

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Karolina Yumi Gushiken

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO CLUSTER WCB NA VIRULÊNCIA DE
***Burkholderia cenocepacia* H111**

São Paulo
2023

Karolina Yumi Gushiken

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO CLUSTER WCB NA VIRULÊNCIA DE
Burkholderia cenocepacia H111**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela profa. Marjorie Mendes Marini e Souza e co-orientado pelo prof. Welington Luiz de Araújo, como requisito parcial para obtenção do título de Biomédica.

São Paulo

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Gushiken, Karolina Yumi

Avaliação do papel do cluster WCB na virulência de Burkholderia Cenocepacia H111 / Karolina Yumi Gushiken. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

25 p.

Orientação de Marjorie Mendes Marini e Souza.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Cápsulas 2. Ecologia microbiana 3. Interação 4. Mutagênese I.
Souza, Marjorie Mendes Marini e II. Centro Universitário São Camilo III.
Título

CDD: 616.014

Agradecimentos

Agradeço a todos que fizeram parte da construção desse trabalho, primeiramente a minha família, em especial minha mãe Roseli e meu pai Eduardo; a todos os professores me ensinaram tanto durante esses quatro anos, em especial a profa. Marjorie e o prof. Welington; a todas as amizades que fiz na faculdade e na iniciação científica, que fizeram com que todo o processo e trabalho ficassem mais leves, e principalmente a Deus.

RESUMO

O gênero *Burkholderia* é composto por bactérias gram-negativas, não fermentativas, aeróbias, taxonomicamente pertencentes à classe β -Proteobacteria (Filo Pseudomonadota). Esse gênero de bactérias é capaz de colonizar diversos ambientes, como solo, rizosfera, água doce e diferentes hospedeiros, incluindo fungos, plantas, insetos e mamíferos, inclusive seres humanos. Além disso, *Burkholderia* spp. produzem moléculas com atividade antifúngica e antibacteriana, possibilitando a sua aplicação no controle de fitopatógenos. Dentro desse gênero existe um grupo denominado de complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), que pode infectar pacientes imunocomprometidos e portadores de fibrose cística, sendo considerado um patógeno oportunista, demonstrando que estas bactérias podem apresentar interações benéficas e/ou prejudiciais ao seu hospedeiro. O sequenciamento do genoma dessas bactérias tem demonstrado que espécies pertencentes ao grupo Bcc apresentam diferentes mecanismos de interação que possibilitam a ocupação de nichos diferentes no solo, plantas e animais, decorrente da colonização de ambientes completamente contrastantes e estratégias diferentes de interação com o seu hospedeiro e/ou diferentes micro-organismos. *Burkholderia* spp. apresentam um cluster gênico, denominado cluster WCB, o qual apresenta genes responsáveis pela biossíntese de açúcares, metabolismo de lipídeos, glicosiltransferases e proteínas de transporte responsáveis pela síntese de cápsula (EPS). Entretanto, o papel desta cápsula e destes genes na interação destas bactérias no ambiente não está bem compreendido para as espécies do grupo Bcc, embora estudos prévios sugiram que esteja envolvido nos mecanismos de interação no ambiente. Portanto, esse trabalho busca avaliar o papel da cápsula, produzida por *Burkholderia cenocepacia* H111, nos mecanismos de interação ambiental. Para isso, genes do cluster wcb foram deletados, e os nove mutantes obtidos tiveram suas deleções confirmadas e seu fenótipo avaliado com relação a capacidade de produção de antifúngicos contra fungos de diferentes espécies do gênero *Fusarium* e virulência ao pimentão. As deleções dos genes wcbA, wcbB e fkbM foram confirmadas. Não foram observadas diferenças na produção de antifúngicos pelas mutantes. Com relação a virulência ao pimentão, foi observado que o gene fkbM é um fator de virulência de *B. cenocepacia* H111 a esta planta. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a cápsula de *B. cenocepacia* H111 está envolvida em mecanismos de interação no ambiente.

Palavras-chave: cápsula, ecologia microbiana, mutagênese, interação.

ABSTRACT

The genus *Burkholderia* is composed of bacteria gram-negative, non-fermentative, aerobias, taxonomically belonging to the class β -Proteobacteria (Phylum Pseudomonadota). This genus of bacteria can colonize several environments, as soils, rhizosphere, fresh water and different hosts, including fungus, plants, insects and mammals, including humans. In addition, *Burkholderia* spp. produce molecules with antifungal and antibacterial activity, turning able your application in phytopathogen control. Inside this genus, exists a group named *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), that can infect immunocompromised patients and cystic fibrosis patients, being considered an opportunistic pathogen, demonstrating that these bacteria can present beneficial and/or harmful interactions for the host. Genome sequencing of this bacteria has shown that species that belong to the Bcc can have different mechanisms in interaction that turn able the occupation of different niches in soil, plants, and animals, resulting of colonizing environmental completely contrasting and different strategies of interaction with the host and/or different microorganisms. *Burkholderia* spp. has a gene cluster, call wcb cluster, that have genes responsible of polysaccharides synthesis, lipids metabolism, glycosyltransferase, and transport proteins responsible of capsule synthesis (EPS). Meanwhile, the function of the capsule and that genes in interaction of this bacteria in the environment is not really understood for Bcc species, although previously studies suggest that it can be involved in mechanisms of environmental interaction. Therefore, this work aims to evaluate the function of the capsule, produced by *Burkholderia cenocepacia* H111, in the mechanism of environmental interaction. For that, genes of wcb cluster were deleted, and nine mutants obtained had their deletions confirmed and their phenotypes evaluated with respect to the capacity of antifungal production against different species of *Fusarium* genus and virulence in sweet pepper. The deletions of wcbA, wcbB and fkbM genes were confirmed. There is no difference between antifungal production by the mutants. About sweet pepper virulence, were observed that the fkbM gene is a virulence factor for *Burkholderia cenocepacia* H111 for that plant. The results obtained in this work suggests that capsule of *Burkholderia cenocepacia* H111, is involved in mechanisms of environmental interaction.

