, 2011).

Passalacqua e colaboradores (2009) estudaram o primeiro transcriptoma bacteriano obtido pelo sistema SOLiD. Os transcritos de *Bacillus anthracis* foram comparativamente avaliados em diferentes fases de crescimento e condições ambientais. Os resultados forneceram um mapa preciso de elevada resolução quanto aos locais de início da transcrição, estrutura de operons e do genoma como um todo. Também foi possível aumentar a exatidão da anotação do genoma já existente e fornecer estimativas de transcrição. O estudo conseguiu demonstrar uma visão inédita da expressão gênica e regulação de uma célula bacteriana, utilizando sequências curtas de 35 nucleotídeos, mapeando cerca de 39 milhões de sequências.

Outros estudos de transcritos em bactérias foram feitos com RNA-seq. Podemos citar os trabalhos realizados com *Burkholderia cenocepacia* (YODER-HIMES *et al.*, 2009), *Listeria monocytogenes* (OLIVE *et al.*, 2009), *Neisseria gonorrhoeae* (ISABELLA & CLARK, 2011), *Staphylococcus aureus* (BEAUME *et al.*, 2011).

Em 2011, TADRA-SFEIR determinou a expressão gênica diferencial em *H. seropedicae* SmR1 através da análise por RNA-seq, utilizando o sistema SoLiD, na presença e ausência de naringenina, que é um flavonóide com importante papel na interação bactéria-plantas. Pode-se observar que dos 4.804 genes presentes no genoma da bactéria, 3.711 genes são expressos na ausência de naringenina e 3.672 genes na presença. Com isso, também foi possível uma anotação genômica mais refinada, analisando-se o começo e o final da transcrição e também autenticar ou não regiões genômicas transcritas (TADRA-SFEIR, 2011).

É indispensável conhecer as bases moleculares que regulam a interação bactéria-planta. Assim, conseguiremos maximizar as respostas positivas da planta hospedeira e contribuir para a consolidação da tecnologia de inoculação com micro-organismos na agricultura. Também reduziremos as demandas de fertilizantes minerais oriundos de recursos não-renováveis, contribuindo para a sustentabilidade dos sistemas de produção agroflorestais.

3 – HIPOTESE

Biofilmes bacterianos têm sido reconhecidos como uma das mais bem sucedidas formas de vida do planeta, com impactos importantes em diferentes domínios da ciência e tecnologia. Aspectos moleculares e fisiológicos da conversão de células isoladas em comunidades estruturadas têm sido explorados no campo da bacteriologia médica e um volume significativamente menor de informações tem sido obtido para interações bactéria-planta. Especificamente em *Herbaspirillum seropedicae*, ainda não foi elucidado o mecanismo de formação de biofilme. Portanto, a partir de abordagem transcriptômica de última geração, espera-se encontrar genes relacionados à formação e dinâmica de formação e maturação de biofilme na bactéria.

4 - OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão global dos genes envolvidos na formação de biofilme da bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* Smr1, utilizando sequenciamento de nova geração.

4.2. Objetivos Específicos

- a) Monitorar a dinâmica populacional e a cinética temporal de formação e maturação de biofilme na bactéria através de curva de crescimento na presença de lã de vidro;
- b) Avaliar a cinética temporal de adesão, agregação e formação do biofilme na presença de lã de vidro através de ensaio espectrofotométrico, utilizando cristal violeta;
- c) Avaliar a formação deste biofilme por meio de microscopia de luz;
- d) Realizar a extração do RNA total nas condições de biofilme e planctônico, precoce e tardio, respectivamente, isolar mRNA e produzir bibliotecas de cDNA para análise transcriptômica em larga escala;
- e) Analisar a expressão de genes diferencialmente expressos em biofilmes na comparação com células planctônicas, avaliando o efeito da dimensão do tempo (crescimento precoce e tardio) através do sistema SOLiD;

f) Identificar genes envolvidos na formação do biofilme *H. seropedicae*Smr1, utilizando ferramentas de bioinformática.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Bactérias, meios e condições de cultivo

A estirpe utilizada para análise do transcriptoma e avaliação da formação de biofilme foi *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 (MACHADO *et al.*; 1996). SmR1 é um mutante espontâneo resistente à estreptomicina da cepa Z78 (ATCC35893) (BALDANI, *et al.*1986), que foi isolado de raízes desinfestadas superficialmente de *Sorghum bicolor* no Brasil, em 1982.

Nos ensaios de microscopia foi utilizada a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10, que tem uma inserção transposicional do gene que codifica a *Green Fluorescence Protein*(GFP). Tal estirpe derivada de *H. seropedicae* ZA95 isolado a partir de plantas de arroz (BALDANI, *et al.*1986).

No presente trabalho foram utilizados os meios de cultivo descritos abaixo (Tabelas 2, 3 e 4). O cultivo em meio líquido foi realizado em frascos Erlenmeyer com agitação orbital (130 rpm). No meio sólido, as placas de Petri foram incubadas em estufa microbiológica. A temperatura de crescimento utilizada em ambas às condições de cultivo foi 30 °C.

Tabela 2. Meio JNFB (BALDANI, *et al.* 1986)

Ácido málico		5 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	solução 10%	6 mL
KH ₂ PO ₄	solução 10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	solução 10%	2 mL
NaCl	solução 10%	1 mL
CaCl ₂ .H ₂ O	solução 1%	2 mL
FeEDTA	solução 1,64%	4 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2mL
Vitamina para meio de cultura		1mL
KOH		4,5 g.L ⁻¹
Cloreto de Amônio		1g.L ⁻¹
pH 5,8		

Tabela 3. Meio Nutrient Broth (NB)

Caldo nutritivo	8 g.L ⁻¹
Ágar	15g.L ⁻¹

Tabela 4. Meio DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986)

Glicose	2g.L ⁻¹
Ácido málico	2g.L ⁻¹
Peptona bacteriológica	1,5 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	2 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g.L ⁻¹
Ácido glutâmico	1,5 g.L ⁻¹
pH	6,0

Tabela 5. Meio NFbHP(KLASSEN *et al.*, 1997)

Ácido málico	5,0 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g.L ⁻¹
NaCl	0,1g.L ⁻¹
CaCl ₂	0,02g.L ⁻¹
Ácido nitrilo-triacético	0,056 g.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02 g.L ⁻¹
NaMoO ₄ .2H ₂ O	2 mg.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35mg.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	2,8 mg.L ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08mg.L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4 mg.L ⁻¹
Biotina	0,1mg.L ⁻¹
Solução de fosfato:	
K ₂ HPO ₄ *	17,8g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ *	159,5 g.L ⁻¹
pH	6,5

*A mistura de fosfato foi autoclavada separadamente e adicionada fria ao meio em um volume de 50 mL.L⁻¹.

5.2. Análise da formação de biofilme

5.2.1. Monitoramento da densidade populacional

O crescimento de *H. seropedicae* Smr1 foi avaliado na presença e ausência de 0,1 g de lã de vidro utilizada como substrato físico para a formação do biofilme. Para tanto, a bactéria (estocada em água-ultra pura) foi ativada em cultivo em frasco de 50 mL contendo 20 mL de meio DYGS (Tabela 4) durante 24h. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 20 µL e a suspensão bacteriana foi inoculada em 6 frascos de 500 mL vidro (3 com e 3 sem lã de vidro) contendo 150 mL de meio JNFB líquido (Tabela 2). A cultura foi agitada por 40 h. A densidade óptica das bactérias foi medida em espectrofotômetro

(UVmini 1240) a 460nm de 4 em 4 h. A cada leitura foi feita uma diluição seriada, seguida de plaqueamento em meio de cultivo sólido NB realizado em triplicata (Tabela 3). Após o cultivo por 24 h, foi realizada a contagem das colônias referentes a cada diluição nas placas.

5.2.2- Monitoramento das etapas de desenvolvimento do biofilme

Para avaliar a cinética temporal de adesão, agregação e formação do biofilme na presença de lâ de vidro, foi realizado ensaio espectrofotométrico, utilizando cristal violeta. Tal ensaio se baseia na afinidade crescente ao corante basofílico cristal violeta como função do incremento das bactérias aderidas à lâ de vidro.

Após ativação como explicado anteriormente, uma alíquota de 20 µL da cultura bacteriana foi utilizada para aplicação em meio JNFb líquido (Tabela 2), contendo 0,25 g de lâ de vidro. No período de 0, 8,16 e 24 h após a inoculação foram colhidas amostras para quantificação do biofilme (ROUWS *et al.*, 2008). Então, o meio de cultura foi removido e a lâ de vidro corada com solução de cristal violeta 1 % durante 10 min. Após lavagem, o corante foi extraído a partir da lâ de vidro com 4mL de etanol 95 % e quantificado por medição da absorvância a 560 nm no espectrofotômetro.

5.2.3- Microscopia óptica

A análise microscópica da formação de biofilme em lâ de vidro por *H. seropedicae* foi realizada utilizando a estirpe RAM 10. Após ativação, 20 µL da cultura bacteriana foram inoculados em meio JNFb líquido (Tabela 2), contendo 0,25 g de lâ de vidro. No período de 0, 8,16 e 24 h após a inoculação foram colhidas amostras para análise no microscópio Axioplan (Zeiss) (ROUWS *et al.*, 2008). Para tal, fragmentos da lâ foram retirados, montados em uma gota de água (20µL) em lâmina e lamínula e observados no microscópio pela técnica

de contraste diferencial e interferencial (DIC) e epifluorescência (MF). As imagens foram fotodocumentadas em câmera digital Canon Power Shot A640.

5.3. Transcriptoma

5.3.1. Isolamento de RNA total

H. seropedicae SmR1 após ativação já descrita foi cultivada sob agitação constante em frasco de 50 mL contendo 20 mL de meio NFbHP (Tabela 5) nas quatro condições:

- Planctônica precoce (sem lâ de vidro) - PP;
- Planctônica tardia (sem lâ de vidro) - PT;
- Biofilme precoce (com 0,1 g de lâ de vidro) - BP;
- Biofilme tardio (com 0,1 g de lâ de vidro) - BT.

Foram cultivados dois frascos para cada condição, totalizando oito frascos.

As amostras de cultura da bactéria em suspensão utilizadas para isolamento do RNA total foram coletadas na condição planctônica em $D.O_{460nm} = 0,20$ e $D.O_{460nm} = 0,95$, respectivamente nos tempos de 5 h (precoce-PP) e 16 h (tardio-PT). Os mesmos períodos de tempo foram aplicados para extração das bactérias agregadas a lâ de vidro correspondente aos tratamentos BP e BT. Uma alíquota de 1,5 mL de cada cultura foi centrifugado a 13.400 rpm por 60 s. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de reagente Trizol[®] (Invitrogen) foi acrescentado. O homogenato ficou à temperatura ambiente por 5 min. Após esse tempo, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, misturado vigorosamente por 15 s e a amostra foi incubada por 2-3 min a temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi centrifugada (13.400 rpm, 5 min) e a fase aquosa contendo o RNA foi transferido para um novo tubo, no qual o RNA foi precipitado com 500 μ L de isopropanol, lavado com etanol 75% e ressuspensão

em 50 μL de água ultrapura livre de RNase. Em seguida, o RNA foi visualizado em gel de agarose 1% com 0,5% de β -mercaptaetanol para visualização de RNA total.

5.3.2. Tratamento com DNaseI

Para a inativação de possíveis DNases presentes no RNA total extraído, foi adicionado às amostras de RNA o tampão Dnase Buffer e 2 μL de Dnase I ($2\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). A mistura foi incubada em estufa a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida com a adição de 20% do volume da amostra de solução inativante (*DNase Inactivation Reagent*), e mantida a temperatura ambiente por 2 min (homogeneizada vigorosamente duas vezes neste período). Após incubação, a mistura foi centrifugada (13.400 rpm) por 60 s para precipitar a solução inativante. O sobrenadante, contendo o RNA, foi transferido para um novo tubo. Em seguida, um gel de agarose 1 %, livre de RNase foi feito, para analisar o RNA extraído.

5.3.3. Precipitação das amostras de RNA

As oito amostras de RNA extraído foram precipitadas com 10 % de acetato de sódio ($3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 2 % de glicogênio e 3 volumes de etanol 96 %. Na sequência, as amostras foram centrifugadas (13.400 rpm) por 15 min, o sobrenadante retirado cuidadosamente e o precipitado de RNA lavado com 500 μL de etanol 70 % gelado. Novamente, centrifugado (13.400 rpm) por 15 min, o sobrenadante retirado cuidadosamente e o precipitado seco em câmara de vácuo por 30 min e dissolvido em 15 μL de água estéril livre de RNase.

5.3.4. Isolamento de mRNA

O RNA total dissolvido em 15 μ L de água (contendo de 4 a 10 μ g de RNA) foi depletado de RNA ribossomal, utilizando o kit MICROBExpress™(Ambion). Foi adicionado 200 μ L do tampão ao RNA total e misturado no vortex. Logo após, foi acrescentado 4 μ L do Capture Oligo Mix, que foi centrifugado. A mistura foi incubada a 70 °C por 10 min para a desnaturação das estruturas secundárias do RNA, incluindo o 16S e 23S rRNAs. Depois foi feito o anelamento por 15 min de incubação a 37 °C. Feito isso, foi preparado o *OligoMagBeads*, e depois houve uma lavagem para recuperar os restantes mRNA do *OligoMagBeads* com 100 μ L de solução de lavagem a 37 °C . O *OligoMagBeads* foi ressuspendido a 37 °C por 15 min e capturado. O mRNA foi colocado em um novo tubo, e o restante dos mRNAs foram recuperados do *OligoMagBeads*, repetindo a lavagem. Então, os mRNA foram precipitados com etanol e ressuspendidos em tampão de acordo com o fabricante.

5.3.5. Construção e sequenciamento das bibliotecas de cDNA

Para a construção das bibliotecas foi utilizado \cong 500 ng de mRNA, em no máximo 8 μ L, empregando-se o kit SOLiD™ *Whole Transcriptome Analysis* (Invitrogen), de acordo com o manual do fabricante. Foram realizadas as seguintes etapas:

a) Fragmentação do mRNA

O mRNA foi fragmentado com 8 μ L água livre de nucleases, 1 μ L 10x RNase III buffer e 1 μ L RNase III (Invitrogen). Para tanto, a solução foi colocada em um termociclador (*Veriti® ThermalCycler – Applied Biosystems*) a 37 °C por 10 min. Imediatamente após a incubação, foi adicionada 90 μ L de água livre de nucleases, e em seguida o mRNA fragmentado foi colocado no

gelo por 1 h. Após a etapa de fragmentação foi feita a limpeza do RNA, utilizando o *PureLink™ RNA Micro Kit* (Invitrogen), de acordo as instruções do fabricante. Em seguida, o mRNA foi quantificado com kit *Quant-iT RNA Assay*, seguindo as instruções do fabricante e foi avaliado o tamanho e distribuição dos fragmentos. Para tanto, foi necessário:

1. Diluir o RNA para menos de 5 ng.mL^{-1} ;
2. Correr $1 \mu\text{L}$ em um *Agilent 2100 Bioanalyzer* com o kit *Chip Pico 6000 RNA*, conforme as instruções do fabricante;
3. Usar um programa de informática especializado em *2100 Bioanalyzer*, revendo a distribuição de tamanho. O procedimento de fragmentação deve produzir uma distribuição de RNA com tamanhos de fragmentos de 35 nt a várias centenas ou alguns milhares de nt, dependendo do tipo de amostra.

b) Amplificação e construção da biblioteca

Foi feita uma hibridação e ligação do mRNA, utilizando os componentes do kit *SOLiD™ Whole Transcriptome Analysis*. No gelo, foi preparada a mistura de hibridação em tubos de PCR de 0,2 mL com $2 \mu\text{L}$ de Adaptador Mix A ou Adaptador Mix B, $3 \mu\text{L}$ de solução de hibridação, $3 \mu\text{L}$ de amostra de mRNA fragmentado. A reação foi colocada em um termociclador a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min, seguido de $16 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. Então, foram colocados os reagentes de ligação do mRNA $10 \mu\text{L}$ de tampão de ligação 2x, $2 \mu\text{L}$ de mix de enzimas de ligação. Essa reação foi incubada em termociclador por 16 h a $16 \text{ }^\circ\text{C}$.

A transcrição reversa foi realizada em seguida. Em gelo, foi preparada a reação de $20 \mu\text{L}$ de RT Mix Master contendo, $13 \mu\text{L}$ de água livre de nuclease, $4 \mu\text{L}$ de tampão RT, $2 \mu\text{L}$ de Mix de dNTP e $1 \mu\text{L}$ de *ArrayScript™ Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Ainda no gelo, foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de RT Mix Master para cada tubo com $20 \mu\text{L}$ de reação de ligação. Em seguida, foi feita agitação no vortex e incubado os $40 \mu\text{L}$ da reação em termociclador por 30 min a $42 \text{ }^\circ\text{C}$.

Depois foi feito o processo de purificação do cDNA utilizando o *MinElute® PCR Purification Kit* (Qiagen), após a purificação ira ser selecionado o tamanho do cDNA utilizando gel (Novex®), ladder com 50 bp DNA e SYBR® Gold (Invitrogen). A amplificação do cDNA foi feito com 76,8 µL de água livre de nucleases, 10 µL de 10x PCR buffer, 8 µL Mix dNTP, 2 µL SOLiD™ 5 PCR Primer, 1,2 µL AmpliTaq® DNA Polymerase. Transferir 98 µL de PCR em tubos de 0,2 ml e adicionar 2 µL SOLiD 3' PCR Primer em cada tubo. Os tubos serão colocados no termociclador. Logo após, a reação de PCR o cDNA amplificado foi purificado utilizando o *PureLink™ PCR Micro Kit* (Invitrogen). Os fragmentos foram sequenciados em aparelho SOLiD 4 (Invitrogen).