Keywords: capsule, microbial ecology, mutagenesis, interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização do cluster wcb em <i>B. cenocepacia</i> H111 e K56-2 e <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3. Marcação em azul claro entre os clusters indicam genes compartilhados entre as diferentes linhagens. O gene fkbM presente nas linhagens H111 e TC3.4.2R3 são ortólogos.....	12
Figura 2 - Deleções realizadas na mutante 3.....	14
Figura 3 - Deleções realizadas na mutante 4.....	15
Figura 4 - Deleções realizadas na mutante 7.....	15
Figura 5 - Deleções realizadas na mutante 8.....	15
Figura 6 - Deleções realizadas na mutante 12.....	15
Figura 7 - Deleções realizadas na mutante 15.....	15
Figura 8 - Deleções realizadas na mutante 16.....	16
Figura 9 - Deleções realizadas na mutante 18.....	16
Figura 10 - Deleções realizadas na mutante 19.....	16
Figura 11 - Confirmação da deleção dos genes wcbA e wcbB em gel de agarose.....	17
Figura 12 - Confirmação da deleção do gene fkbM em gel de agarose.....	17
Figura 13 - Esquematização da deleção do gene fkbM.....	18
Figura 14 - Confirmação da deleção do gene fkbM na plataforma Blast, a partir da primeira região amplificada.....	18
Figura 15 - Confirmação da deleção do gene fkbM na plataforma Blast, a partir da segunda região amplificada.....	19
Figura 16 - Controle do fungo <i>F. oxysporum</i>	19
Figura 17. Formação de halo de inibição pela bactéria selvagem e mutantes.....	19
Figura 18 - Formação de halo de inibição pelas mutantes.....	19

Figura 19 - Formação de halo de inibição pelas mutantes.....	20
Figura 20 - Formação de halo de inibição pelas mutantes.....	20
Figura 21 - Controle do fungo <i>F. solani</i>	20
Figura 22 - Formação do halo de inibição pela selvagem e mutantes.....	20
Figura 23 – Formação de halo de inibição pelas mutantes.....	20
Figura 24 - Formação do halo de inibição pelas mutantes.....	20
Figura 25 - Formação de halo de inibição pelas mutantes.....	20
Figura 26 - Controle do fungo <i>F. equisetum</i>	20
Figura 27 - Formação do halo de inibição pela bactéria selvagem e mutantes.....	20
Figura 28 - Formação de halo de inibição pelas mutantes.....	20
Figura 29 - Formação do halo de inibição pelas mutantes.....	20
Figura 30 - Formação do halo de inibição pelas mutantes.....	20
Figura 31 - Controle do fungo <i>F. decemoelu</i>	21
Figura 32 – Formação do halo de inibição pela selvagem e mutantes.....	21
Figura 33 – Formação do halo de inibição pelas mutantes.....	21
Figura 34 - Formação do halo de inibição pelas mutantes.....	21
Figura 35 - Formação do halo de inibição pelas mutantes.....	21
Figura 36 – Controle.....	21
Figura 37 – Necrose causada pela bactéria selvagem.....	21
Figura 38 – Necrose causada pela mutante 3.....	21
Figura 39 - Necrose causada pela mutante 4.....	21
Figura 40 – Ausência de necrose pela mutante 7.....	22

Figura 41 - Necrose causada pela mutante 8.....	22
Figura 42 - Necrose causada pela mutante 12.....	22
Figura 43 - Necrose causada pela mutante 15.....	22
Figura 44 - Necrose causada pela mutante 16.....	22
Figura 45 - Necrose causada pela mutante 18.....	22
Figura 46 - Necrose causada pela mutante 19.....	22

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	10
2.OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. LINHAGENS BACTERIANAS, FÚNGICAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	13
3.2. CONFIRMAÇÃO DA DELEÇÃO DE GENES POR PCR E SEQUENCIAMENTO.....	14
3.3. ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE ANTIFÚNGICOS.....	16
3.4. VIRULÊNCIA À PIMENTÃO.....	16
4.RESULTADOS	17
4.1. CONFIRMAÇÃO DOS GENES DELETADOS.....	17
4.2. PRODUÇÃO DE ANTIFÚNGICOS.....	19
4.3. VIRULÊNCIA À PIMENTÃO.....	21
5.DICUSSÃO	22
6.CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. Introdução

O gênero *Burkholderia* é composto por bactérias gram-negativas, não fermentativas, aeróbias, taxonomicamente pertencentes à classe β -Proteobacteria (Filo Pseudomonadota). Esse gênero de bactérias é capaz de colonizar diversos ambientes, como solo, rizosfera, água doce e diferentes hospedeiros, incluindo fungos, plantas, insetos e mamíferos, inclusive seres humanos (Coenye e Vandamme, 2003; Eberl e Vandamme, 2016). Além disso, *Burkholderia* spp. produzem moléculas com atividade antifúngica e antibacteriana, possibilitando a sua aplicação no controle de fitopatógenos. Dentro desse gênero existe um grupo denominado de complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc), que pode infectar pacientes imunocomprometidos e portadores de fibrose cística, sendo considerado um patógeno oportunista (LiPuma, 2010). Esse complexo também está associado a quadros endêmicos de septicemia aguda, conhecida como síndrome cepacia. Essa síndrome pode ser observada em até 20% dos pacientes infectados, que foram atendidos em um centro de fibrose cística em Toronto. Também apresentam resistência a antibióticos, alta taxa de transmissão e virulência, e de troca de material genético entre as diversas linhagens gerando novas variantes (LiPuma, 2010).

As bactérias apresentam interações benéficas e/ou prejudiciais ao seu hospedeiro (Depoorter et al., 2016). É possível a identificação de espécies capazes de promover crescimento em plantas, melhorar o fitness de fungos, fazer controle biológico ou causar doenças em plantas e animais (Eberl e Vandamme, 2016). Sequenciamento do genoma dessas bactérias (Ho e Huang, 2015; Naughton et al. 2016) tem demonstrado que espécies pertencentes ao grupo Bcc apresentam diferentes mecanismos de interação que possibilitam a ocupação de nichos diferentes no solo, plantas e animais, decorrente da colonização de ambientes completamente contrastantes e estratégias diferentes de interação com o seu hospedeiro e/ou diferentes micro-organismos.

Algumas espécies do Bcc podem viver comensalmente em plantas, em íntima associação com raízes, sendo uma das bactérias mais abundantes nas raízes e na rizosfera de diferentes espécies vegetais (Nacamulli et al., 1997), podendo ter diversas aplicações biotecnológicas, como biocontrole, biodegradação/biorremediação (Depoorter et al., 2016; Eberl e Vandamme, 2016),

promoção de crescimento vegetal (fixação de nitrogênio e produção de fitohormônios) (Santos et al., 2001; Perin et al., 2006), produção de biopolímeros (Perin et al., 2006) e produção de antifúngicos (Parker et al., 1984; Mao et al., 2006).