5.3.6. Análise do transcriptoma

Os *reads* obtidos através do sequenciamento foram mapeados, utilizando o genoma de *H. seropedicae* (GenBank: CP002039.1) (PEDROSA, *et al.*, 2001) como referência com o auxílio do programa CLC *Genomics Workbench* 4.8. Para a análise e normalização das bibliotecas as leituras correspondente a genes de tRNA foram excluídos. A normalização das leituras foi feita pelo método de *reads per kilo base of exon model per million mapped reads* - RPKM (MORTAZAVI *et al.*, 2008), que analisa o tamanho da biblioteca, tamanho dos genes e número de leituras por gene. As análises para expressão diferencial dos genes foi feita no programa Excel®.

5.3.7. Análise dos dados

Para a análise de dados foram considerados apenas os *reads* únicos mapeados dentro da região codificadora de cada gene. A reprodutibilidade dos mesmos foi avaliada por comparação entre os valores de RPKM das replicatas da mesma condição biológica e entre duas condições biológicas por meio de teste de Coeficiente de Determinação (R^2). Os gráficos foram visualizados por meio do programa de estatística R (<http://www.r-project.org/>).

Os genes diferencialmente expressos na comparação entre as quatro condições biológicas nas comparações entre BP x BT; PP x BP; e PT x BT foram obtidos por meio de *scripts* em Perl, considerando aqueles genes que:

- 1) Apresentaram mudanças de expressão na comparação entre as condições e no mínimo duas vezes ($foldchange \geq |2|$);
- 2) Tiveram nível de significância p máximo de 0.05 ($p-value \leq 0.05$);
- 3) Genes que apresentam número de *reads* suficiente para cobrir o tamanho da sequência do gene em pelo menos cinco vezes em uma das réplicas.

Foi verificada a categoria funcional de cada gene diferencialmente expresso segundo o *Cluster of Orthologous Groups of Proteins* (COG) e obtida por meio da anotação do genoma de *H.seropedicaeSmR1* (GenBank: CP002039.1). Os gráficos da distribuição em categorias funcionais dos genes induzidos e reprimidos para cada experimento foram obtidos pelo programa R.

A contagem dos genes diferencialmente expressos (induzidos e reprimidos) comuns entre os três experimentos nas quatro condições e os respectivos diagramas de Venn foram obtidos por meio do programa VENNY (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Tais genes foram graficamente representados em cores quanto ao nível de expressão por meio do programa *MeV Multi Experiment Viewer* (SAEED *et al.*, 2006). Os genes foram agrupados através deste programa quanto a similaridade do padrão de expressão pelo método de *K-means* com os parâmetros padrão (10 grupos, 50 repetições e Correlação de Pearson).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Cinética populacional e análise da estrutura do biofilme em lã de vidro

A grande maioria do conhecimento em microbiologia é baseada em estudos de laboratório envolvendo bactérias planctônicas, com importante contribuição nos aspectos relacionados à genética, fisiologia e comportamento de micróbios. No entanto, estudos envolvendo a adesão de bactérias a diferentes superfícies revelam que elas interagem, formando biofilmes em quase toda a matéria em estado sólido presente na Terra. São encontradas colonizando tecidos de organismos vivos como na superfície de plantas, placas dentárias e próteses implantadas em pacientes, tubulações de água, casco de navios e rochas em ambiente aquático.

Com o intuito de avaliar a expressão de genes envolvidos na formação e maturação de biofilmes da bactéria *H. seropedicae* SmR1, foi realizado um ensaio em condições de laboratório para definição das condições experimentais e dos períodos de coleta para análise transcriptômica comparativa da forma de vida planctônica e em biofilme. O modelo baseou-se na bactéria crescida em meio líquido JNFb na presença e ausência de lã de vidro como suporte físico indutor de biofilme. Na figura 5 observam-se as curvas de crescimento da bactéria nas duas condições expressas pelo aumento da densidade óptica no curso do tempo. O padrão de crescimento de *H. seropedicae* no meio líquido na ausência e presença de lã de vidro foi similar entre os tratamentos (Figura 3).

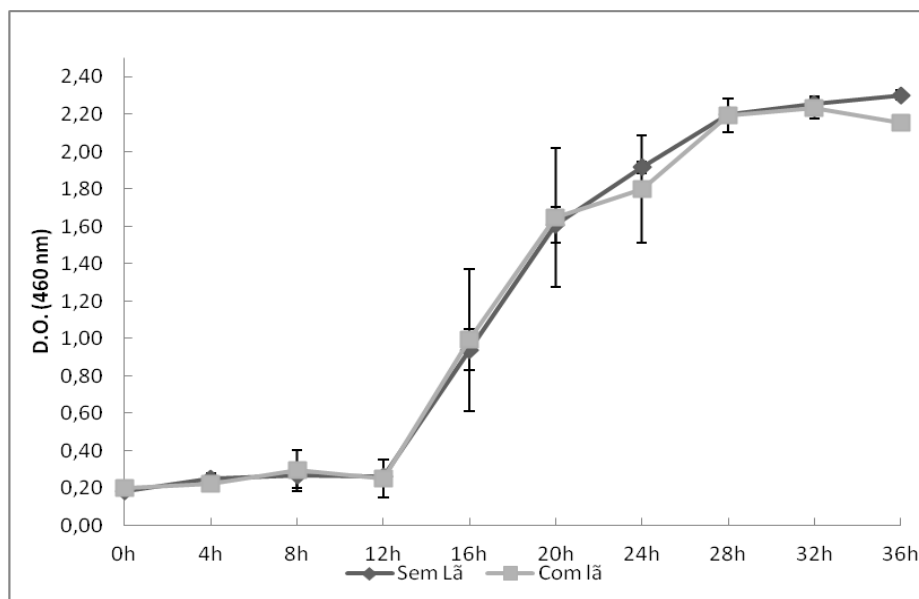


FIGURA 3. Monitoramento populacional de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. O cultivo foi realizado em meio líquido JNFb na presença e ausência de lã de vidro e expresso pela densidade óptica (D.O. a 460 nm) da cultura. Os dados representam a média de três repetições. As barras verticais indicam desvio padrão.

A análise das taxas específicas de crescimento na fase exponencial da curva de crescimento (entre 12 e 20 h) não mostram diferenças significativas entre os tratamentos, exibindo valores de $\mu_{\max} = 0,53 \pm 0,05$ e $\mu_{\max} = 0,44 \pm 0,09$, para crescimento na ausência e presença de lã de vidro no meio de crescimento, respectivamente (Figura 4). Embora não significativo, o tempo de geração da bactéria crescida na ausência da lã de vidro na fase exponencial de crescimento foi levemente inferior (1,30 h), quando comparado ao meio com a lã de vidro (1,57 h). Isto pode sugerir uma imobilização de células da bactéria na matriz da lã de vidro com reflexos não significativos nas densidades populacionais associadas a lã de vidro.

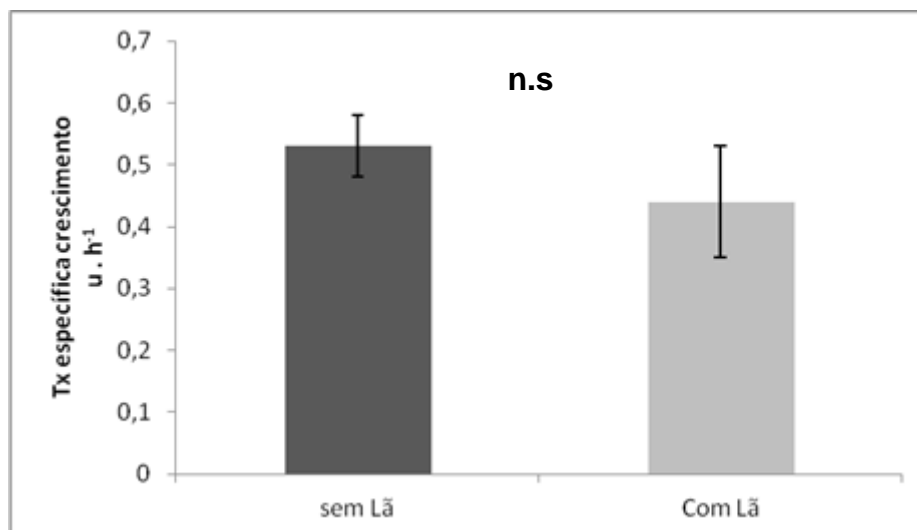


FIGURA 4. Taxas específicas de crescimento apresentadas por *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. A bactéria foi cultivada em meio líquido JNFb na ausência e presença de lã de vidro durante 36 h a 30 °C. Dados obtidos a partir de três repetições. Médias de tratamento não significativas (n.s.) pelo teste t de *student* com probabilidade de 5 %. As barras verticais indicam desvio padrão. Tx: taxa.

Na figura 5 foi observado que com a multiplicação bacteriana no meio líquido, ocorreu um aumento no número de bactérias associadas à lã de vidro, bem como aumento da agregação dessas bactérias.

A estruturação dos agregados se dá pelo recrutamento de bactérias na fase líquida e/ou pela divisão celular de bactérias aderidas a fase sólida como descrito por OLIVARES (1997) ao estudar a adesão de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em raízes de plantas de cana-de-açúcar. Os agregados com diferentes dimensões, no curso do tempo, frequentemente evoluem para biofilmes estruturados. Tais biofilmes são caracterizados estruturalmente pela produção de uma matriz polimérica extracelular rica em domínios químicos carregados negativamente (MOLIN & NILSEN, 2003), o que aumenta a afinidade e o aprisionamento do corante cristal violeta utilizado neste ensaio (Figura 5).

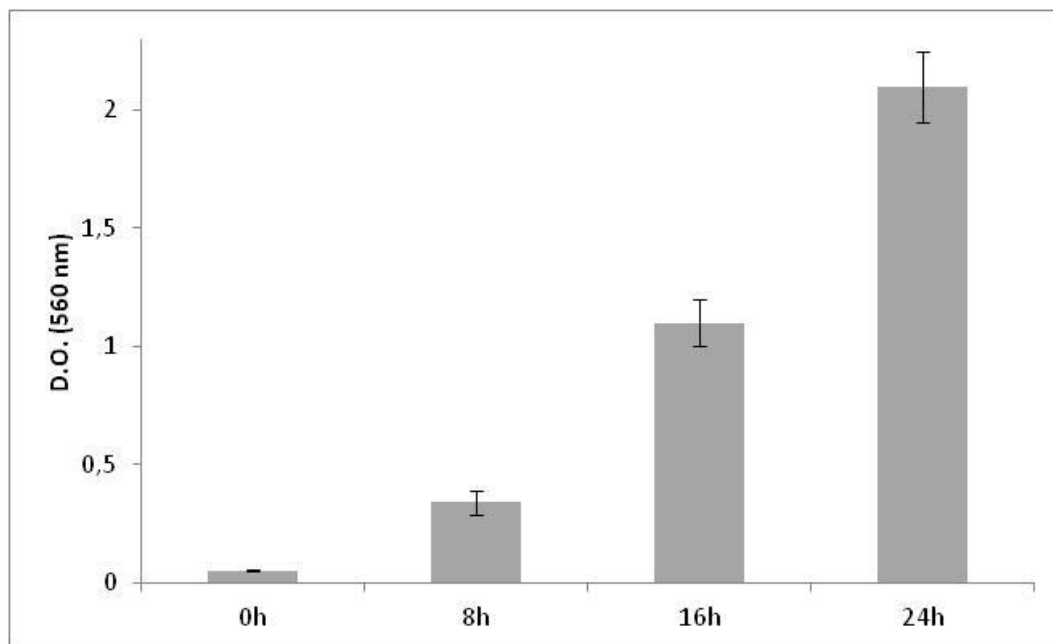


FIGURA 5. Monitoramento da cinética temporal de agregação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 em lâ de vidro. As bactérias foram cultivadas em suspensão no meio líquido JNFb na presença de lâ de vidro. Média obtida a partir de três repetições.

Estruturalmente, biofilmes observados no laboratório são similares àqueles vistos no ambiente. MONIER E LINDOW (2004) constataram que mais de 50 % das populações de bactérias associadas à superfície da folha de feijoeiro se apresentavam como agregados ou biofilmes. BALDOTTO E OLIVARES (2008), em levantamento ecológico envolvendo espécies vegetais, demonstraram que as maiores densidades populacionais de bactérias associadas à superfície das folhas representavam biofilmes complexos envolvendo também fungos. Isto sugere que a formação de biofilme é um mecanismo natural na colonização da superfície das plantas.

A figura 6 mostra os ensaios de microscopia óptica realizados com *H. seropedicae* RAM10. Pode-se observar uma relação considerável entre o ensaio de quantificação do biofilme realizado com corante cristal violeta (Figura 5) e a análise da evolução estrutural dos agregados ao longo do tempo observada pela microscopia (Figura 6). No entanto, é importante ressaltar que não existia uma sincronia temporal completa no processo de maturação dos biofilmes. Assim, em um dado tempo de coleta é possível encontrar agregados com diferentes graus de maturação. Nos períodos iniciais de experimentação

(0 a 12 h), compreendendo a fase lag do crescimento bacteriano (Figura 5), predominavam células em adesão apolar como células isoladas, monocamadas ou poucos extratos celulares com geometria plana (Figura 6A). Com a chegada da fase exponencial (12-20 h), observou-se a predominância de agregados com projeções de crescimento a partir dos sítios de agregação (Fig. 6B), evoluindo para agregados envoltos em matriz polimérica (Fig. 6C e 6D). Isto resultou em ampla distribuição de biofilmes decorridas 24 h.

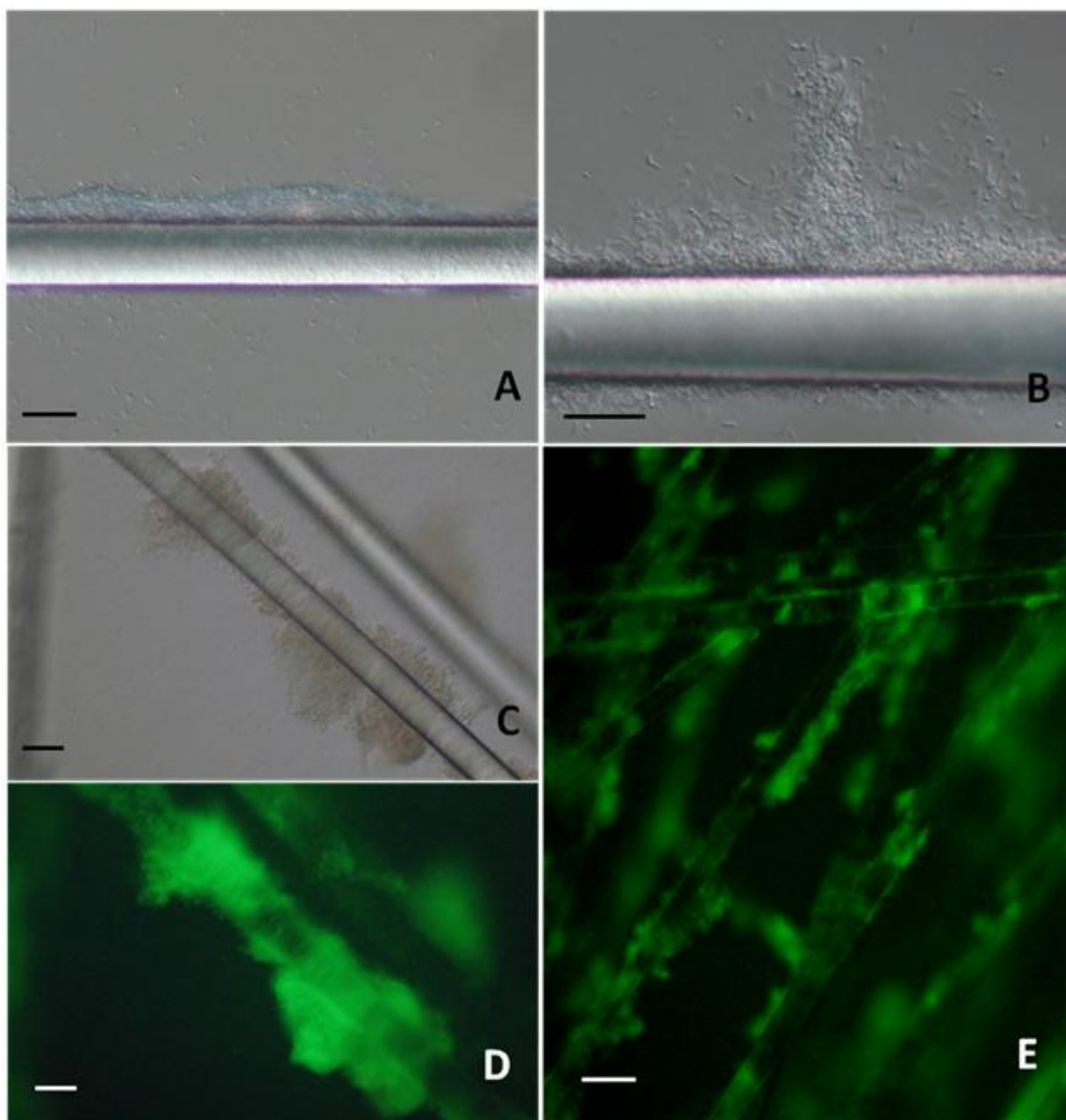


FIGURA 6. Microscopia óptica de contraste diferencial e interferência (DIC) e Microscopia de epifluorescência (MF) de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10. Foi realizado ensaio de indução de biofilme em meio de cultura JNFb líquido contendo lá de vidro como suporte físico para adesão bacteriana. Figuras A e B representam estágios crescentes da maturação de agregados bacterianos vistos por microscopia DIC. Detalhe de um agregado na forma de biofilme (notar imagem de correspondência entre C e D) e uma visão geral de biofilmes estruturados após 24 h de cultivo (visto por MF). As barras de escala representam (Fig. A e B) 25 μm , (Fig. C e D) 50 μm e (Fig. E) 100 μm .