Burkholderia spp. apresentam um cluster gênico, denominado cluster WCB, o qual apresenta genes responsáveis pela biossíntese de açúcares, metabolismo de lipídeos, glicosiltransferases e proteínas de transporte (Cuccui et al., 2012). Entretanto, o papel desta cápsula e destes genes na interação destas bactérias no ambiente não está bem compreendido para as espécies do grupo Bcc, embora estudos prévios sugerem que esteja envolvido nos mecanismos de interação no ambiente (Kim et al., 2005). Dessa forma, estudos devem ser conduzidos para um melhor entendimento da função destes genes nos mecanismos de interação de *Burkholderia* spp. com o seu hospedeiro e com outros micro-organismos associados.

Com relação à virulência foi observado que a inativação do gene *wcbE*, homólogo a uma glicosiltransferase de *B. pseudomallei*, resulta na perda de lipopolissacarídeo (O-PS tipo I) e virulência atenuada em modelo animal (Reckseidler et al., 2001; Cuccui et al., 2012; Dando et al., 2016). Também foi observado que um mutante insercional para o gene glicosiltransferase em *B. pseudomallei* resultou em uma linhagem sem cápsula e menos virulenta quando comparada com a bactéria selvagem, indicando que a expressão desse gene é essencial para sua virulência (Reckseidler-Zenteno et al., 2010).

Em *Burkholderia cenocepacia* H111, isolado de pacientes portadores de fibrose cística, o cluster WCB não foi essencial para o fenótipo mucóide (Miller et al., 2015). Foi sugerido pelos autores que a biossíntese desses polissacarídeos poderia envolver fatores específicos para cada espécie de *Burkholderia*, e não somente o cluster WCB.

Além disso, foi observado que este cluster *wcb* é regulado em resposta a mudança de temperatura (Gonçalves et al., 2019), sendo a parte central (com exceção do gene *wcbE*), responsável pela síntese de exopolissacarídeos é induzida a 37°C em comparação a 28°C, sugerindo que este cluster pode estar envolvido na colonização de diferentes ambientes (mamíferos, plantas ou solo). Nesse contexto foi observado que a síntese de antifúngicos é induzida a 28°, enquanto a virulência a *Galleria mellonella* é induzida a 37°C (Gonçalves et al., 2019). Dessa forma, estudos devem ser realizados com a finalidade de entender o papel dos genes desse cluster em resposta a diferentes condições ambientais e hospedeiros.

Em estudo anterior, foi comparado ao cluster *wcb* em três espécies diferentes de *Burkholderia*, sendo elas: *B. seminalis* TC3.4.2R3, *B. cenocepacia* H111 e *B. cenocepacia* K56-2. Foi observado que o cluster *wcb* de *B. seminalis* apresenta um maior número de genes envolvidos no metabolismo de açúcares (Figura 01), que somados às glicosiltransferases poderiam resultar em uma cápsula com maior complexidade. Quinze dos vinte e quatro genes desse cluster são compartilhados entre as três linhagens analisadas. Há uma maior similaridade entre as linhagens K56-2 e TC3.4.2R3, porém uma metiltransferase (gene *fkbM*) de função desconhecida, é compartilhada apenas entre as linhagens H111 e TC3.4.2R3.

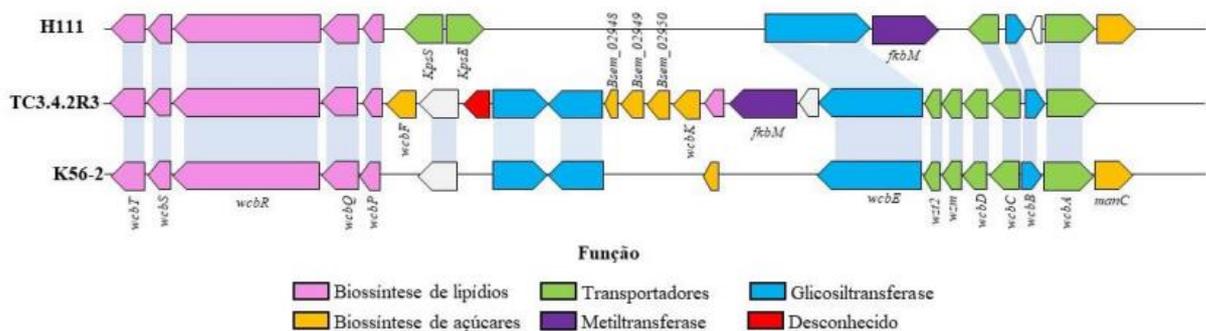


Figura 01. Organização do cluster *wcb* em *B. cenocepacia* H111 e K56-2 e *B. seminalis* TC3.4.2R3. Marcação em azul claro entre os clusters indicam genes compartilhados entre as diferentes linhagens. O gene *fkbM* presente nas linhagens H111 e TC3.4.2R3 são ortólogos.

Cinco genes são responsáveis pela síntese de lipídeos da cápsula, sendo conservado pelas três linhagens, são eles: *wcbP/Q/R/S/T*, sugerindo que apresenta uma função bastante importante na adaptabilidade dessas bactérias. Entre esses genes está o *wcbR*, que é apresentada um domínio PKS (Poliketídio Sintase do Tipo I) / ácido graxo sintase.

As glicosiltransferases são enzimas capazes de transferir resíduos de açúcar de um precursor de nucleotídeo para uma cadeia crescente de carboidrato, sendo responsável então, pela extensão da cadeia de açúcares para formação da cápsula (Whitfield & Keenleyside, 1995). São observados dois genes que codificam glicosiltransferases no cluster *wcb* de *B. cenocepacia* H111, são eles: *wcbE* e *wcbB*.

Em *B. cenocepacia* H111, há apenas um gene associado a síntese de manose, o *manC*. Considerando apenas a análise desse cluster, poderia ser proposto que esta linhagem produz uma cápsula de complexidade reduzida, porém, há genes presentes

em outros clusters do genoma da H111 que estão envolvidos na síntese de açúcares, tais como ADPL-glycero- β -D-manno-heptose, o qual está associado à síntese do LPS ligado à membrana externa de bactérias. Isso sugere que, embora ausente no cluster wcb, há genes presentes na membrana externa da bactéria, que estão envolvidos com o metabolismo de açúcares, o que poderia conferir a linhagem H111, a capacidade de colonizar diferentes ambientes.

Em projeto anterior (Araújo et al., 2021), foram obtidas linhagens de *B. cenocepacia* H111 a partir do sistema da nuclease I-SceI (Flannagan et al., 2008). No atual projeto, as mutações realizadas em *B. cenocepacia* H111 foram confirmadas e os mutantes, avaliados fenotipicamente.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo do projeto foi avaliar o papel dos genes do cluster wcb envolvidos na síntese da cápsula de *Burkholderia cenocepacia* H111, nos mecanismos de interação ambiental.