TADRA-SFEIR (2011) em experimentos de quantificação de biofilme em *H. seropedicae*, utilizando a mesma metodologia aqui descrita, verificou que períodos de tempo acima de 24 h não resultavam em incrementos quantitativos na expressão de biofilmes. Neste mesmo estudo, a autora avaliou diferentes

mutantes de *H. seropedicae* SmR1 responsivas ao flavonóide naringenina quanto a capacidade de formar biofilmes em lã de vidro. Entre os mutantes avaliados, a estirpe MHS01 não foi afetada quanto à capacidade de formar biofilme em lã de vidro e nem tão pouco quanto à adesão a superfície das raízes de milho. No entanto, seu estabelecimento endofítico foi prejudicado em relação à estirpe selvagem. A inserção do transposon nesta bactéria causou uma mutação no gene *epsG*, relacionado com biossíntese de EPS, o que justifica o resultado encontrado e reforça o papel destes compostos na interação bactéria-planta.

Os eventos estruturais relacionados à interação entre bactérias benéficas e as raízes das plantas envolvem uma sequência similar à descrita acima para o presente modelo obtido em lã de vidro (Figura 6). Inicialmente, ocorre a adesão da célula bacteriana ao substrato, seguido pelo estabelecimento de micro-colônias e maturação em estruturas tridimensionais cobertas por uma matriz polimérica complexa (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

Como um ponto de partida para este trabalho, optamos por avaliar genes regulados na maturação dos biofilmes de *H. seropedicae* em um sistema tendo como substrato a superfície inerte da lã de vidro em meio líquido. Assim, com base na análise conjunta dos resultados obtidos (Figuras 3-5-6) e considerando um biofilme totalmente estruturado com 24 h de ensaio, decidimos avaliar a expressão de transcritos nas fases lag tardia e logarítmica, respectivamente com 5 h (designado biofilme precoce: BP) e com 16 h de ensaio (designado como biofilme tardio: BT). Como condição de comparação para o modo de vida em biofilme, o RNA das bactérias em vida livre também foi coletado nos mesmos períodos de tempo, 5 e 16 h de cultivo, caracterizando-se respectivamente células planctônicas precoces (PP) e planctônicas tardias (PT).

6.2. Prospecção de genes regulados na maturação do biofilme

6.2.1. Extração de RNA e construção da biblioteca de cDNA

O RNA total das oito amostras de *H. seropedicae* Smr1 referente às quatro condições (PP, PT, BP e BT) foi extraído. Aproximadamente $600 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de RNA foi obtido para cada uma das amostras (Figura 7).

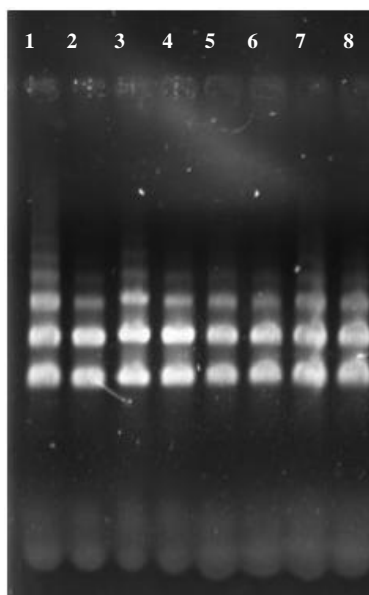


FIGURA 7. Amostras de RNA total isolados de *Herbaspirillum seropedicae*. O RNA foi extraído das culturas na forma planctônica após 5 h (precoce-PP) e 16 h (tardio-PT) de cultivo em meio líquido JNFb, e em agregados aderidos a lâ de vidro no mesmo período de tempo como biofilme precoce (**BP**) e biofilme tardio (**BT**). Na linha 1 e 2 temos as réplicas biológicas para PP, linhas 3 e 4 para PT, 5 e 6 para BP, e linha 7 e 8 para BT.

Para cada uma das amostras foi construída e sequenciada uma biblioteca de cDNA, totalizando oito bibliotecas referentes as quatro condições contendo duas réplicas biológicas. Cinquenta e seis milhões e duzentos mil e setenta milhões de leituras foram obtidas para o fenótipo planctônico PP e PT, respectivamente, bem como dois milhões e um milhão duzentos e vinte seis mil, respectivamente para PP e PT, mapeados como total de leituras únicas

para o genoma de *H. seropedicae* SmR1 (Tabela 6). No caso do fenótipo biofilme foram obtidos sessenta e sete milhões e cinquenta e um milhões e setecentos mil leituras, respectivamente, para BP e BT, e um milhão trezentos e oitenta e setecentos e oitenta e sete mil leituras únicas (Tabela 6).

Tabela 6 – Sumário dos dados de RNA-seq

Amostras	Nº de Leituras ^a	Total de Leituras por Tratamento ^a	Leituras únicas ^b	Total de Leituras Únicas	R ²
PP 1	29,9	56,2	1.011.394	2.097.790	0,9335
PP 2	26,3		1.086.396		
PT 1	41,8	70,0	720.673	1.226.307	0,9392
PT 2	27,2		505.634		
BP1	30,5	67,0	866.926	1.380.754	0,8054
BP 2	36,5		513.828		
BT 1	26,2	51,7	403.894	787.685	0,9591
BT 2	25,5		383.791		

^a Número de leituras nas réplicas biológicas x 10⁶.

^b Leituras únicas mapeadas no genoma de *H. seropedica* SmR1 usando o programa CLC Genomics Workbench 5.1.

Os parâmetros considerados foram 90 % do tamanho do gene e 80 % de similaridade.

Os números 1 e 2 referem-se a réplicas biológicas.

PP: Planctônico Precoce; PT: Planctônico Tardio; BP: Biofilme Precoce; BT: Biofilme Tardio.

A análise da qualidade dos dados por meio do coeficiente de correlação de Pearson (R) evidenciou que as réplicas biológicas da biblioteca do fenótipo planctônico e biofilme tardio possuem altos valores de correlação (> 0,93), apontando a boa reprodutibilidade das réplicas (Tabela 6). As réplicas da biblioteca de biofilmes precoce apresentam as menores correlações (R²= 0,80), sugerindo a necessidade futura de obtenção de novas réplicas técnicas.

Ao observar a Tabela 6, considerando o número total de leituras por tratamento para o fenótipo planctônico, verificamos um incremento no nível de transcrito de 20 % no período de 16 h de cultivo (PT) em relação a 5 h (PP). Isto deve refletir a cinética de crescimento da bactéria em meio líquido, que ao longo do tempo está se tornando mais ativa para iniciar a fase de crescimento exponencial, possivelmente ativando novas vias metabólicas. No caso do fenótipo biofilme ocorreu o oposto. Houve uma redução nos níveis de transcrito com o processo de maturação do biofilme equivalente a 12 %. Esta constatação reflete a dinâmica estrutural e funcional dos biofilmes, que geram

microgradientes de nutrientes e oxigênio, gradientes estratificados de atividade metabólica e aumento do ciclo de divisão de celular. Nestas condições, parte da população apresenta baixa atividade metabólica e atividade celular especializada, o que pode justificar a redução do nível de transcritos (Stewart e Costerton, 2001).

6.2.2. Análise dos dados pelo método de RPKM

As leituras do transcrito foram mapeadas em relação ao genoma de referência de *H. seropedicae* SmR1. O número de leituras únicas alcançado para cada gene foi expressa em RPKM de acordo com MORTAZANI *et al.*, (2008). Os valores de RPKM foram comparados com o intuito de avaliar a variabilidade de expressão gênica entre tratamentos. As seguintes comparações foram feitas: (a) BP x BT; (b) PP x BP; e (c) PT X BT (Figuras 8, 9, 10).

A análise da média dos coeficientes de determinação dos valores de RPKM (Figuras 10 a 12) para a expressão global de genes de todas as bibliotecas comparadas par a par (quatro comparações por condição) levaram a seguinte ordem decrescente de divergência na expressão gênica: BP x PP ($R^2 = 0,79$) > BT x PT ($R^2 = 0,83$) > BT x BP ($R^2 = 0,88$). Embora a seleção de genes diferencialmente expressos relevantes para colaborar com o entendimento da transição fenotípica planctônica para biofilme possam ser alcançados em qualquer comparação entre bibliotecas, existe mais divergência nas comparações que envolvem o efeito do modo de vida da bactéria (biofilme x planctônico) e um efeito menos significativo com relação ao tempo (5 x 16 h). Interessante que o efeito parece estar restrito a condição de biofilme, já que a comparação PT x PP fornece coeficiente médios de $R^2 = 0,38$ (dados não mostrados).

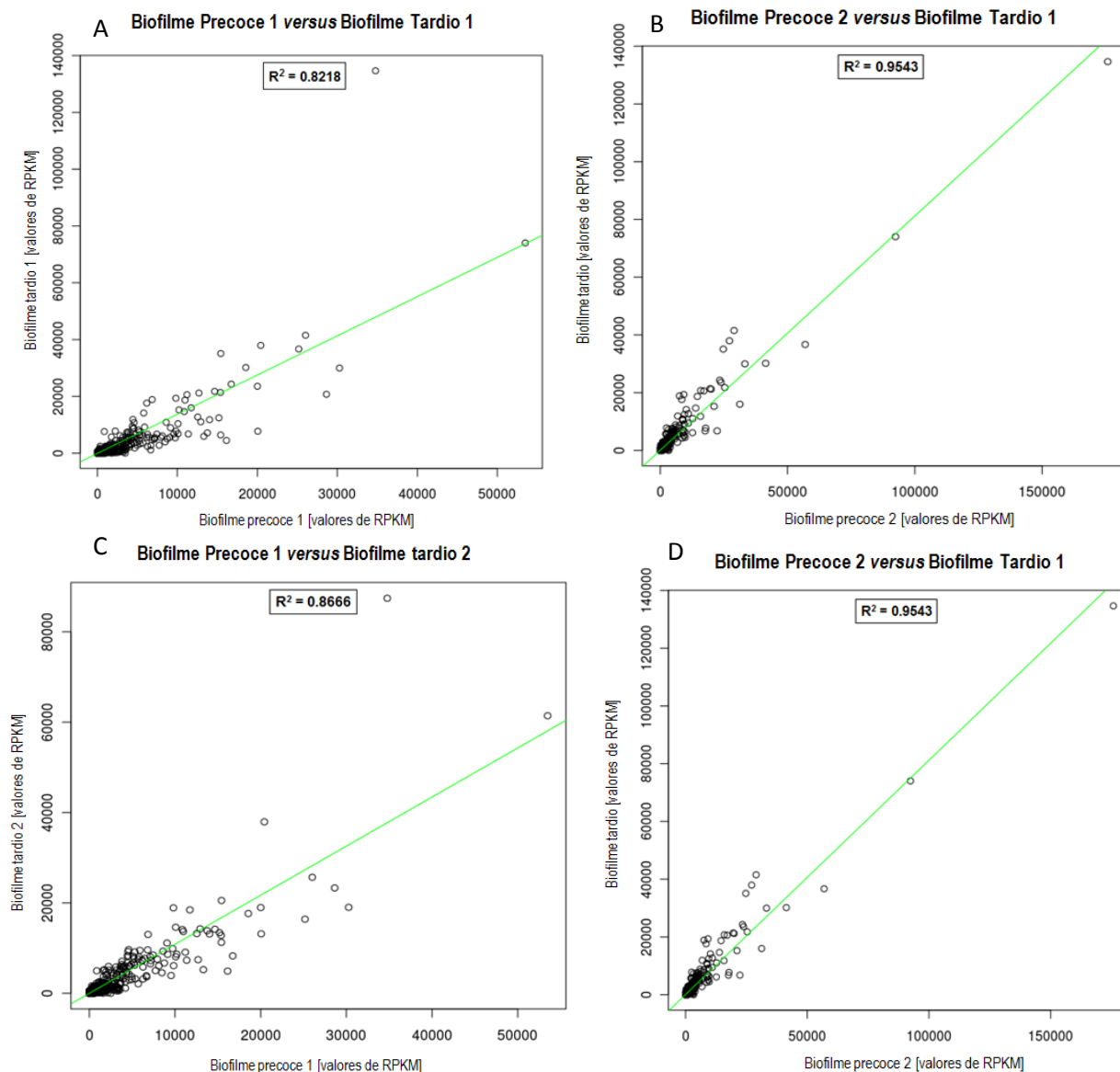


Figura 8. Análise de RPKM nas condições Biofilme Precoce e Biofilme Tardio. Os valores de RPKM de cada gene das bibliotecas de cDNA de Biofilme Precoce (BP) e Biofilme Tardio (BT) foram comparados entre si. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi obtido com cálculo por meio do script. A) BP 1 x BT 1; B) BP 2 x BT 1; C) BP 1 x BT 2; D) BP 2 x BT1.

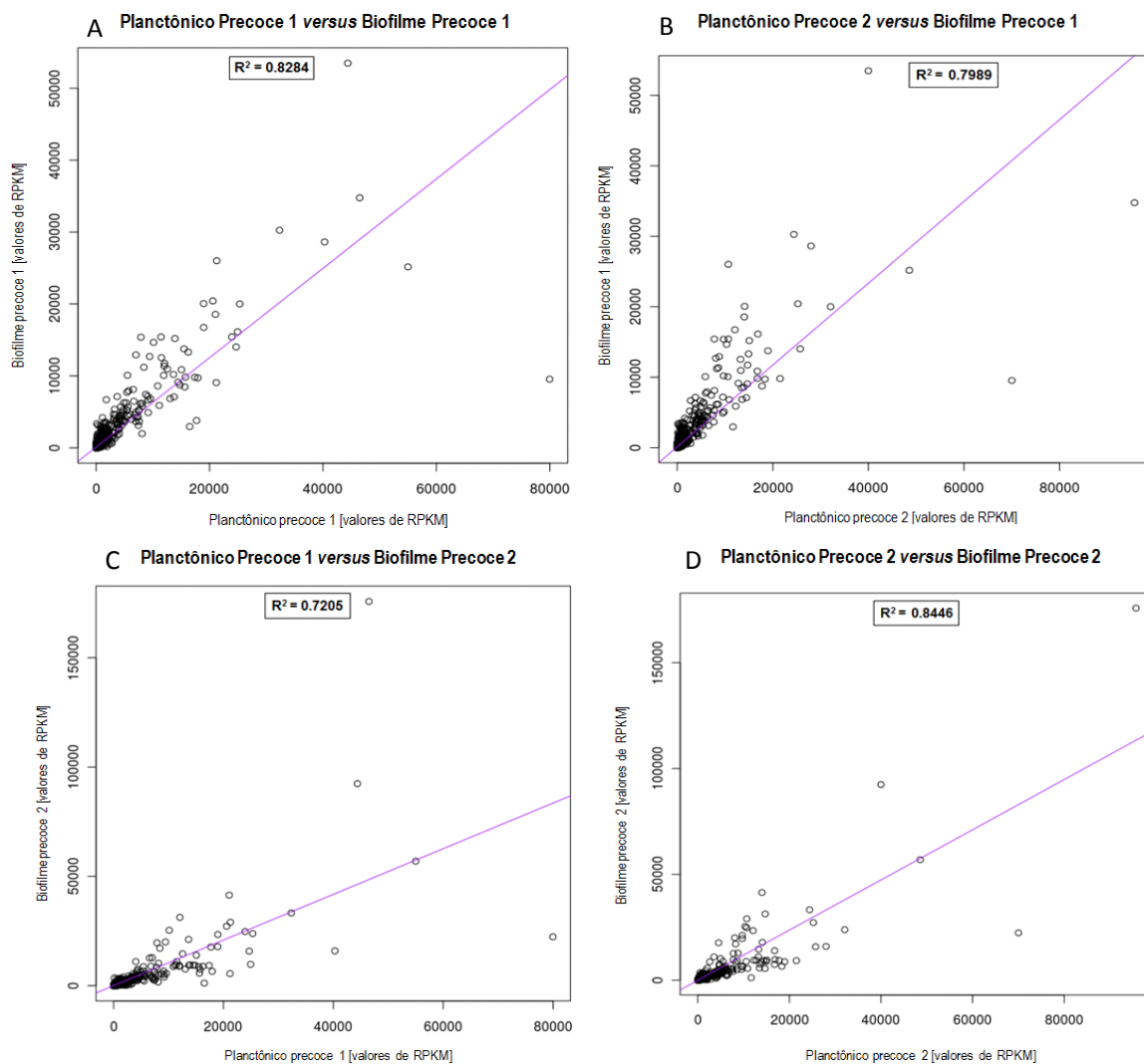


Figura 9. Análise de RPKM nas condições Planctônico Precoco e Biofilme Precoco. Os valores de RPKM de cada gene e das bibliotecas de cDNA de Planctônico Precoco (PP) e Biofilme Precoco (BP) foram comparados entre si. O valor do coeficiente de determinação (R²) foi obtido com cálculo por meio do script. A) PP 1 x BP 1; B) PP 2 x BP 1; C) PP 1 e BP 2; D) PP 2 x BP 2.