2.2. Objetivos específicos

- Confirmação da deleção de genes por PCR e sequenciamento;
- Caracterização fenotípica dos mutantes de *Burkholderia cenocepacia* H111 com relação a capacidade de inibição de crescimento de fungos;
- Caracterização fenotípica dos mutantes de *Burkholderia cenocepacia* H111 com relação à virulência a pimentão.

3. Materiais e métodos

3.1. Linhagens bacterianas, fúngicas e condições de cultivo

No atual projeto, foram avaliadas nove mutantes de *B. cenocepacia* H111, obtidas em projeto anterior, nas quais diferentes genes do cluster wcb foram mutados (tabela 01). As bactérias foram cultivadas a 28°C sobre meio PIA. Os fungos fitopatogênicos – *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. equisetum* e *F. decemoulu* -

foram cultivados em meio BDA (Batata Dextrose Ágar – Merck) a 28°C por até 10 dias.

Linhagem de *Burkholderia cenocepacia* Genes mutados

H111 (1)	selvagem
Mutante 3 (HM 2)	wcbC e proteína hipotética
Mutante 4 (HM 3)	wcbR
Mutante 7 (HM 6)	fkbM
Mutante 8 (HM 7)	wcbR e fkbM
Mutante 12 (HM 11)	wcbA e wcbB
Mutante 15 (HM 14)	wcbA, wcbB e wcbR
Mutante 16 (HM 16)	wcbA, wcbB, wcbR, wcbC e proteína hipotética
Mutante 18 (HM 18)	wcbA, wcbB e fkbM
Mutante 19 (HM 19)	wcbA, wcbB, wcbC, wcbR, fkbM e proteína hipotética

Tabela 01. Linhagens de *B. cenocepacia* H111 e quais genes foram mutados em cada uma delas.

3.2. Confirmação da deleção de genes por PCR e sequenciamento

Foram desenhados primers para identificação da deleção dos genes wcbA, wcbB, e fkbM, com auxílio do programa Geneious. Cada mutante teve determinados genes deletados, esses genes estão representados em branco, como esquematizado (figura 02 a 10). Foi realizado o PCR de todos os genes citados e observado em gel de agarose. Para o gene fkbM, foi realizado o sequenciamento e comparado através da plataforma Blast.