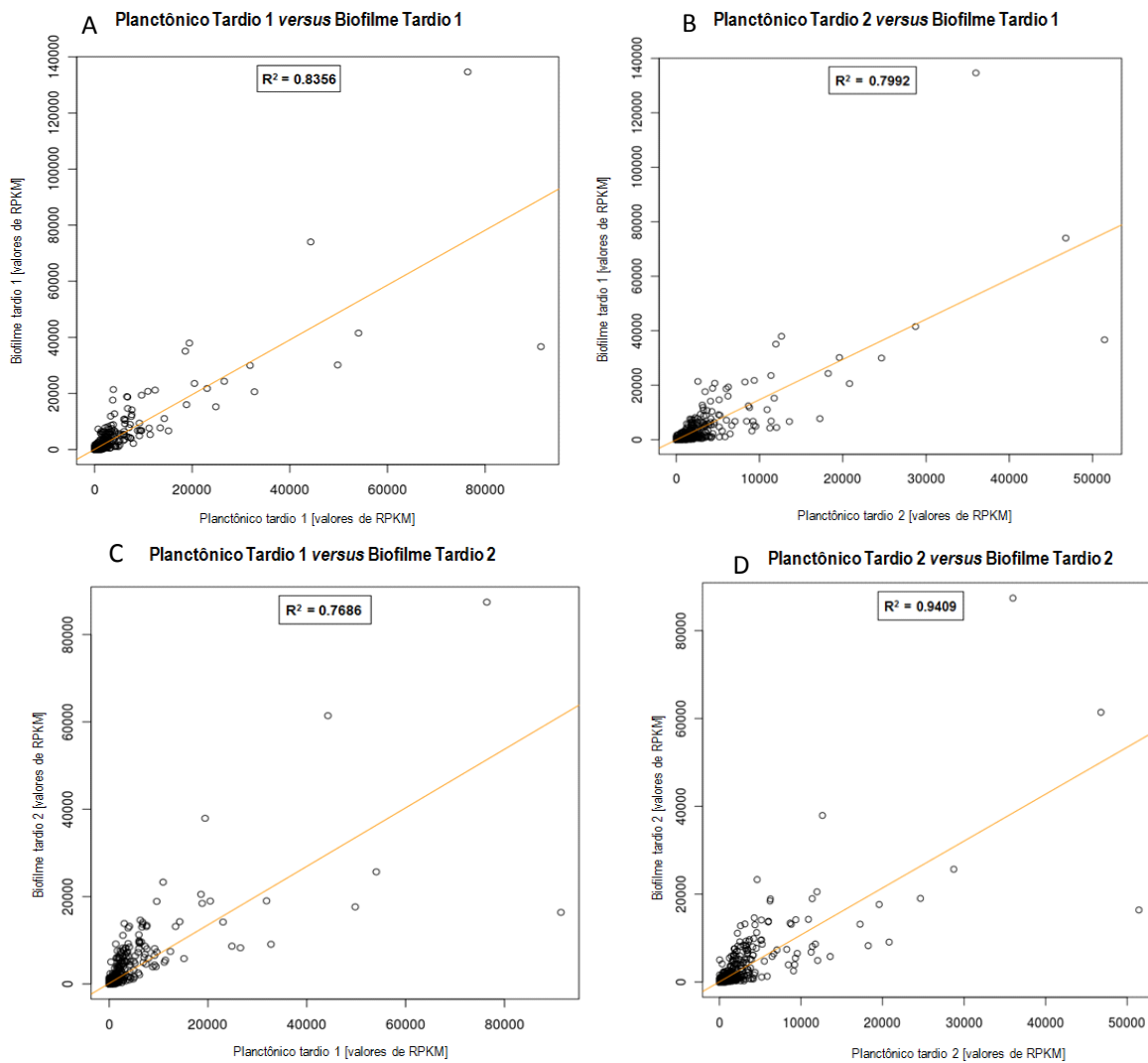


Figura 10. Análise de RPKM nas condições Planctônico Tardio e Biofilme Tardio. Os valores de RPKM de cada gene e das bibliotecas de cDNA de Planctônico Tardio (PT) e Biofilme Tardio (BT) foram comparados entre si. O valor de coeficiente de determinação (R^2) foi obtido com cálculo por meio do script. A) PT 1 x BT 1; B) PT 2 x BT 1; C) PT 1 x BT 2; D) PT 2 e BT 2.

Em um estudo conduzido por DÖTSCH *et al.*, (2012), a análise transcriptômica comparativa de *Pseudomonas aeruginosa* em culturas planctônicas e biofilmes estáticos foi avaliada. Os resultados evidenciaram que uma grande proporção dos genes foi mutuamente regulada em ambas as condições durante a fase estacionária em oposição à fase exponencial de crescimento, quando o padrão de expressão global de genes associados ao fenótipo biofilme foram claramente distintos. Isto mostra que biofilmes não são células bacterianas aderidas em fase estacionária. A formação do biofilme exige a expressão de um padrão gênico característico. Embora trabalhando com fases de crescimento planctônico diferentes, tempos e intervalos de maturação de biofilmes distintos, chegamos a resultados similares. Foi observada maior semelhança no padrão de expressão relacionado à maturidade do biofilme (BP x BT) e maior diferença em relação à biblioteca planctônica (PP x BP e PT x BT).

6.2.3. Visão global da expressão gênica

O número total de genes regulados na biblioteca de comparação BP x BT foi o menor encontrado (189). O maior número de genes diferencialmente expressos foi observado na transição do fenótipo planctônico para biofilme, (454) genes regulados na comparação entre as bibliotecas PT e BT e 329 para PP e BP (Figura 11). Isto corrobora os dados apresentados pela análise de dados pelo método de RPKM. Na figura 11 pode ser notada também a distribuição de genes induzidos e reprimidos, com clara tendência a repressão gênica na condição de biofilme maduro, como já tinha sido notado nos dados apresentados pela tabela 6, refletindo a redução do estado metabólico das células quando organizadas em biofilme.

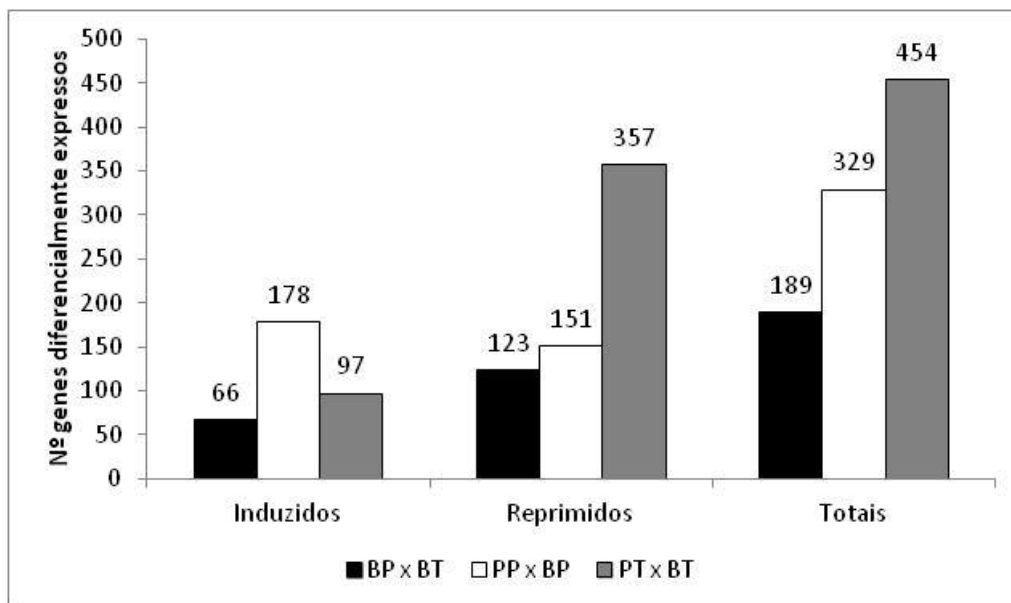


Figura 11. Distribuição global de genes diferencialmente expressos. Foram considerados genes regulados pelo processo de maturação do biofilme (bibliotecas de comparação: BP x BT) e pela transição planctônico-biofilme 5 h após o início do ensaio (PP x BP) e 16 h após o início do ensaio (PT x BT).

Na figura 12, observam-se os diagramas de Venn com o número de genes regulados característicos das três condições de comparação (PP x BP, PT x BT e BP x BT). Nas bibliotecas BT x PT, do total de 454 genes regulados, 318 são exclusivos para esta comparação com 91,2% dos genes reprimidos no biofilme maduro em relação às culturas planctônicas na fase logarítmica de crescimento e com 64% dos genes induzidos. Isto nos permite concluir mais uma vez, que a organização multicelular orquestrada pelos eventos de maturação do biofilme conduz a uma redução na atividade das bactérias. Na comparação envolvendo a maturação do biofilme (BP x BT), foram observados os menores números de genes diferencialmente expressos (189 genes) com 65% dos genes reprimidos.

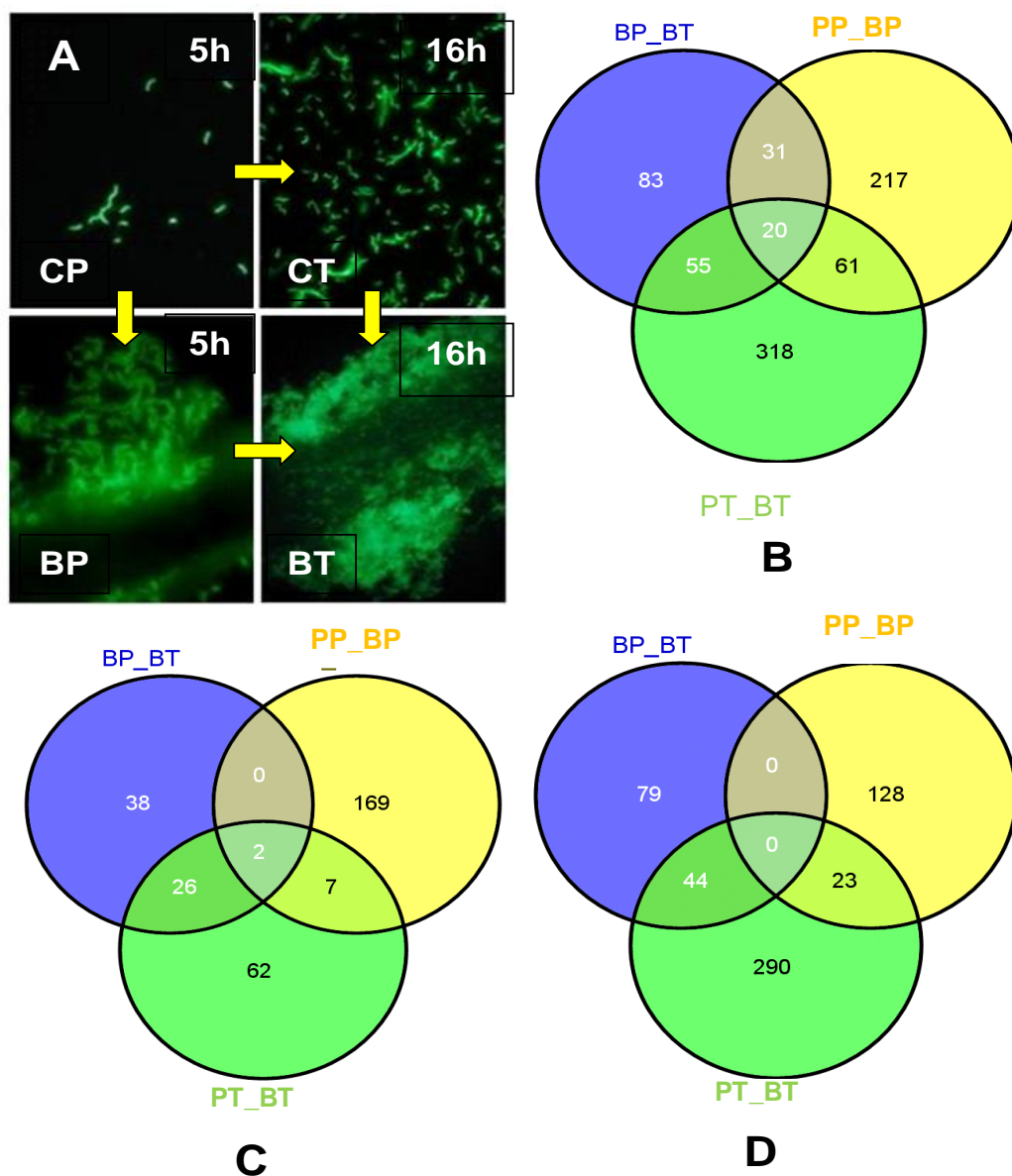


Figura 12. Infográfico com os tratamentos utilizados e comparação por RNA-seq. A: PP: Planctônico Precoce 5 h após a inoculação em meio de cultura líquido JNFb (notar poucas células no campo); PT: Planctônico Tardio 16 h após a inoculação (notar incremento da população da bactéria); BP: Biofilme Precoce com formação de agregados na superfície da lâmina de vidro após 5 h (notar células individuais em processo de adesão ao substrato; BT: Biofilme Maduro (notar sinal verde fluorescente intenso e a impossibilidade de identificar células isoladas em função da presença da matriz de EPS, foto tirada com 24 h); **B, C D:** Diagrama de Venn mostrando os genes exclusivamente expressos em cada tratamento e compartilhados entre bibliotecas, sendo genes totais diferencialmente expressos em B; genes induzidos em C e genes reprimidos em D.

Foi realizada uma distribuição dos genes regulados em relação à categoria funcional segundo classificação do COG. A figura 13 representa os genes induzidos para as três comparações conduzidas no presente trabalho. Tais genes estão com maior frequência envolvidos com Mecanismos de defesa (V), Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários (Q), Modificação pós-traducional, enovelamento de proteínas, chaperonas (O), Transporte e metabolismo de lipídios (I), Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo (D) e Produção e conversão de energia (C).

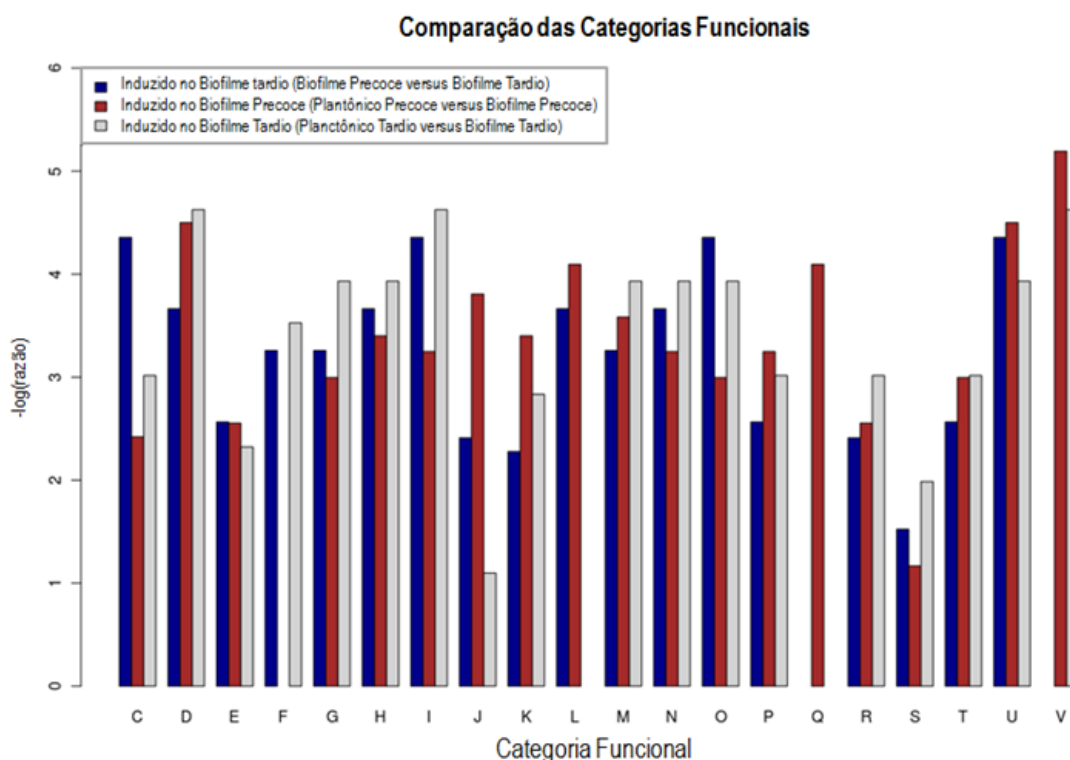


Figura 13. Distribuição dos genes induzidos segundo à categoria funcional (COG). Os valores no eixo Y correspondem à porcentagem de genes regulados em cada categoria. C) Produção e conversão de energia; D) Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo; E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; G) Transporte e metabolismo de carboidratos; H) Transporte e metabolismo de coenzimas; I) Transporte e metabolismo de lipídios; J) Tradução, estrutura e biogênese ribossomal; K) Transcrição; L) Replicação, recombinação e reparo de DNA; M) Parede celular; N) Motilidade celular; O) Modificação pós-traducional, enovelamento de proteínas, chaperonas; P) Transporte e metabolismo de íons inorgânicos; Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; R) Função geral predita apenas; S) Função desconhecida; T) Mecanismos de transdução de sinal; U) Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas e V) Mecanismos de defesa.

Biofilmes são extremamente importantes para a persistência e viabilidade de microrganismos em diversos ambientes (CLONTS, 2008), o que justifica a ativação dos mecanismos de defesa neste fenótipo (Figura 13). As células em biofilmes são mais resistentes a diferentes estresses bióticos e abióticos quando comparadas às células livres (CLONTS, 2008).

Um dos mecanismos que opera na direção da resistência reside na formação de uma matriz complexa majoritariamente formada por EPS, que funciona como uma barreira à difusão de compostos antimicrobianos (CLONTS, 2008). Contudo, as análises de expressão gênica diferencial revelaram que os genes relacionados à síntese de polissacarídeos de superfície foram reprimidos durante o processo de maturação do biofilme. Embora, aparentemente paradoxal, este resultado pode indicar que outras classes de polissacarídeos sintetizados por proteínas de função hipotéticas presentes no genoma podem estar envolvidas com a estruturação do biofilme de *H. seropedicae*, diferente da composição química do EPS amplamente reportada em estudos envolvendo células planctônicas. Ressalta-se que nos estudos de TADRA-SFEIR (2011), a mutação no gene *epsG* (relacionado com biossíntese de exopolissacarídeos) não alterou a formação de biofilme.

A categoria funcional que envolve genes de biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários só foi induzida na comparação planctônico precoce X biofilme precoce (Figura 13). Já no gráfico dos genes reprimidos (Figura 14), tal categoria encontrou-se reprimida para as três comparações. Em *Staphylococcus aureus*, a adesão é diminuída no período de incubação. Acredita-se a produção de metabólitos secundários afete negativamente a adesão por um tempo. Alguns estudos mostram que a produção e o acúmulo de metabólitos secundários tóxicos podem iniciar o processo de morte bacteriana e a desintegração do biofilme (VERMELHO,2007; FREITAS *et al.*, 2010).