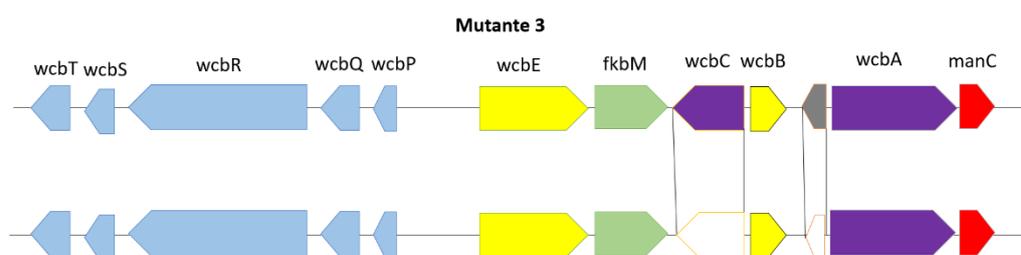


Figura 02. Deleções realizadas na mutante 3

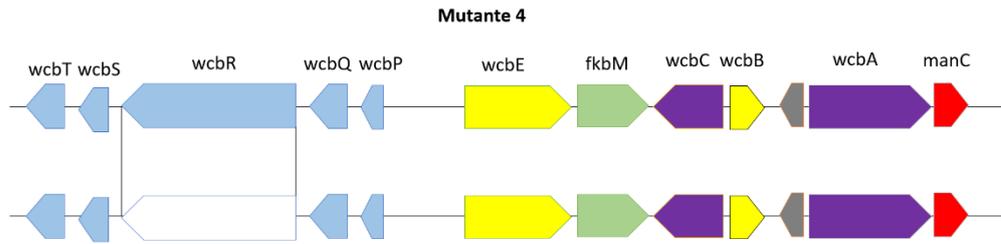


Figura 03. Deleções realizadas na mutante 4

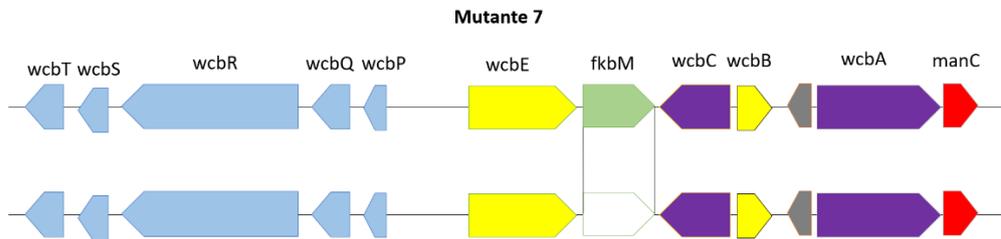


Figura 04. Deleções realizadas na mutante 7

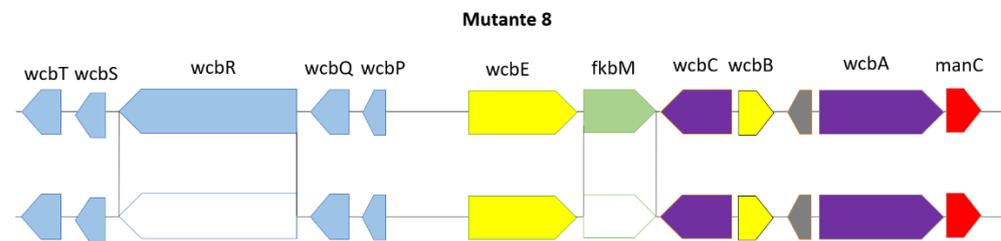


Figura 05. Deleções realizadas na mutante 8

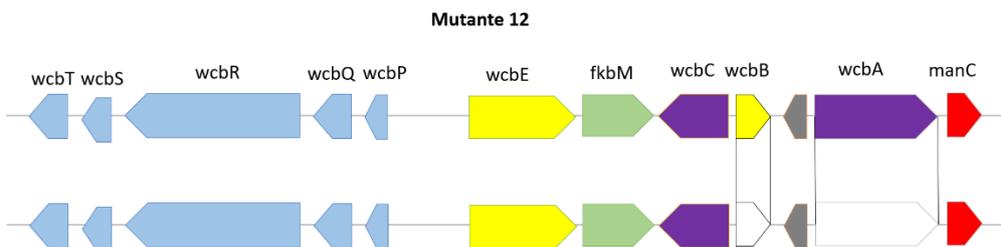


Figura 06. Deleções realizadas na mutante 12

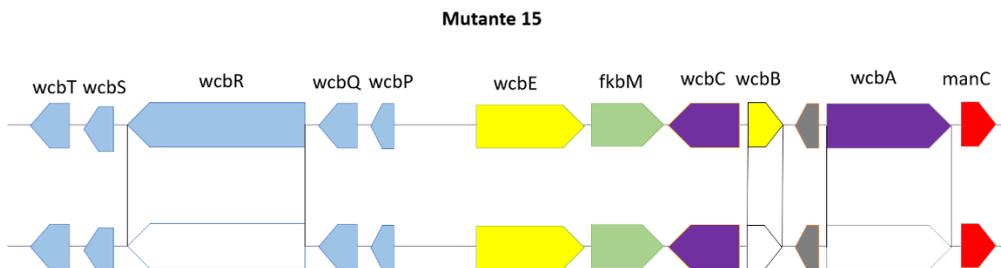


Figura 07. Deleções realizadas na mutante 15

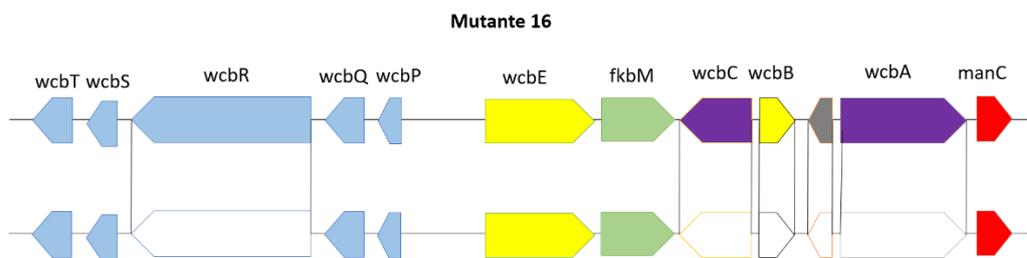


Figura 08. Deleções realizadas na mutante 16

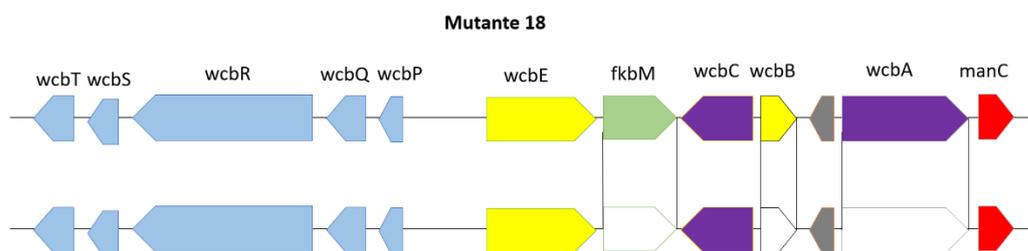


Figura 09. Deleções realizadas na mutante 18

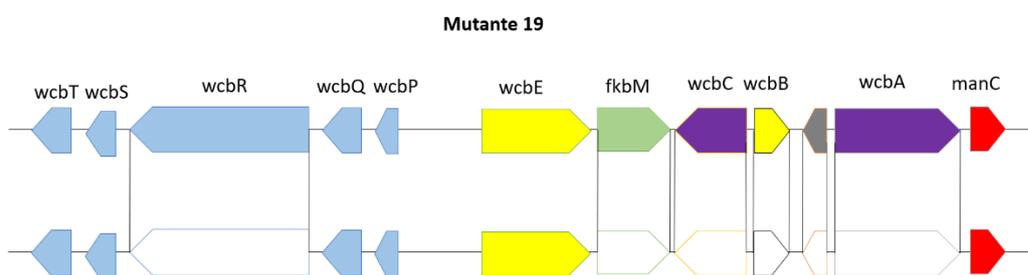


Figura 10. Deleções realizadas na mutante 19

3.3. Análise de produção de antifúngicos

As dez linhagens de *B. cenocepacia* H111 (selvagem e mutantes) foram crescidas durante 24 horas em meio LB (Luria Bertani) a 28°C e a densidade óptica (DO_{600nm}) foi ajustada para 0,1. Cinco μ l dessa suspensão foram inoculados em três extremidades diferentes em uma placa contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar). No centro de cada placa que foram inoculadas as bactérias, foi adicionado um fungo da espécie *Fusarium*. As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias. Após o crescimento do fungo, foi analisada a formação do halo de inibição com relação ao controle, o qual o fungo foi cultivado isolado em uma placa de meio BDA nas mesmas condições. As análises foram realizadas em triplicatas.

3.4. Virulência à pimentão

As linhagens de *B. cenocepacia* H1111 (selvagem e mutantes) foram crescidas durante 24 horas em meio LB a 28°C. As culturas foram lavadas em salina e a DO_{600nm} ajustada para 0,1. Cinco µl dessa suspensão foram inoculados em fragmentos de pimentão, previamente furados com palito de dente. Foi utilizado como controle fragmentos de pimentão inoculados apenas com salina. Os fragmentos inoculados foram mantidos a 28°C por 4 dias e a formação de necrose foi avaliada diariamente. O experimento foi realizado em triplicata.

4. Resultados

4.1. Confirmação dos genes deletados

Foram confirmadas as deleções dos genes *wcbA*, *wcbB* e *fkbM* de suas respectivas mutantes, a partir da PCR e sua visualização em gel de agarose (figura 11 e 12). Para realizar a deleção do gene *fkbM* como esquematizado (figura 13), o resultado do sequenciamento foi avaliado e comparado na plataforma Blast, entre a mutante e a selvagem (figura 14 e 15).

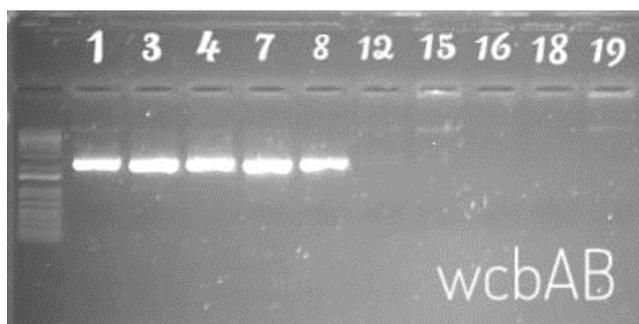


Figura 11. Confirmação da deleção dos genes *wcbA* e *wcbB* em gel de agarose, sendo 1, a selvagem; 3, 4, 7 e 8 as mutantes sem o *wcbA* e *wcbB* deletados; e 12, 15, 16, 18 e 19 as mutantes com o *wcbA* e *wcbB* deletados.