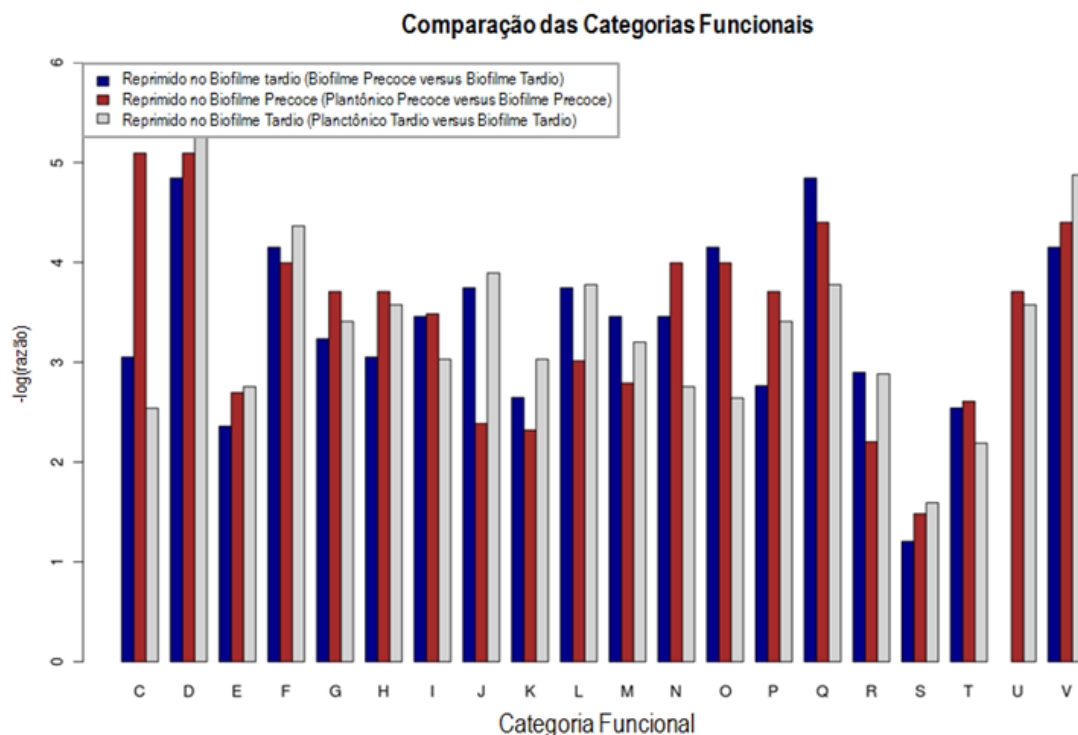


Figura 14– Distribuição de genes reprimidos segundo à categoria funcional (COG). Os valores no eixo Y correspondem à porcentagem de genes regulados em cada categoria. C) Produção e conversão de energia; D) Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo; E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; G) Transporte e metabolismo de carboidratos; H) Transporte e metabolismo de coenzimas; I) Transporte e metabolismo de lipídios; J) Tradução, estrutura e biogênese ribossomal; K) Transcrição; L) Replicação, recombinação e reparo de DNA; M) Parede celular; N) Motilidade celular; O) Modificação pós-traducional, enovelamento de proteínas, chaperonas; P) Transporte e metabolismo de íons inorgânicos; Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; R) Função geral predita apenas; S) Função desconhecida; T) Mecanismos de transdução de sinal; U) Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas e V) Mecanismos de defesa.

No gráfico da categorização dos genes reprimidos (Figura 14), a categoria de Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo (D) teve a maior porcentagem de genes regulados. Isto é corroborado pelas grandes diferenças no padrão de expressão gênica observada entre as condições planctônica tardia x biofilme tardio, que sugerem que o ciclo de divisão celular pode ser diminuído com o biofilme maduro.

Os genes regulados nas diferentes condições do presente trabalho também foram agrupados em relação ao nível de expressão. Tal agrupamento

foi dado de acordo com a similaridade do padrão de expressão pelo método de *K-means*. Deste modo, foram obtidos 10 grupos com diferentes níveis de expressão gênica. No anexo 1, apresentamos a lista de genes diferencialmente expressas para as três condições.

Passamos agora a apresentar e discutir apenas o conjunto de genes regulados simultaneamente nas três condições de comparação. Os outros genes relevantes para bibliotecas específicas em comparações simples ou duplas serão alvo de estudos futuros, onde serão ainda incorporadas análises de réplicas técnicas (já realizadas) que apresentaram problemas de reprodutibilidade, bem como a análise dos genes envolvidos na cinética temporal do fenótipo planctônico (comparação PP x PT).

6.2.4. Genes diferencialmente expressos envolvidos com quimiotaxia, flagelo e produção de EPS

Dos 4.804 genes presentes no genoma de *H. seropedicae* Smr1, considerando simultaneamente as três condições de comparação (BP x BT, PP x BP e PT x BT), foram encontrados genes diferencialmente expressos que estão envolvidos com o fenômeno de quimiotaxia, montagem do flagelo e formação de EPS (Tabela 7).

Tabela 7. Genes diferencialmente expressos no transcriptoma para as três condições de comparação.

Nome do Gene	Foldchange PPxBP	Foldchange PTxBT	Foldchange BPxBT
<i>tar</i>	2,31	1,01	-2,94
<i>tsr</i>	2,28	1,22	-1,21
<i>cheW</i>	1,22	-12,87	-1,09
<i>cheB</i>	-5,33	-6,58	2,22
<i>cheY</i>	16,73	-154,37	-166,00
<i>cheR</i>	8,74	-8,24	-3,47
<i>cheD</i>	4,14	79,19	18,42
<i>cheA</i>	-1,60	-6,49	-1,16
<i>fliQ</i>	-9,46	-35,45	2,40
<i>fliO</i>	4,03	-14,14	-2,97
<i>fliP</i>	-1,90	-15,41	-8,93
<i>fliT</i>	-4,86	-2,06	2,91
<i>epsB</i>	1,28	7,89	2,09
<i>epsH</i>	-2,19	-3,43	-2,00

Fold Change: quantas vezes o gene foi induzido (valores positivos) ou reprimido (valores negativos) na comparação entre as bibliotecas.

Os eventos de quimiotaxia têm início com a ligação de moléculas a receptores na membrana plasmática. Os genes *tar* e *tsr* codificam estes quimiorreceptores. Tais genes são conhecidos como codificantes de *Methyl-accepting Chemotaxis Proteins* (MCPs), que são proteínas reversivelmente metiladas. As MCPs são homodímeros, que atuam como locais do início da transdução de sinal (FALKE et al, 1997; MOWBAY E SANDGREEN, 1998). Para tanto, apresentam um domínio citoplasmático, que é altamente conservado entre espécies (MORGAN et al., 1993). Esses genes foram identificados em *Escherichia coli*, atuando na transdução sensorial (STEWART & DAHLQUIST, 1987; HAZELBAUER, 1988). SOARES e colaboradores (2004) encontraram 41 genes que codificam MCPs, desses 13 são *tsr* e 15 *tar*. A abundância de receptores específicos de quimiotaxia varia entre as espécies. Os genes *tsr* e *tar* são os mais encontrados (HAZELBAUER & HARAYAMA, 1983). Nossos resultados mostram que esses genes foram reprimidos em biofilme tardio, mostrando que a quimiotaxia é diminuída nesta condição.

Os genes *cheA*, *cheB*, *cheD*, *cheR*, *cheY* e *cheW* também estão envolvidos na via de transdução de sinais da quimiotaxia. Os receptores MCPs formam complexos ternários de sinalização com proteínas citoplasmáticas como CheA, uma histidina quinase que controla a concentração de CheY e

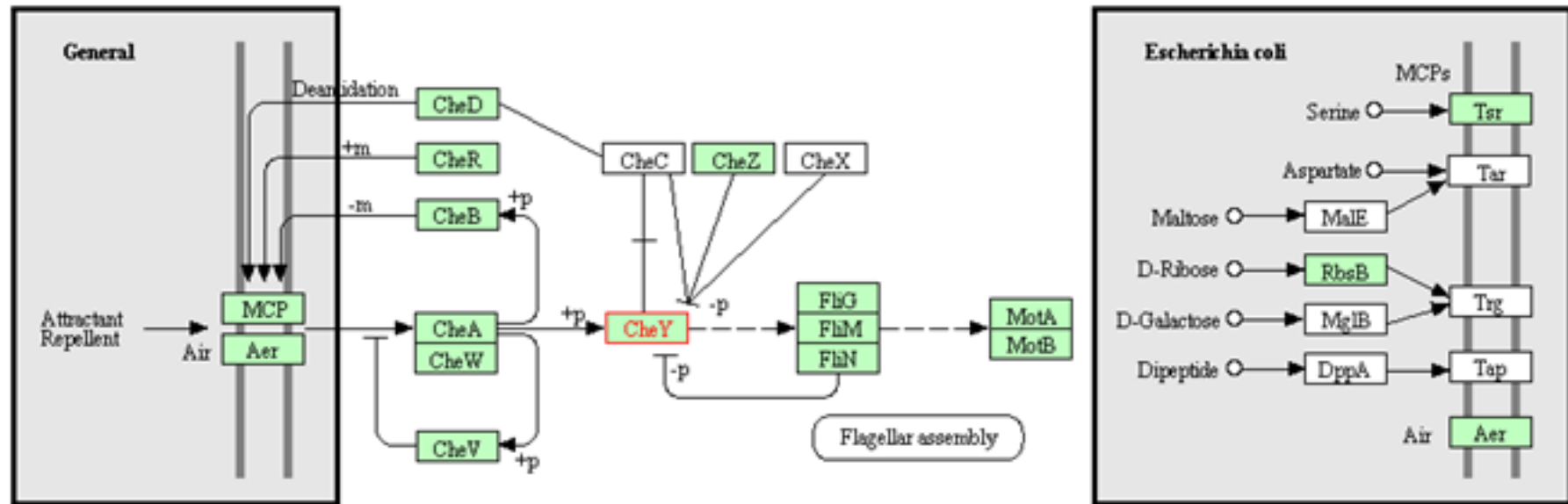
CheB fosforilada. CheY é uma pequena proteína de domínio único, um regulador de resposta, que após fosforilação liga-se ao componente de FLiM do aparato flagelar, induzindo a rotação (WELCH *et al.*, 1993). CheB atua em conjunto com CheR, uma metiltransferase, e ambos estão envolvidos no processo de adaptação. CheR é uma enzima que transfere os grupos metil a partir de moléculas de S-adenosilmetionina para resíduos de glutamato nos domínios citoplasmáticos das MCPs, realizando a metilação reversível destas proteínas, enquanto CheB é responsável pela desmetilação (SPRINGER & KOSHLAND Jr., 1977; WU *et al.*, 1996). A função de CheW ainda não é totalmente clara. Esta proteína é essencial para a formação do complexo ternário, CheA-CheW-MCP.

Os genes *CheB*, *CheW*, *CheR* foram reprimidos em biofilme tardio quando comparado ao planctônico tardio. Já *CheD* foi fortemente induzido em biofilmes maduros tanto na comparação com planctônicas quanto biofilmes precoces, indicando ser relevante no processo de maturação do biofilme de *H. seropedicae*.

Até o trabalho de ORDAL e colaboradores (2002), a função da proteína CheD ainda não tinha sido totalmente elucidada. O trabalho feito com *Bacillus subtilis* mostra homólogos de CheD dessa bactéria encontrados em operons de quimiotaxia semelhante em um grande número de bactérias e archaeas (SOARES *et al.*, 2004). Isto sugere que CheD desempenha um papel importante na quimiotaxia e transdução sensorial para muitos organismos. Os autores mostraram que CheD catalisa hidrólise da amida de cadeias laterais específicas de glutaminil do quimiorreceptor McpA. Além disso, há evidência de que CheD desamina outros quimiorreceptores incluindo McpB e McpC, que são locais de início da transdução de sinal.

CheY foi reprimido em condições de biofilme tardio e expresso em biofilme precoce na bactéria *H. seropedicae*. Isso pode ser explicado pelo fato da proteína CheY apresentar uma afinidade com a proteína FLiM, quando fosforilada por CheA-P, o que ativa a rotação do flagelo. Tal estrutura responsável pela motilidade celular é de grande importância durante a formação do biofilme (FRANCO *et al.*, 2010; BREN & EISENBACH, 2000). No entanto, a medida que o biofilme cresce, a motilidade parece ser perdida ou, pelo menos, reduzida, provavelmente porque é necessário estabilizar os

agregados celulares e otimizar o investimento dos recursos (GUTTENPLAN & KEARNS, 2012; ABSALON et al., 2011). Na figura 17 está representada a via de regulação de quimiotaxia em *H. seropedicae*, utilizando o *Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes* (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>).



02030 7/6/10
(c) Kanehisa Laboratories

Figura 15. Via de quimiotaxia. Os quadrados na cor verde são os genes presentes em *Herbaspirillum seropedicae*. No quadro a esquerda, uma representação da via consensu para as bactérias em geral. Do lado direito, estão os genes presentes em *Escherichia coli*.

Os genes diferencialmente expressos encontrados no presente trabalho, que são envolvidos com motilidade foram: *fliQ*, *fliP*, *fliO* e *fliT*. Esses genes participam na biossíntese e funcionamento da estrutura flagelar (MATSUMURA *et al.*, 1994). O flagelo bacteriano é um das mais notáveis estruturas na natureza. É sua complexa auto-organizável, que permite as bactérias se locomoverem no ambiente. O flagelo é um filamento longo e fino que se projeta a partir do corpo da célula, estabilizado pelo corpo basal .

Existe uma relação entre o flagelo é o T3SS, outra maquinaria complexa que permite as bactérias gram-negativas conduzirem proteínas efetoras dentro de células hospedeiras eucarióticas (GALA´N & COLLMER 1999; CORNELIS & VAN GIJSEGEM 2000; CORNELIS 2006; GALA´N & WOLF-WATZ, 2006). Os T3SS são implantados em dois contextos distintos funcionalmente: na biossíntese do flagelo bacteriano e da seringa molecular, que medeia à circulação das proteínas efetoras (MACNAB ,2004; MACNAB ,2003; JOURNET *et al.*,2005; MOTA *et al.*, 2005; TOBE, *et al.*,2006). . Tais proteínas subvertem o sistema imune do organismo hospedeiro para consolidar a colonização (PALLEN & GOPHNA,2007). Existe uma grande conservação de cerca de 20 proteínas necessárias para formação flagelar, sendo que cerca de metade são claramente conservadas no aparato de injeção do T3SS (ERHARDT *et al.*,2010). Vale lembrar, que no genoma de *H. seropedicae* SMr1 foram identificados 13 genes codificantes de proteínas hipotéticas, que podem fazer parte do aparelho ou codificar para efetores (PEDROSA *et al.* 2011).

O gene *fliO* foi reprimido em biofilme precoce e tardio nas comparações com a bactéria nas condições planctônicas precoce e tardia, respectivamente. A proteína FliO não apresenta uma distribuição frequente em bactérias e sua função é desconhecida, o que sugere que um papel especializado nos organismos onde está presente. (BARKER *et al.*,2010). Alguns trabalhos relatam que quando esse gene é silenciado, a motilidade da célula é comprometida. Isto foi mostrado por BARKER e colaboradores (2010), que realizaram uma análise mutacional de FliO em *Salmonella sp.* para determinar se a proteína é ou não é essencial para a montagem flagelar. O resultado da mutação foi uma diminuição na atividade do flagelo, porém não deixava as células completamente imóveis. Neste ensaio, algumas células recuperaram sua motilidade com uma mutação em outro gene, *fliP*. E assim, foi visto, que

FliO tem um papel importante na manutenção da estabilidade da FliP, que é um membro altamente conservado do aparelho de secreção. O gene *fliP* assim como *fliO* foi reprimido em biofilme precoce e tardio nas comparações com a bactéria nas condições planctônicas precoce e tardia, respectivamente. Esses resultados corroboram os resultados anteriores, já que a motilidade em biofilmes maduros é diminuída.

O gene *fliQ* codifica proteínas de membrana que atuam em uma etapa precoce da biogênese flagelar. FliQ pertence a uma família de proteínas envolvidas na exportação de fatores de virulência em bactérias patogênicas. Mutações neste gene não impõem defeitos na montagem dos flagelos, e não comprometem o ciclo de divisão celular (ZHUANG & SHAPIRO, 1995; XU *et al.*, 1989).

No presente trabalho, *fliQ* foi reprimido na condição planctônica precoce quando comparada ao biofilme precoce. Uma explicação para isso fica evidente no trabalho de KLAUSEN e colaboradores (2003). Ao estudarem o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, foi observado que os flagelos não são essenciais para sua. Quando *fliQ* foi comparado entre as condições planctônica tardia em relação ao biofilme maduro também foi verificado repressão, o que indica que a motilidade parece ser perdida ou, pelo menos, reduzida (GUTTENPLAN & KEARNS, 2012; ABSALON *et al.*, 2011). Já na comparação biofilme precoce em relação ao biofilme tardio o gene foi induzido. Esse evento pode ser respondido pelo fato de que quando o biofilme alcança uma determinada massa crítica e o seu equilíbrio dinâmico é adquirido, os grupos mais externos do biofilme começam a desprender células se dispersando no meio, agora em estado planctônico, permitindo novos ciclos de colonização e formando novos biofilmes em diferentes lugares. Há três formas de dispersão: a expansiva, quando parte das células de uma microcolônia sofre lise e outra se torna móvel, sendo desprendida da estrutura; fragmentação, quando amostras de matriz extracelular agregadas a microrganismos são liberadas; e superficial, que ocorre pelo crescimento do próprio biofilme como um todo (KYAW, 2008). Então, havendo crescimento do biofilme, ocorre divisão celular e as bactérias voltam a ser móveis, de modo que os flagelos precisam ser formados novamente, justificando uma regulação positiva desse gene em biofilmes maduros.