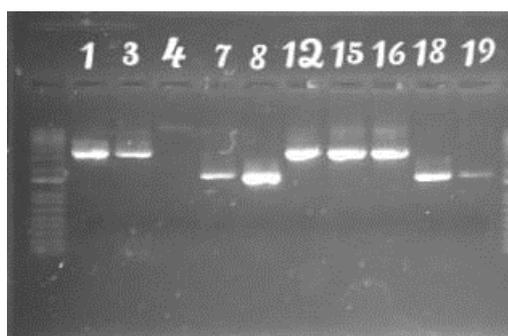


Figura 12. Confirmação da deleção do gene *fbkM* em gel de agarose, sendo 1, a selvagem; 3, 4, 12, 15 e 16 as mutantes sem o *fbkM* deletado; e 7, 8, 18 e 19 as mutantes com o *fbkM* deletado.

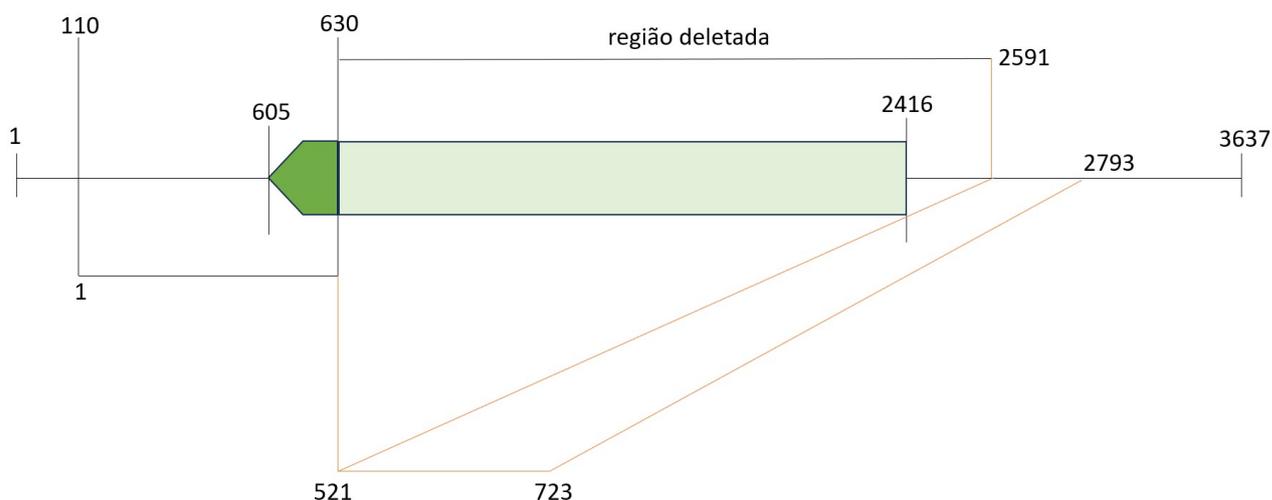


Figura 13. Esquematização da deleção do gene *fbkM*, sendo os números inferiores o que foi amplificado nas mutantes e os números superiores o que seria equivalente na selvagem, indicando a região de deleção do gene. A região do início e do final pode ser observada amplificada no gel de agarose.

Range 1: 110 to 630 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
959 bits(519)	0.0	520/521(99%)	0/521(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGGCTACTCCCATAGATGGCGTGAACCAGTCAGGCMACACGCGTATTTCAATTTATGAT	60		
Sbjct 110	ATGGGCTACTCCCATAGATGGCGTGAACCAGTCAGGCAACACGCGTATTTCAATTTATGAT	169		
Query 61	TCGAGGATGGCCTCTGATCGGCGCCATGTAGAGTGCCTGAAATTTGTTTTCCGAATCAC	120		
Sbjct 170	TCGAGGATGGCCTCTGATCGGCGCCATGTAGAGTGCCTGAAATTTGTTTTCCGAATCAC	229		
Query 121	GACGATATTGCATTGCCTTTCTCTGGGCACCCAGTGCAACTGCACTATTCGAATGTCGT	180		
Sbjct 230	GACGATATTGCATTGCCTTTCTCTGGGCACCCAGTGCAACTGCACTATTCGAATGTCGT	289		
Query 181	CGACTCAGCACGTTGATTCGCGATCTAATCGAAGATGTGCCGATTTCCGGTGCGCCAGCTG	240		
Sbjct 290	CGACTCAGCACGTTGATTCGCGATCTAATCGAAGATGTGCCGATTTCCGGTGCGCCAGCTG	349		
Query 241	CGCGCGGATATTCGAAACGGATCTCAACACTACGCTCGGTCGCTGCTCTTGCCAGTGCT	300		
Sbjct 350	CGCGCGGATATTCGAAACGGATCTCAACACTACGCTCGGTCGCTGCTCTTGCCAGTGCT	409		
Query 301	GAACGACACGGATCATGGACGATAGGCTTGTTCGGCATTTCGTACATGTGCATCGTTTT	360		
Sbjct 410	GAACGACACGGATCATGGACGATAGGCTTGTTCGGCATTTCGTACATGTGCATCGTTTT	469		
Query 361	GATAAGCGCTGGATTAGTCAATTAGTTCCAGCTTAATGCAAAACTCATTGCCGTAGGA	420		
Sbjct 470	GATAAGCGCTGGATTAGTCAATTAGTTCCAGCTTAATGCAAAACTCATTGCCGTAGGA	529		
Query 421	CGGCAATGGGAAGCCTCGGAACTCGAGGCGACGACGATGGAAGCGGATCTTTAAGCGTCA	480		
Sbjct 530	CGGCAATGGGAAGCCTCGGAACTCGAGGCGACGACGATGGAAGCGGATCTTTAAGCGTCA	589		
Query 481	GGCACATACCGACGTTTATTTCGAATAGCCGCAATGACGAGG	521		
Sbjct 590	GGCACATACCGACGTTTATTTCGAATAGCCGCAATGACGAGG	630		

Figura 14. Confirmação da deleção do gene *fbkM* na plataforma Blast, a partir da primeira região amplificada.