Outro gene diferencialmente expresso encontrado em nosso estudo foi *fliT*, que apresentou padrão de regulação similar a *fliQ* que nas comparações planctônico precoce em relação a biofilme precoce e planctônico tardio em comparação com biofilme precoce esse gene foi reprimido. Já na comparação biofilme precoce em relação ao tardio foi induzido. Esse gene foi estudado em *Salmonella*, sendo encontrada duas funções para a proteína FliT: a atuação como um regulador e transportador de chaperonas (FRASER et al.,1999;KUTSUKAKE et al.,1999; BENNETT et al.,2001). Na sua função de transportador de chaperonas, FliT interage diretamente com várias proteínas flagelares, impedindo a sua pré-maturação e a agregação no interior do citoplasma bacteriano, facilitando a montagem flagelar (FRASER et al.,1999;IMADA et al.,2001). Na figura 18, através do KEGG, podemos analisar a estrutura flagelar de *H.seropedicae*.

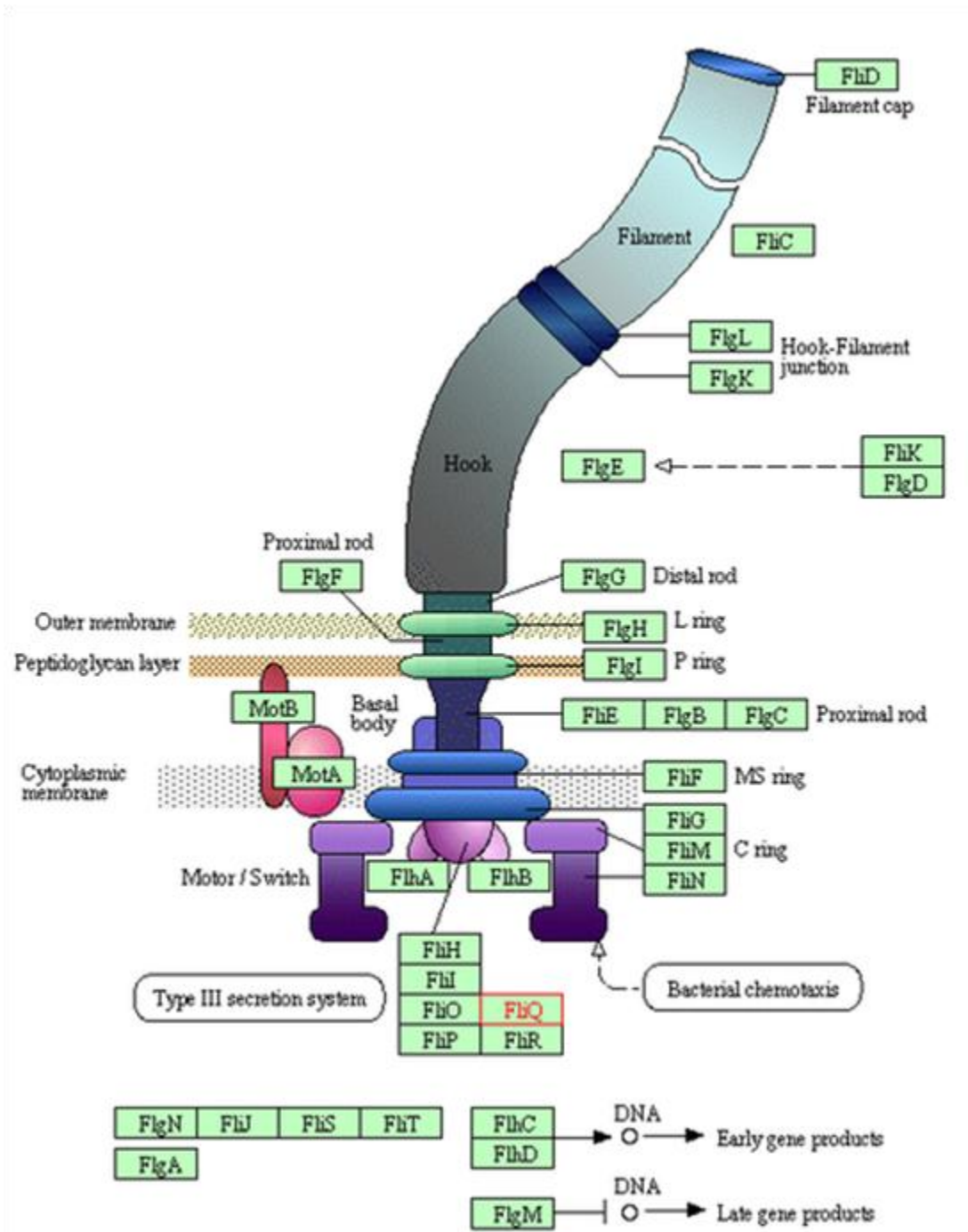


Figura 16. Estrutura flagelar de *H. seropedicae*

Exopolissacarídeos (EPS) são um dos principais constituintes da matriz do biofilme (WATNICK & KOLTER, 2000). Alguns genes envolvidos com a síntese de EPS foram diferencialmente expressos no presente trabalho, entre eles, *epsB* e *epsH*.

O gene *epsB* é essencial na síntese de EPS, como mostrado por GROOT & KLEEREBEZEM (2007). Os autores realizaram análises do papel da proteína EpsA na regulação da produção de EPS em *Lactococcus lactis*. Os dados apresentados mostram que a biossíntese de EPS em *L. lactis* requer a expressão dos genes *epsB* e *epsA*. A deleção dos mesmos levou a uma perda completa da produção de EPS, indicando que tais genes são essenciais para a biossíntese de EPS em *L. lactis*. No nosso trabalho, *epsB* foi induzido em todas as condições testadas em *H. seropedicae*, mostrando que produção de EPS é importante na constituição do biofilme. Contudo, o gene *epsH* foi reprimido nas mesmas condições. EpsH é uma proteína de membrana putativa com oito segmentos transmembranares e é encontrado dentro de uma região gênica envolvida na biossíntese de exopolissacarídeos (HAFT *et al.*, 2006). YOSHIDA e colaboradores (2003) realizaram uma mutação em *epsH*, tendo sua função interrompida na bactéria *Methylobacillus* sp. 12S. O trabalho revelou que sua expressão não afeta a produção de metalonano, um exopolissacarídeo cuja síntese depende então dos genes vizinhos. Portanto, talvez o mesmo ocorra em *H. seropedicae*, justificando a repressão deste gene em todas as condições estudadas. Para confirmação desta hipótese, são necessários ensaios posteriores de caracterização de EPS e silenciamento gênico na bactéria.

7. Conclusões

- Os ensaios de microscopia permitiram verificar que em 24 h *H. seropedicae* SmR1 já se encontra em biofilme e a curva de crescimento mostrou que não há diferença no desenvolvimento da bactéria crescida sem e com lã de vidro. Deste modo, a escolha do modelo para obtenção do biofilme foi eficiente;
- Através do transcriptoma realizado de *H. seropedicae* SmR1 em condições de biofilme, foi possível identificar um padrão global de repressão gênico comparado ao modo de vida planctônico;
- Foi observado que no desenvolvimento dos biofilmes os genes envolvidos na quimiotaxia e montagem flagelar desempenham papel importante assim como genes envolvidos na via de produção de EPS;
- A elucidação do mecanismo de ação destas proteínas durante o desenvolvimento do biofilme necessita a realização de mais experimentos como por exemplo de silenciamento gênico.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSALON, C.; VAN DELLEN, K.; WATNICK, P.I. A Communal Bacterial Adhesin Anchors Biofilm and Bystander Cells to Surfaces. **PLoS Pathogens**, v.7, p.1-15, 2011.

ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.74, p.5350-5354, 1977.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.38, p. 145-180, 2000.

ARRUDA, L.M. Seleção e Caracterização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Milho Cultivadas no Rio Grande do Sul. 58p (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2012.

ASSMUS, B.; HUTZLER P.; KIRCHHOF G.; AMANN, R.; LAWRENCE, J.R.; HARTMANN A. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1013–1019, 1995.

BAIS, H.P.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. **Plant Physiology**, v. 134, p. 307–319, 2004.

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

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES F.L.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65–73, 1992.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L.; GOE, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v.77, p.549-579, 2005.

BALDOTTO, L.E.B.; OLIVARES, F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*, v.54, p. 918-931, 2008.

BARKER, C.S.; MESHCHERYAKOVA, I.V.; KOSTYUKOVA, A.S.; SAMATEY, F.A. FliO Regulation of FliP in the Formation of the *Salmonella enterica* Flagellum. **PLOS Genetics**, v.6, p.1-10, 2010.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, p.7-11, 1998.

BEAUME, M.; HERNANDEZ, D.; DOCQUIER, M.; DELUCINGE-VIVIER, C.; DESCOMBES, P.; FRANÇOIS, P. Orientation and expression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small RNAs by direct multiplexed

measurements using the nCounter of NanoString technology. **Journal of Microbiological Methods** v. 84, p. 327-334, 2011.

BELOIN, C.; GHIGO, J. M. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. **Trends in Microbiology**,v. 13, p.16–19, 2005.

BENCHIMOL, R. L.; CHU, E. Y.; YUITIMUTO, R.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1343-1348, 2000.

BENEDUZI,A.; MOREIRA,F.; COSTA,P.B.; VARGAS,L.K.; LISBOA,B.B.; FAVRETO,R.; BALDANI,J.I.; PASSAGLIA,L.M.P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.

BENNETT, J.C., THOMAS, J., FRASER, G.M., AND HUGHES, C.Substrate complexes and domain organization of the Salmonella flagellar export chaperones FlgN and FliT. **Molecular Microbiology**,v. 39,p. 781–791,2001.

BLOCKER A, KOMORIYA K, AIZAWA S. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.3027–3030, 2003.

BOARI, Cleube Andrade. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo. 2008. 80f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BREN, A.; EISENBACH, M. How signals are heard during bacterial chemotaxis:protein-protein interactions in sensory signal propagation. **Journal of Bacteriology**,v. 182,p.6865-6873,2000.

BUTTNER, D., BONAS, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 193–200, 2006.

BURRIS, R.H. Minireview: Nitrogenases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.9339-9342, 1991.

CANTON, R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. **Clinical Microbiology and Infection**,v. 15,p. 20-25, 2009.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**. v.40, p.735-744, 2010.

CASSÁN, F.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; PICCOLI, P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants 1. **Plant Physiology**, v. 125, p. 2053–2058, 2001.

CHANG, J.H., URBACH, J.M., LAW, T.F., ARNOLD, L.W., HU, A. A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 2549–54,2005.

CHEVANCE, F.F.V.; HUGHES, K.T. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. **Nature Reviews- Microbiology**, v.6, p.455-465, 2008.

CLONTS, L. Como evitar a formação de biofilmes. Revista Controle de

Contaminação, São Paulo, v. 109, p. 50-56, maio 2008.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. Monosaccharides: their chemistry and their roles in natural products. **Ed. John Wiley & Sons**, p. 463-524, 1995.

CORNELIS, G.R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annual Review of Microbiology**, v.54,p.735–74,2000.

COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review Microbiology**,v. 41, p.435-464,1987.

COSTERTON J.W, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPINSCOTT HM. Microbial biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v.49, p.711–45, 1995.

COSTERTON, W. J. & WILSON,M. Introducing Biofilms. **Biofilms** v.1, p.1–4, 2004.

CRUZ, L.M.; DE SOUZA,E.M.; WEBER,O.B.; BALDANI,J.I.; DÖBEREINER,J.; PEDROSA,F.O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple(*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DAVEY ME & O'TOOLE GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.64, p.847–67, 2000.

DALE C.; YOUNG,S.A.; HAYDON,D.T; WELBURN,S.C. The insect endosymbiont *Sodalis glossinidius* utilizes a type III secretion system for cell invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.98.p. 1883– 1888, 2001

DE MATOS NOGUEIRA, E., VINAGRE, F., MASUDA, H. P., VARGAS, C., DE PÁDUA, V.L. M., DA SILVA, F. R., DOS SANTOS, R. V., BALDANI, J. I.,

GOMES FERREIRA,P. C., HEMERLEY,A.S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**,v.24,p.199-206,2001.

DO AMARAL, A.M. BAPTISTA, J.C. WINCK, F.V. HOMEM, R.A. MACHADO, M.A. Plataformas tecnológicas no estudo da bactéria causadora do cancro cítrico: genômica, transcriptômica e proteômica. **Melhoramento e biotecnologia**, v.27, n.2, p355-372, 2006.

DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F.L. Endophytic Diazotrophs in Sugar Cane, Cereals and Tuber Plants. **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**,v 17, p 671-676,1993.

DOTSCH,A.;ECKWEILER,D.;SCHNIEDERJANS,M.;ZIMMERMANN,A.;JENSE N,V.; SCHARFE,M.;GEFFERS,R.; HAUSSLER,S. The *Pseudomonas aeruginosa* Transcriptome in Planktonic Cultures and Static Biofilms Using RNA Sequencing. **Plos One**, v.17, p.1-11, 2012.

ERHARDT, M.; NAMBA, K.; HUGHES, K.T. Bacterial Nanomachines: The Flagellum and Type III Injectisome. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, v.2,2010.

FALKE, J.J.; BASS, R.L.;BUTLER, S.L.;CHERVITZ, S.A.; DANIELSON, M.A. The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases and adaptation enzymes. **Annual Review of Cell Biology**, v.1, p. 457-512, 1997.

FEDURCO, M. et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Research**, v.34, n.3, p.e22, 2006.

FLEMMING, H.C., WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, 2010.

FRASER, G.M.; BENNETT, J.C.Q.; HUGHES, C. Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FlIT, putative chaperones for flagellum assembly. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 569–580, 1999.

GALÁN, J.E.; COLLMER, A. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science*, v. 284, p. 1322-1328, 1999.

GALÁN, J.E.; WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, v. 444, p. 567-573, 2006.

GROOT, M.N.N.; KLEEREBEZEM, M. Mutational analysis of the *Lactococcus lactis* NIZO B40 exopolysaccharide (EPS) gene cluster: EPS biosynthesis correlates with unphosphorylated EpsB. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p. 2645–2656, 2007.

GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, V.L.D. NETO, J.J. Viabilidade do inoculante turfoso produzido com bactérias associativas e molibdênio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 10-15, 2013.

GUTTENPLAN, S.B.; KEARNS, D.B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. **FEMS Microbiology Reviews**, p.1–23, 2013.

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**, v. 154, p.131–145, 2002.

HAFT, D.H.; PAULSEN, I.T.; WARD, N.; SELENGUT, J.D. Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: the PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. **BMC Biology**, v.4, p.1-16, 2006.

HALLMAN, J.A.; QUADT-HALMANN, W.; MAHAFFEE, F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HAUCK, P., THILMONEY, R., HE, S.Y. *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 8577–82,2003.

HAZELBAUER, G.L.; HARAYAMA, S. Sensory transduction in bacterial chemotaxis. **International Review of Cytology**, v.81, p.33-70, 1983.

HAZELBAUER, G. L. **Canadian Journal of Microbiology**,v. 34,p.466-474,1988.

HE, P., SHAN, L., SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 1462-5822, 2007.

HILLIER, L.D.; LENNON, G.; BECKER, M.; BONALDO, M.F.; et al. Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. **Genome Research**, v.6, p.807-28, 1996.

HINTON JC, HAUTEFORT I, ERIKSSON S, THOMPSON A & RHEN M (2004) Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. **Current Opinion Microbiol**,v. 7, p.277–282.

HOOPER, L. V., WONG, M. H., THELIN, A., HANSSON, L., FALK, P. G.,GORDON, J. I. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v.291, p.881-884, 2001.

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.

KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v.15, p. 1679-7353, 2010.

KARATAN, E. & WATNIK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology Molecular Biology Reviews** v.73, p.310–347 2009.

KIM, M., DA CUNHA, L., MCFALL, A., BELKHADIR, Y., DEBROY, S., DANGL, J., MACKEY, D. Two Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in Arabidopsis. **Cell**, v. 121, p. 749-759, 2005.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 887-891, 1997.

KLOPPER, J. W.; RODRIGUEZ-UBANA, R.; ZEHNDER, G. W.; MURPHY, J. F.; SIKORA, E.; FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 28, p. 21-26, 1999.

KRISTICH, C.J.; ORDAL, G.W. *Bacillus subtilis* CheD Is a Chemoreceptor Modification Enzyme Required for Chemotaxis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 25356–25362, 2002.

KUTSUKAKE, K.; IKEBE, T; YAMAMOTO, S. Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. **Genes and Genetics Systems**, v. 74, p. 287–292, 1999

KYAW, C.M. Biofilmes Microbianos. Disponível em <www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm>. Acesso em 20 de julho de 2013.

ISABELLA V.M.; CLARK, V.L. Deep sequencing-based analysis of the anaerobic stimulon in *Neisseria gonorrhoeae*. **BMC Genomics**, v.12, 2011.

JACQUES, M.A.; MORRIS, C.E. A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v.18, p.1-14, 1995.

JAMES, E.K., OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. **CGC Critical Reviews in Plant Science** v.17, p. 77-119, 1998.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research** v.65, p. 197-209, 2000.

JOURNET, L., HUGHES, K.T., CORNELIS, G.R. Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence. **Molecular Membrane Biology**, v.22, p.41-50, 2005.

LANGE, A., MOREIRA, F.M.A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 535-543, 2002.

LEE, L.G.; CONNELL, C.R.; BLOCH, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.3761-3766, 1993.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v.257, p.967-971, 1992.

LINDGREN, P.B.; PEET, R.C.; PANOPOULOS, N.J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. **Journal of Bacteriology**, v.168, p.512–522, 1986.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, v.259, p.946-51, 1993.

LIVAK, K.J.; FLOOD, S.J.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR-Methods and Applications**, v.4, p.357-362, 1995

LODEWYCKX, C., VANGRONSVELD, J., PORTEOUS, F., MOORE, E. R. B., TAGHAVI, S., MEZGEAY, M., VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, p. 583-606, 2002.

MACHADO, I. M. P.; YATES, M. G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes nifHDK of *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1599-1602, 1996.

MACNAB, R.M. How bacteria assemble flagella. **Annual Review of Microbiology**, v.57, p. 77–100, 2003.

MACNAB, R.M. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 207–217, 2004.

MACNAB, R.M. FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. **Molecular Microbiology**, v.34, p. 295–304, 1999.

MAGNANI, G.D.S. Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MALAKOOTI, J; ELY, B.; MATSUMURA, P. Molecular Characterization, Nucleotide Sequence, and Expression of the *fliO*, *fliP*, *fliQ*, and *fliR* Genes of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.176, p. 189-197, 1994.

MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet**, v. 24, p. 133-41, 2008.

MATTICK J.S. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review Microbiology*.Brisbane, v. 56 p. 289–31, 2002.

MCKERNAN, K. et al. Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing. **US patent application 20080003571**, 2006.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on Corn Plant Growth Under Greenhouse Conditions. **Microbial Ecology**,v. 51, p 326-335, 2006.

MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L. VIDAL, M. S.; BALDANI, J.I. Exopolysaccharide Production Is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**,v.24,p.1448-1458,2011.

METZKER, M.L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p-31-45, 2010.

MICHIELS, K.W.; CROES C.L.; VANDERLEYDEN, J.; Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Journal of General Microbiology*,v. 137,p.2241–2246,1991.

MINAMINO, T.; MACNAB, R.M. Domain structure of Salmonella FlhB, a flagellar export component responsible for substrate-specificity switching, **Journal of Bacteriology**,v.182,p. 4906–4914,2000.

MONIER, J.M.; LINDOW, S. E. Frequency, size and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.345-355, 2004.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E. ; WASSEM, R. ; MARIN, A. M. ; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. ; SCHMIDT, M. A. ; TADRA-SFEIR, M. Z. ; PANKIEVICZ, V. C. S. ; CRUZ, L. M. ; CHUBATSU, L. S. ; PEDROSA, F. O. ; SOUZA, E. M. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 1, p. 1, 2012.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Reviews Phytopathol*,v. 41p.429–53,2003.

MORGAN, D.G., BAUMGARTNER, J.B. AND HAZELBAUER, G.L. Proteins antigenically related to methylaccepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli* detected in a wide range of bacterial species. **Journal of Bacteriology**,v. 175, p.133-140,1993.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods** v. 5, p. 621-628, 2008.

MOLIN, S.; NIELSEN, T.T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. **Current Opinion in Biotechnology**,v.14,p.255-261,2003.

MOTA, L.J., JOURNET, L., SORG, I., AGRAIN, C., CORNELIS, G.R. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science*,v. 307,p. 1278-1285,2005.

MOWBAY, S.L.; SANDGREEN, M.O. Chemotaxis receptors: a progress report on structure and function. **Journal of Structural Biology**, v.124, p. 257-275, 1998.

NERONI, R.F., CARDOSO, E.J.B.N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 303-304, 2007.

OLIVEIRA, A.L.M., URQUIAGA, S., DÖBEREINER, J., BALDANI, J.I. The Effect of Inoculating Endophytic N₂ – Fixing Bacteria on Micropropagated Sugarcane Plants. **Plant and Soil**, v.242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M., CANUTO, E.D.L., URQUIAGA, S., REIS, V.M., BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

OLIVARES, F.L.; DOS REIS JR, F. B.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugarcane roots by the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – The Role of Biological Nitrogen Fixation**, Angra dos Reis, p. 65-66, 1995.

OLIVARES, F.L.; Bactérias promotoras de crescimento vegetal. **Boletim Informativo da SBCS**, Viçosa, janeiro – abril, 2009. Disponível em: <<http://sbcs.solos.ufv.br/solos/boletins/biologia%20%20fabio%20olivares.pdf>>

OLIVE, H.F.; ORSI, R.H.; PONNALA, L.; KEICH, U.; WANG, W.; SUN, Q.; CARTINHO, S.W.; FILIATRAULT, M.J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs. **BMC Genomics**, v.10, p.641, 2009.

O'TOOLE, A.G.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 295–304, 1998.

PALLEN, M.J.; PENN, C.W.; CHAUDHURI, R.R. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends in Microbiology*, v.13, p.143-149.

PALLEN M. J.; GOPHNA U. Bacterial Flagella and Type III Secretion: Case Studies in the Evolution of Complexity. **Gene and Protein Evolution**, v.3, p.30-47, 2007.

PASSALACQUA, K.D.; VARADARAJAN, A.; ONDOV, B.D.; OKOU, D.T.; ZWICK M.E.; BERGMAN N.H. The structure and complexity of a bacterial transcriptome. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 3203–3211, 2009.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7(5): e1002064, 2011.

PEREIRA, W, LEITE, J.M. HIPÓLITO, G.S. SANTOS, C.L.R. REIS, V.M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 363-370, 2013.

PETRINI O. Fungal endophytic of tree leaves. **Microbial ecology of leaves**. Springer Verlag, p. 179-197, 1991.

PINTO, A.C.; MELO-BARBOSA, H.P.; MIYOSHI, A.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p. 1707-1718, 2011.

PITON, R. “Quorum sensing” e Biofilme como estratégias para seleção de *Pseudomonas sp.* como promotoras de crescimento. 55p. Dissertação (Mestrado Agronomia-Microbiologia do solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

PEREIRA, M.; PARENTE, J.A.; BATAUS, L.A.M.; CARDOSO, D.D.P.; SOARES, R.B.A.; SOARES, C.M.A. Chemotaxis and flagellar genes of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.92-101, 2004.

PORTER, S.L.; WADHAMS, G.H.; ARMITAGE, J.P. Signal processing in complex chemotaxis pathways. **Nature Reviews-Microbiology**, v.9, p.153-165, 2011.

PRATT, L.A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 285–293, 1998.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.254-259, 1997.

RAMEY B.E., KOUTSOUDIS M., BODMAN, S.B.V., FUQUA C. Biofilm formation in plant–microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.602–609,2004.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**,v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization an perspectives to study their function (EspaçoReservado1). **Critical Reviews in Plant Science**, v.17, p.29-54, 1998.

RONCATO-MACCARI, L.D.; RAMOS, R.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R. e SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* Expresses *nif* Genes in Gramineous Plants. **Genetic and Molecular Research**, v. 45, p. 39-47, 2003.

RONAGHI, M. et al. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v.281, p.363–365, 1998

ROSCONI, F., DAVYT, D., MARTÍNEZ, V., MARTÍNEZ, M., ABIN-CARRIQUIRY, J.A., ZANE, H., BUTLER, A., DE SOUZA, E.M., FABIANO, E. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. **Environmental Microbiology**, v.15, p. 916–927, 2012.

RYU, C.M.; FARAG, M. A.; HU, C. H.; REDDY, M. S.; WEI, H. X.; PARE, P.W.; KLOPPER, J. W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** v. 100, p. 4927-4932, 2003.

RUMJANEK, N.G.; DA FONSECA, M.C.C.; XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - Edição nº 33 - julho/dezembro 2004

SAEED, A.I.; BHAGABATI, N.K.; BRAISTED, J.C.; LIANG, W. VASILY, S.; HOWE, E.A.; LI, J.; THIAGARAJAN, M.; WHITE, J.A.; QUACKENBUSH, J. TM4 Microarray Software Suite. **Methods in Enzymology**, v. 411, p.134-193, 2006.

SABOYA, R.D.C.C. BORGES, P.R.S. SABOYA, L.M.F. MONTEIRO, F.P.D.R.; DE SOUZA, S.E.A.; DOS SANTOS, A.F. DOS SANTOS, E.R. Response of cowpea to inoculation with nitrogen-fixing strains in Gurupi-Tocantins State. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v4, p. 40-48, 2013.

SAKIYAMA, C.C.H. Colonização De *Coffea arabica* L. por bactérias endofíticas promotoras de crescimento. 80. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SALA, V.M.R., FREITAS, S.S., DONZELI, P., FREITAS J.G., GALLO, P.B., SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p.345-352, 2005

SCHMIDT, M. A. ; SOUZA, E.M. ; BAURA, V. ; WASSEM, R. ; YATES, M.G. ; PEDROSA, F.O. ; MONTEIRO, R.A. . Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris*(common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. Brazilian. **Journal of Medical and Biological Research** , v. 44, p. 182-185, 2011.

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

SCHEMBRI, M. A., KJAERGAARD, K. & KLEMM, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Mol Microbiol** v.48, p.253–267, 2003.

SHAN, L., HE, P., SHEEN, J. Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. **Cell Host Microbe**, v. 1, p. 167–174,2007.

SHIRTLIFF, M. E., MADER, J. T. & CAMPER, A. K. Molecular interactions in biofilms. **Chemistry & Biology**, v.9, p.859–871,2002.

SOURJIK, V.; WINGREEN, N. S. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.24, p.262–268, 2011.

SPRINGER, W.R. AND KOSHLAND JR., D.E. Identification of a protein methyltransferase as the cheR gene product in the bacterial sensing system.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 74, p. 533-537, 1977.

STEWART, R.C.; DAHLQUIST, F.W. Molecular components of bacterial chemotaxis. Chemical Reviews, v.87, p.997-1025, 1987.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358p. 135-8, 2001.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 187–209, 2002.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal**, v.11, p. 663 – 674, 2001

TADRA-SFEIR, M.Z. Identificação e Caracterização de Genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados por naringenina. 126. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

TADRA-SFEIR, M.Z.; SOUZA, E.M.; FAORO, H., MÜLLER-SANTOS, M., BAURA, V.A.; TULESKI, T.R.; RIGO, L.U., YATES, M.G.; WASSEM, R.; PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A. Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Applied Environmental Microbiology**. v.77, p.2180–2183, 2011.

TISCHLER, A D. & CAMILLI, A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.53, p.857–869, 2004.

TULESKI, T.R. Envolvimento dos genes de biossíntese de celulose na formação de biofilme pela bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1.100. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

TENOVER FC, WEIGEL LM, APPELBAUM PC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n. 1, 275–280, 2004.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**, v.119, s.6A, p.3–10, 2006.

TOBE, T., BEATSON, S.A., TANIGUCHI, H., ABE, H., BAILEY, C.M., FIVIAN, A., YOUNIS, R., MATTHEWS, S., MARCHES, O., FRANKEL, G., et al. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, p.14941–14946, 2006.

TURCATTI, G. et al. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic acids research**, v.36, e25, 2008.

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

VALLET, I.; OLSON, J.W.; LORY, S.; LAZDUNSKI, A.; FILLOUX, A. The chaperoneusher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p. 6911–6916, 2001.

VAN VLIET A.H. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. **FEMS Microbiology Letters**. v. 302, p.1-7, 2010.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v.270, p.484-487, 1995.

VERMA, S. C., LADHA, J. K., TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.

VERMELHO A.B.; BASTOS M.C.F.; SÁ M.H. B, 2007. Bacteriologia geral. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.541-560.

VIPREY, V.; DEL GRECO, A.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Biology**, v.28, p. 1381–1389, 1998.

WADHAMS, G.H.; ARMITAGE, J.P. **Making sense of it all: bacterial chemotaxis**. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v.5, p.1024-1037, 2004.

WATNICK, P.I.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v.186, p. 2675–2679, 2000.

WATNICK, P.I.; KOLTER, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology*, v. 34, p. 586–595, 1999.

WEBB, J. S., GIVSKOV, M. & KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion Microbiology** v. 6, p.578–585, 2003.

WEBER, O.B., BALDANI, V.L.D., TEIXEIRA, K.R.S., KIRCHHOF, G., BALDANI, J.I. DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil** v.210, p.103-113, 1999.

WEBER, O.B.; Baldani, J.I.; Döbereiner, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p.2277-2285, 2000.

WELCH, M., OOSAWA, K, AIZAWA, S. AND EISENBACH, M. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,v. 90,p. 8787-8791,1993.

WINGENDER, J., NEU, T. & FLEMMING, H.-C. Microbial Extracellular Polymeric Substances. **Springer**,p. 1–19 ,1999.

WOLFE, A. J., CHANG, D. E., WALKER, J. D. *et al.* Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. **Molecular Microbiology** v.48,p. 977–988,2003.

WU, J.J., LI, J., LONG, D.G.; WEISS, R.M. The receptor binding site for the methyltransferase of bacterial chemotaxis is distinct from the sites of methylation. **Biochemistry**,v. 35,p.4984-4993,1996.

YANG,Y.H., DUDOIT, S., LUU P., LIN,D.M., PENG,V., NGAI,J., SPEED,T.P. Normalization for cDNA microarray data: a robust compositemethod addressing single andmultiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, v. 30, No. 4 e15, 2002.

YODER-HIMES, D.R.; CHAIN, P.S.; ZHU, Y.; WURTZEL, O.; RUBIN, E.M.; TIEDJE, J.M.; SOREK, R. Mapping the *Burkholderia cenocepacia* niche response via high-throughput sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 106, p. 3976-3981, 2009.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STANCEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, J., (Ed.). Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman, p.43-86, 1992.

YANGA, L.; JELSBKA, RASMUS, L., MARVIGA, L. *et al.* Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v.108,p. 7481–7486,2011.

YOSHIDA, T., AYABE, Y., YASUNAGA, M., USAMI, Y., HABE, H., NOJIRI, H., OMORI, T. Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylophile *Methylobacillus* sp strain 12S. **Microbiology**, v.149,p.431-444,2003.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

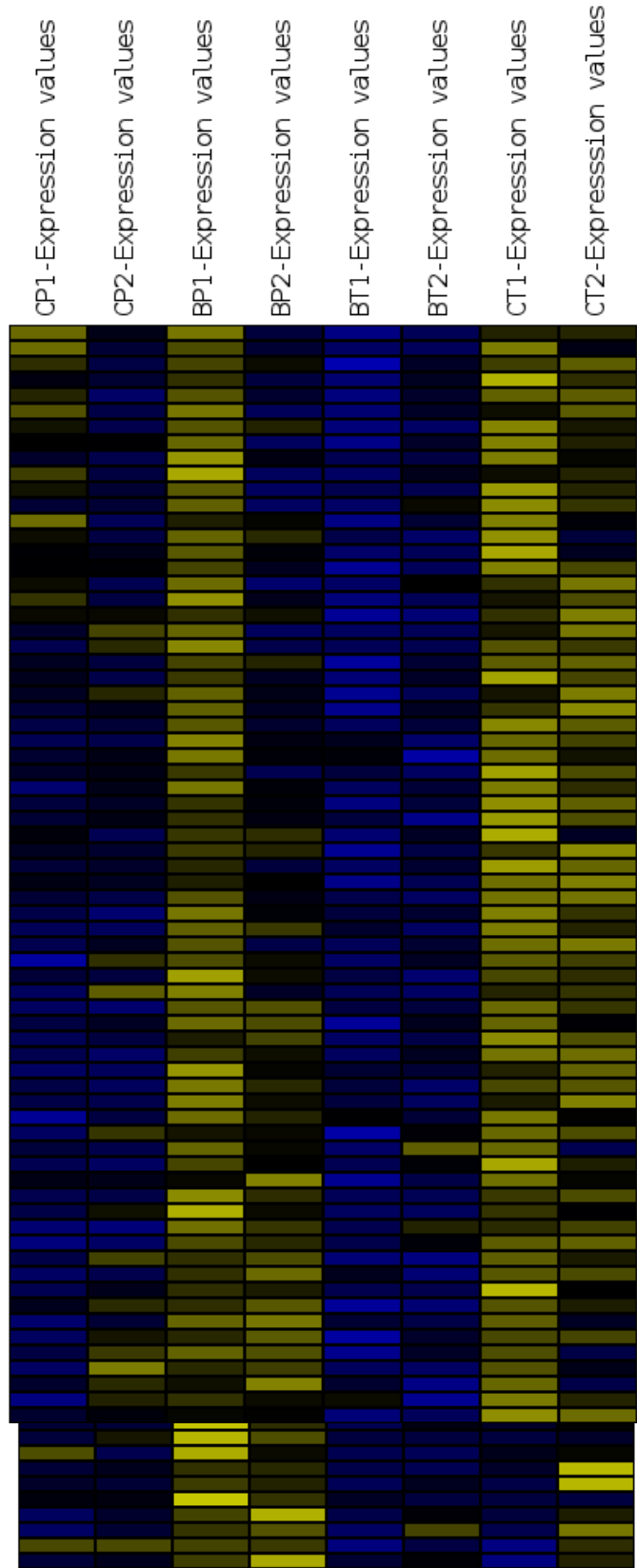
ZHUANG,W.Y.; SHAPIRO,L. Caulobacter FliQ and FliR Membrane Proteins, Required for Flagellar Biogenesis and Cell Division, Belong to a Family of Virulence Factor Export Proteins. **Journal Of Bacteriology**, v.177, p. 343–356, 1995.