Range 2: 2591 to 2793 [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
375 bits(203)	2e-107	203/203(100%)	0/203(0%)	Plus/Plus
Query 521	GATGAGGTTTCAGGTGAGCAGCACAAAGCTGGGGAACGCACGCGACAACCGTCGCTTCTC	580		
Sbjct 2591	GATGAGGTTTCAGGTGAGCAGCACAAAGCTGGGGAACGCACGCGACAACCGTCGCTTCTC	2650		
Query 581	GAGCGAACAGAGATTCTCACCGGTTCATCTCGTCAGCCTGTGTATCGCTAATTTCCCTCGAG	640		
Sbjct 2651	GAGCGAACAGAGATTCTCACCGGTTCATCTCGTCAGCCTGTGTATCGCTAATTTCCCTCGAG	2710		
Query 641	CACCGACTGTACGCGTTGCATTGTCGTTAACCAGCCGGCGCGATCGGGGATGTTGTCGAT	700		
Sbjct 2711	CACCGACTGTACGCGTTGCATTGTCGTTAACCAGCCGGCGCGATCGGGGATGTTGTCGAT	2770		
Query 701	CACATGAACTGCATCGGTGGTGG	723		
Sbjct 2771	CACATGAACTGCATCGGTGGTGG	2793		

Figura 15. Confirmação da deleção do gene *fbkM* na plataforma Blast, a partir da segunda região amplificada.

4.2. Produção de antifúngicos

Foi observado que tanto a bactéria selvagem quanto as mutantes foram capazes de inibir o crescimento dos quatro fungos testados - *Fusarium oxysporum* (Figura 16 a 20), *F. solani* (Figura 21 a 25), *F. equisetum* (Figura 26 a 30) e *F. decemoele* (Figura 31 a 35) - em comparação ao controle. Logo, não há diferença entre a capacidade de produção de antifúngicos pelas mutantes, todas as linhagens analisadas (selvagem e mutantes) foram capazes de formar o halo de inibição, indicando que a deleção destes genes não afeta a síntese e secreção destes compostos.



Figura 16. Controle do fungo *F. oxysporum*.



Figura 17. Formação de halo de inibição pela

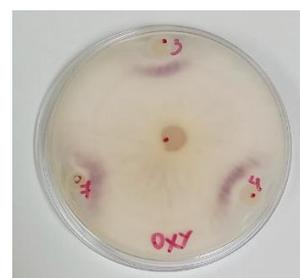


Figura 18. Formação de halo de inibição pelas mutantes

bactéria selvagem e
mutantes.



Figura 19. Formação de halo de inibição pelas mutantes



Figura 20. Formação de halo de inibição pelas mutantes



Figura 21. Controle do fungo *F. solani*

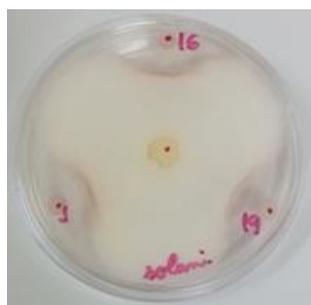


Figura 22. Formação do halo de inibição pela selvagem e mutantes



Figura 23. Formação de halo de inibição pelas mutantes



Figura 24. Formação do halo de inibição pelas mutantes

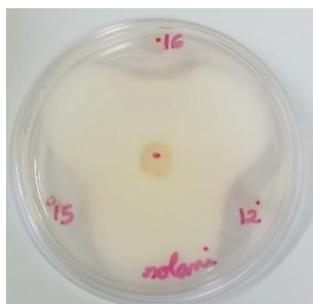


Figura 25. Formação de halo de inibição pelas mutantes



Figura 26. Controle do fungo *F. equisetum*

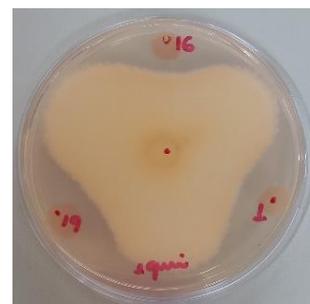


Figura 27. Formação do halo de inibição pela bactéria selvagem e mutantes

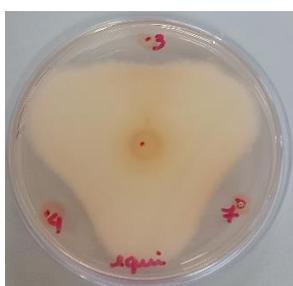


Figura 29. Formação do halo de inibição pelas mutantes



Figura 30. Formação do halo de inibição pelas mutantes

Figura 28. Formação de halo de inibição pelas mutantes

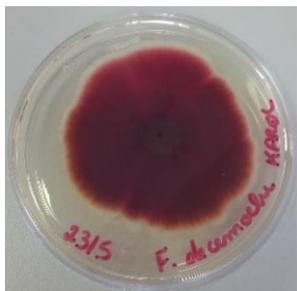


Figura 31. Controle do fungo *F. decemodlu*



Figura 32. Formação do halo de inibição pela selvagem e mutantes

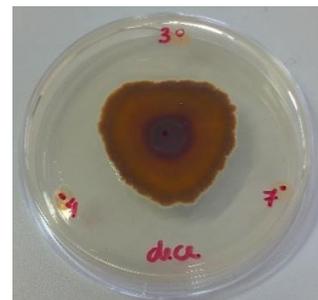


Figura 33. Formação do halo de inibição pelas mutantes



Figura 34. Formação do halo de inibição pelas mutantes



Figura 35. Formação do halo de inibição pelas mutantes

4.3. Virulência à pimentão

Foi observado que apenas a mutante 7, deleção do gene *fkB*M (figura 40) não causou necrose nos fragmentos de pimentão, assim como o controle (sem bactéria) (figura 36). A bactéria selvagem (figura 37) e as demais mutantes (figura 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45 e 46) foram capazes de causar necrose.



Figura 36. Controle



Figura 37. Necrose causada pela bactéria selvagem



Figura 38. Necrose causada pela mutante 3



Figura 39. Necrose causada pela mutante 4



Figura 40.
Ausência de
necrose pela
mutante 7



Figura 41. Necrose
causada pela mutante
8



Figura 42. Necrose
causada pela mutante
12



Figura 43. Necrose
causada pela mutante
15



Figura 44. Necrose
Causada pela mutante 16



Figura 45. Necrose
causada pela mutante 18



Figura 46. Necrose
causada pela mutante 19

5. Discussão

As deleções dos genes *wcbA*, *wcbB*, e *fkBM* foram observadas, a partir de PCR e sequenciamento, e confirmadas em suas respectivas mutantes, de forma que algumas delas poderiam resultar em alterações nos fenótipos avaliados.