Anexos

ANEXO 1.. Genes agrupados quanto a similaridade do padrão de expressão pelo método de K-means

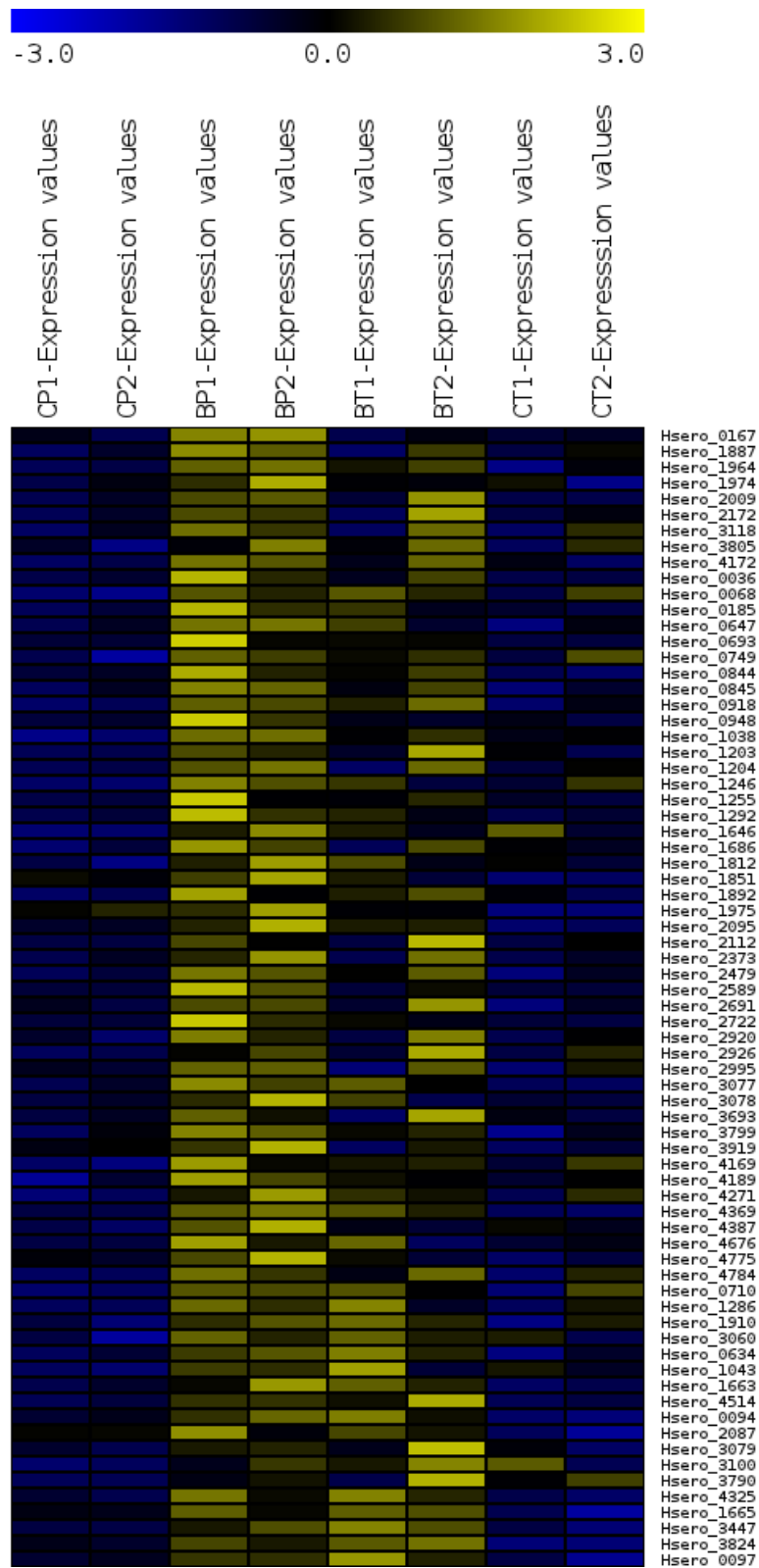
Cluster 1

Cluster

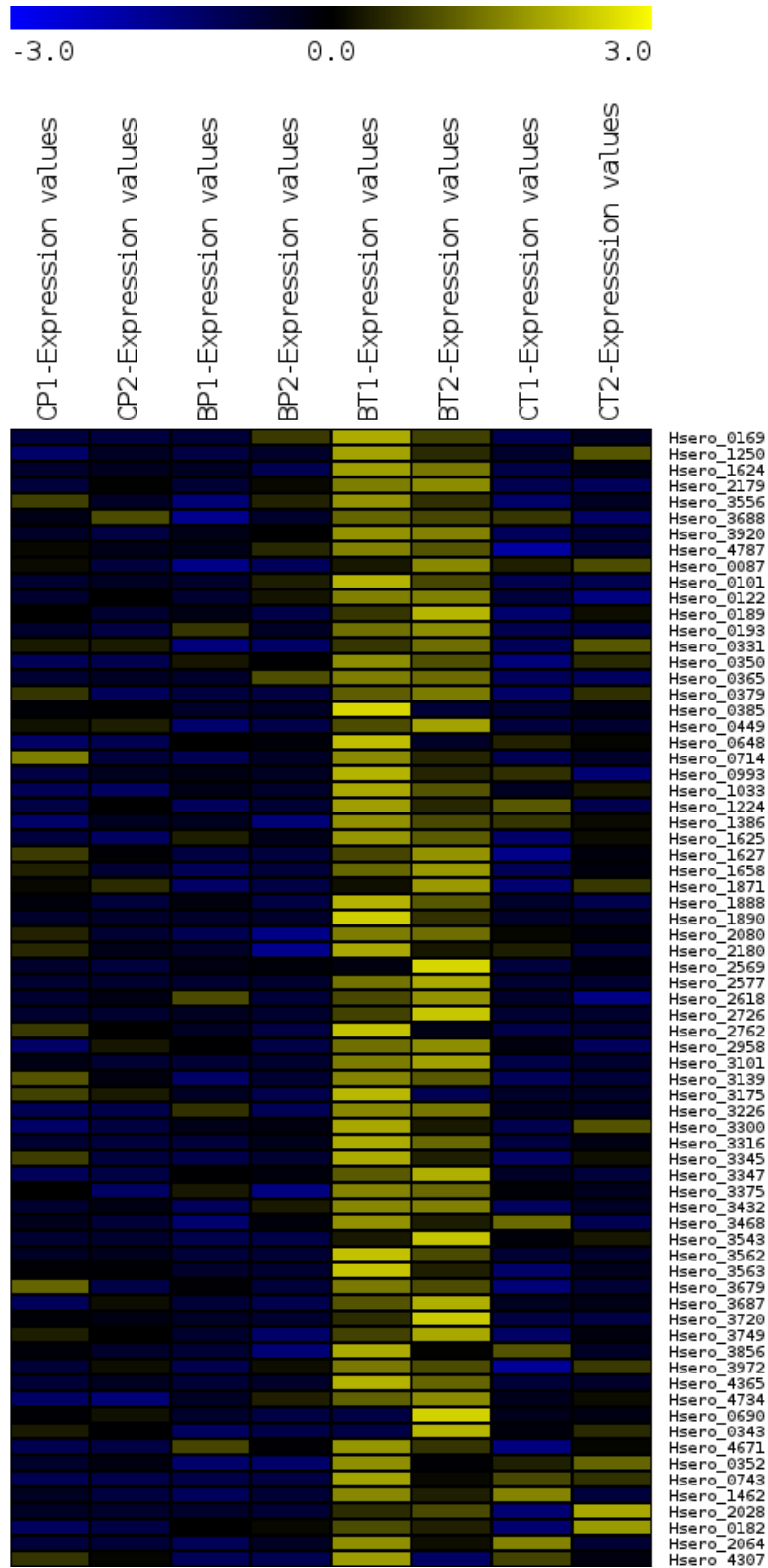


2

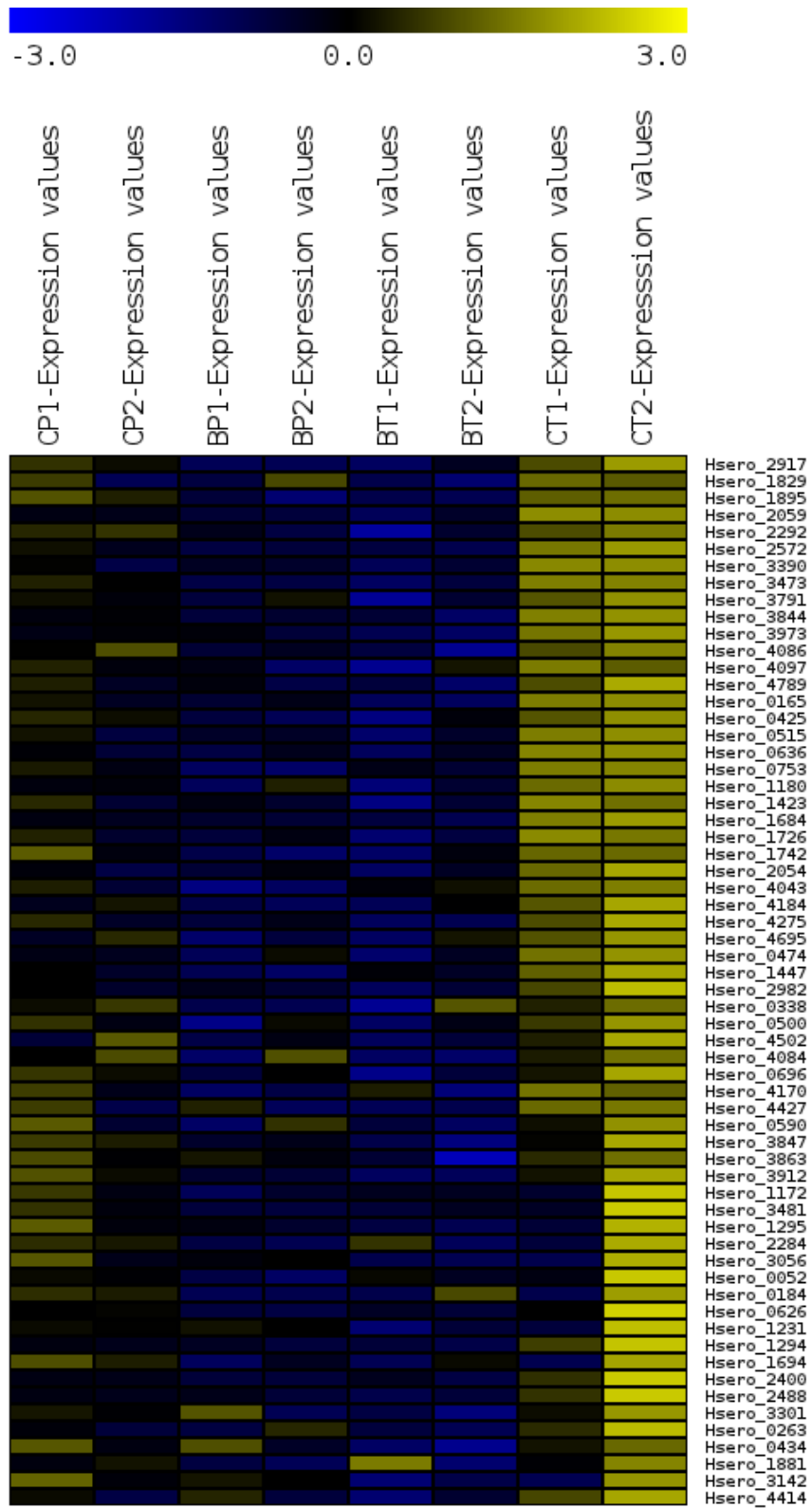
Cluster 3



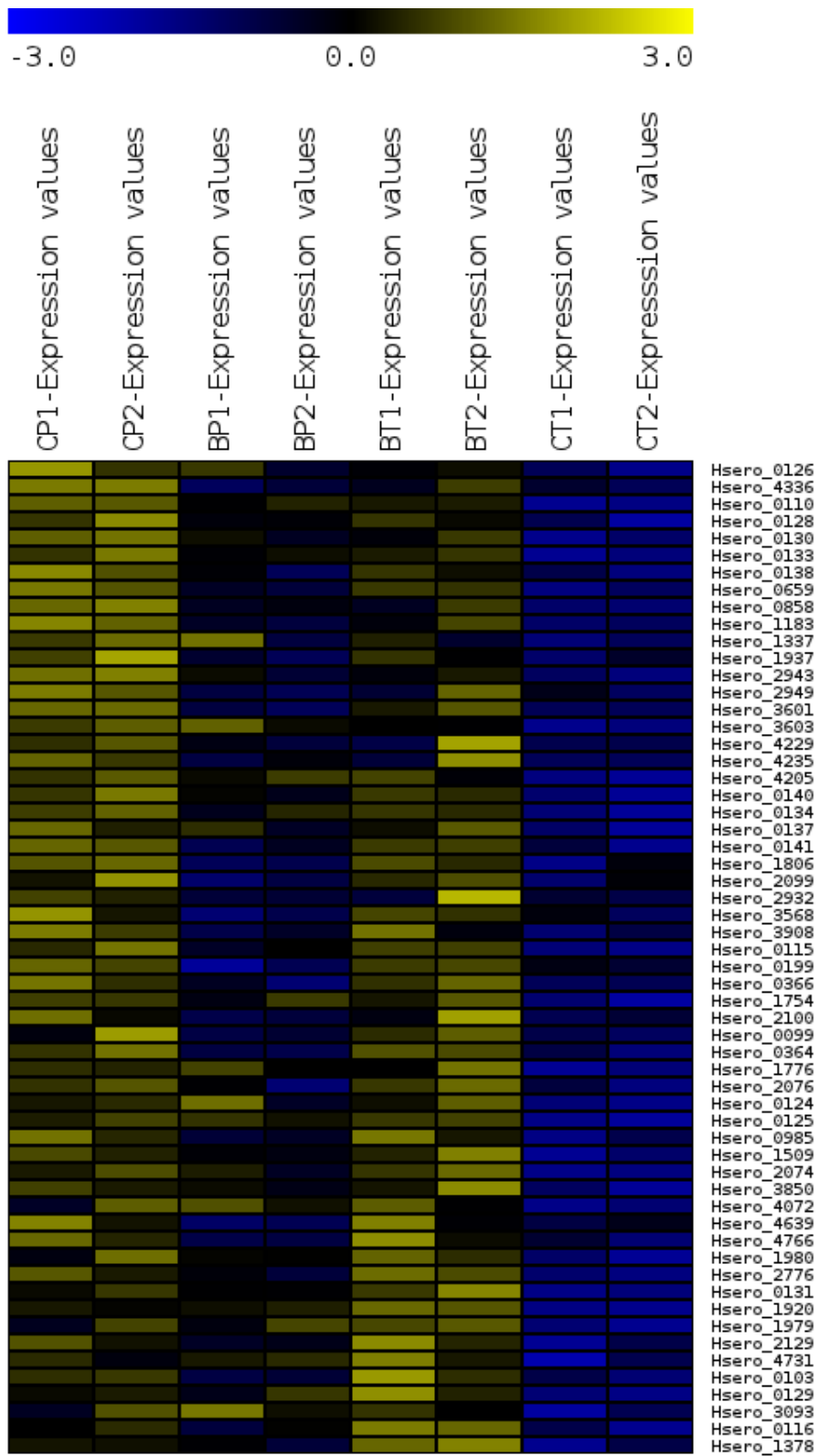
Cluster 5



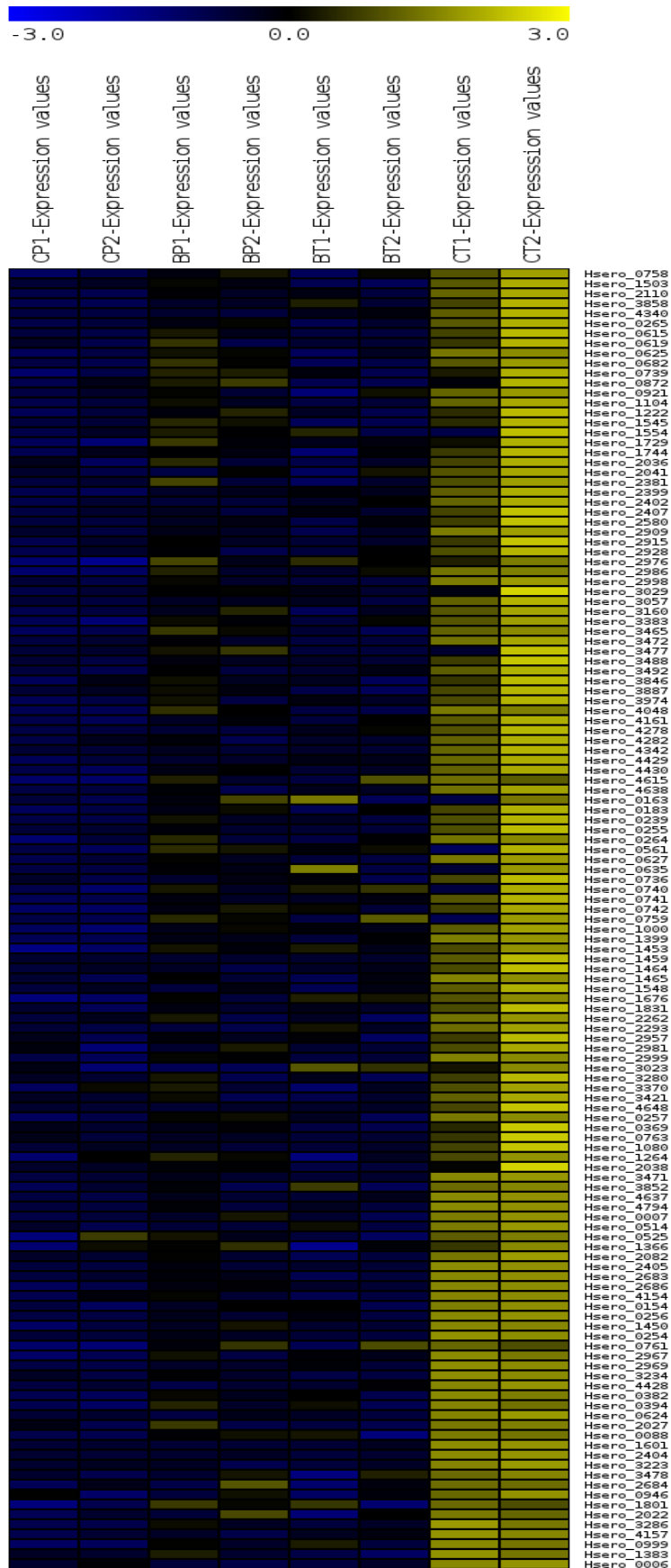
Cluster 6



Cluster 7



Cluster 8



Cluster 9