Com relação a produção compostos antifúngicos, não foi observado diferenças entre a bactéria selvagem (*Burkholderia cenocepacia* H111), e suas mutantes, todas foram capazes de formar halo de inibição quando testadas com diferentes fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*. Esse resultado mostra que, para linhagem H111, estes genes do cluster *wcb* não estão envolvidos com inibição de fungos no ambiente.

Também pode ser avaliado a capacidade de formação de necrose em pimentão. Foi observado que todas as mutantes, com exceção da mutante 7 (deleção do gene *fkBM*), foram capazes de induzir necrose nos fragmentos de pimentão. Desta forma, a deleção deste gene *fkBM*, que codifica uma metiltransferase) impede a formação de necrose no pimentão, porém, esse efeito é suprimido quando outro gene, além deste, também é deletado, como observado na mutante 8, na qual os genes *fkBM* e *wcbR* foram deletados, e na mutante 18, na qual os genes *fkBM*, *wcbA* e *wcbB* foram deletados. Sugerindo assim, que a ação dos genes *wcbR*, *wcbA* e *wcbB* suprimem a ação do gene *fkBM*. Outros estudos deverão ser conduzidos para a compreensão do mecanismo envolvido na virulência a pimentão, e o papel desta metiltransferase codificada por este gene *fkBM*.

Uma hipótese para esse resultado, é que os açúcares que compõem a cápsula são metilados para poderem deixar o interior celular, e quando a metiltransferase fkbM é deletada, ocorre o acúmulo desses açúcares na célula. Segundo Coccu et al. (2012), os genes wcbA e wcbC são transportadores, o gene wcbB é uma glicosiltransferase e o wcbR participa na biossíntese de lipídios, desta forma, a deleção desses genes inibem a ação do gene fkbM, uma vez que impediriam a formação do complexo lipídio-oligossacarídeo no interior celular e não haveria acúmulo desse complexo para ser metilado e translocado para superfície celular.

6. Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que, os genes wcbA e wcbB foram deletados de suas respectivas mutantes, mas que não resultam em alterações nos fenótipos avaliados. O gene fkbM também foi deletado de suas respectivas mutantes, resultando na perda de virulência ao pimentão.

Não há diferença na produção de antifúngicos pelas mutantes, visto que todas foram capazes de inibir o crescimento dos fungos avaliados. Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho, confirmaram que genes envolvidos na síntese de cápsula podem alterar o fenótipo de *B. cenocepacia* H111, afetando os mecanismos de interação no ambiente.

7. Referências bibliográficas

- .**Flannagan R.S.**, Linn T., Valvano M.A. 2008 . **A system for the construction of targeted unmarked gene deletions in the genus *Burkholderia*** . Infectious Diseases Research Group, Department of Microbiology and Immunology, and Medicine, Siebens-Drake Research Institute, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada. **Environmental Microbiology**. 10(6), 1652–1660
- .**Coenye T**, Vandamme P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**. 5(9): 719–729.
- .**Depoorter E**, Bull MJ, Peeters C, et al. (2016). *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 100: 5215–5229.

- .**Eberl L**, Vandamme P (2016). Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. **F1000Research** 5:1007 (doi:10.12688/f1000research.8221.1).
- .**Nacamulli C**, Bevivino A, Dalmastrì C, et al. (1997). Perturbation of Maize Rhizosphere Microflora Following Seed Bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI7. **FEMS Microbiology Ecology**. 23: 183-193.
- .**Santos P**, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J. (2001). *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(6): 2790- 2798
- .**Parker WL**, Rathnum ML, Seiner V, et al. (1984). Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. **The Journal of Antibiotics**. 37(5): 431–440.
- .**LiPuma JJ**. (2010). The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Review**. 23(2): 299– 323.
- .**Ho YN**, Huang CC. (2015). Draft Genome Sequence of *Burkholderia cenocepacia* Strain 869T2, a Plant- Beneficial Endophytic Bacterium. **Genome Announcements**. 2015; 3(6): pii: e01327 15
- .**Cuccui J**, Dean RE, George AJ, et al. (2012). Characterization of the *Burkholderia pseudomallei* K96243 capsular polysaccharide I coding region. **Infection and Immunity**. 80(3): 1209 -1221.
- .**Reckseidler SL**, DeShazer D, Sokol PA, et al. (2001). Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: Identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. **Infection and Immunity**. 69(1): 34–44.
- .**Dando SJ**, Ipe DS, Batzloff M, et al. (2016). *Burkholderia pseudomallei* capsule exacerbates respiratory melioidosis but does not afford protection against antimicrobial signaling or bacterial killing in human olfactory ensheathing cells. **Infection and Immunity**. 84(7): 1941–1956.
- .**Reckseidler-Zenteno SL**, Viteri DF, Moore R, et al. (2010). Characterization of the type III capsular polysaccharide produced by *Burkholderia pseudomallei*. **Journal of Medical Microbiology**. 59(12): 1403–14.
- .**Miller RR**, Hird TJ, Tang P, et al. (2015). Whole-genome sequencing of three clonal clinical isolates of *B. cenocepacia* from a patient with cystic fibrosis. **PLoS One**. 10(11): e0143472.

- .Kim HS**, Schell MA, Yu Y, et al. (2005). Bacterial genome adaptation to niches: Divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. **BMC Genomics**. 6:174 doi:10.1186/1471-2164-6-174
- .Araújo WL**, Creason AL, Mano ET, Camargo-Neves AA, Minami SN, Chang J, Loper JE (2016). Genome Sequencing and Transposon Mutagenesis of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 Identify Genes Contributing to Suppression of Orchid Necrosis Caused by *B. gladioli*. **Molecular plant-microbe interactions**. 29(6): 435–446.
- .Gonçalves PJRO**, Hume CDD, Ferreira J, et al. (2019). Environmental interactions are regulated by temperature in *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3. **Scientific Reports**. 9:5486. Doi:10.1038/s41598-019-41778-x
- .Araújo W.L**, Eberl L. (2021) *Burkholderia* adaptation to different niches: the role of wcb cluster in virulence and environmental survival strategies. Department of Plant and Microbial Biology, University of Zurich.
- Naughton LM**, An SQ, Hwang I, et al. (2016). Functional and genomic insights into the pathogenesis of *Burkholderia* species to rice. **Environmental Microbiology**. 18(3): 780–90.
- Perin L**, Martínez L, Paredes G, et al. (2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 56:1931–1937.
- Mao S**, Lee SJ, Hwangbo H, et al. (2006). Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. **Current Microbiology**. 53(5): 358–364.
- Whitfield C**, Keenleyside WJ. 1995. Regulation of expression of group IA capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**. 15:361–371.